



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

마이로시네이즈 활성화에 따른
십자화과 채소의 설포라판 함량 변화와
기능적 특성에 관한 연구

제주대학교 대학원

동물생명공학과

김 정 현

2020년 8월



마이로시네이즈 활성화에 따른 십자화과 채소의 설폴라판 함량 변화와 기능적 특성에 관한 연구

지도교수 류 연 철

김 정 현

이 논문을 동물생명공학 박사학위 논문으로 제출함

2020년 8월

김정현의 동물생명공학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 왕 식



부위원장 민 태 선



위원 도 경 탁



위원 손 영 옥



위원 류 연 철



제주대학교 대학원

2020년 8월



A Study on the Changes of Sulforaphane Content and
Functional Properties of *Brassicaceae* (*Cruciferae*)
according to Myrosinase Activity

Jeong-Hyun Kim
(Supervised by professor Youn-Chul Ryu)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Doctor of Philosophy

2020. 8.

This thesis has been examined and approved.

Department of Animal Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Commercially available myrosinase refining enzyme (thioglucosidase, CAT number T4528) costs more than 4,000 Korean *won*, which makes it impossible to apply the method to producing vegetable juices, beverages, etc. (the definition of 1 unit: the amount of enzyme produced by the decomposition of 1.0 μmol from sinigrin under a condition of pH 6.0 at 25 °C). Therefore, the method to refine the myrosinase needs developing in an economical way.

In the cruciferous plant such as broccoli, kohlabi, red beet, and cabbage, there is a glucoraphanin (GR) of the glucosinolate group in the form of a glycoside synthesized with sugar. It is hydrolyzed into sugar and non-sugar and is produced with SFN of the group of isothiocyanate, which is reported to have a possibility of possessing functional properties such as antioxidant and anti-cancer. However, when SFN is produced by the myrosinase enzyme, it brings about taking a negative effect in obtaining SFN by the way in which nucleophile (most proteins, peptides or amino acids) in the plant forms the sulforaphane conjugate with SFN. In order to address the problem, and develop a method to obtain sulforaphane from a cruciferous plant with high yield.

In order to prove the function of sulforaphane extracted at a high rate of efficiency, DPPH assay was conducted to evaluate the antioxidant activity which eliminates free radicals that cause aging. In addition, by evaluating live cells, the MTT assay, a test for evaluating changes in cell proliferation or apoptosis was conducted and oral health tests, which aim to inhibit the growth of oral microbes causing bad breath, were conducted and effects on anti-cancer, antioxidant and anti tooth decay were validated.

Studies comprised experiments for three topics and the results obtained in the study are summarized as follows:

Experiment 1. The Optimization of extracting myrosinase deriving from the cruciferous plants

This study is mainly concerned with a method to refine myrosinase enzyme from a cruciferous plant; more in detail, the research was conducted to economically refine myrosinase by taking advantage of then ammonium sulfate (AS) method from a cruciferous plant. The results obtained in the study are summarized as follows:

- 1) A method to refine myrosinase by using the ammonium sulfate method (AS), not column type high refinement, has been developed from broccoli, a cruciferous vegetable. After precipitating and removing the protein by treating 50~60 % (w/v) AS of cruciferous vegetables, crude protein was precipitated and fractionated including myrosinase. When myrosinase enzyme activity was measured after obtaining the crude protein fraction, and when crude protein from Sri Lanka mustard seed was applied with glucoraphanin (GR) of 66.6 mg per ℓ , 44.02 % of GR was converted to sulforaphane (SFN) and the result showed about higher activity of 2.6 % compared with myrosinase purchased from Sigma-Aldrich (the column type refinement method).
- 2) Compared with the column type refinement method, the enzyme titer of myrosinase was proved to be excellent. In order to confirm the advantage the two-tier AS refinement method has over one-tier refinement, refinement yields of the control group of 55-80 %, which used 55 % of AS in the first step, and in the second stage, used 80 % of AS were compared with those of 80 % of AS in its counterpart. SFN content of broccoli treated with 55-80 % compared with that of broccoli treated with 80 % of AS was shown to be twice higher. It was found that from this result, the two-tier AS processing method was much higher than one-tier AS treatment method.
- 3) The refinement and activation of myrosinase was measured in accordance with the inactivation of ESP (epithiospecifier proteins). First, by treating 55 % (w/v) of AS on pulverized mustard seeds, and precipitating and removing the protein, AS of 80 %

(w/v) was treated and crude protein containing myrosinase was obtained by precipitating crude protein. In the following process, the crude protein fraction containing myrosinase obtained to inactivate ESP protein was dissolved by the buffer and heat-treated at 60 °C for 10 minutes (the control group). On the control group, at this stage, heat was not treated to inactivate ESP protein. When undergoing inactivation the produced content of SFN was 4,200 mg/dry kg, which showed a higher rate of 55 % compared with the SFN content of 2,700 mg/dry kg of the content in the subject group. From this result it draws a conclusion that the activation can enhance the enzyme activity.

- 4) Myrosinase refinement and activity were measured from oiled mustard seeds. Based on the judgment that in the course refining myrosinase into a water-soluble substance, removing fat soluble ingredients in the refinement process would obtain a highly dense concentration of myrosinase, it was refined after oiling mustard seeds by using the oil extractor (the oil presso oil extractor manufactured by Liquid), the enzymatic assay confirmed enzymatic activation. The result showed that while the use of the oiled mustard seeds in 30 minutes of measurement showed the activation of 39.63 units/mg, the use of the un-oiled mustard seeds in 30 minutes of measurement showed the activation of 29.33 units/mg. Therefore, it is estimated that oiling the seeds produces the higher activation of enzymes.
- 5) Change in the activation of myrosinase enzymes depending on the treatment of cell wall degrading enzymes was confirmed. The mustard seeds treated with Viscozyme[®] L (Cellulase, multi enzyme), Pectinex[®] Ultra Pulp (Pectin lyase), Fungamyl[®] 800L (Fungal alpha amylase) produced by Novozyme company by 0.5 % for each were used. In the case of refined mustard seeds without adding cell wall disintegrating enzymes, the activation of the enzymes was measured 87.67 units/mg after measuring for thirty minutes. In contrast, in the case of the sample of refined mustard seeds after adding cell disintegrating enzymes, the activation of the enzymes was 103.92 units/mg after thirty minutes of measurement. From these results more myrosinase with a higher

degree of enzyme activation when using refined mustard seeds after adding cell wall disintegrating enzymes than not using them at all.

Experiment 2. The Optimization of the enzyme treatment condition for the extraction of high content sulforaphane

This research is concerned with the method of producing a high content sulforaphane (SFN); more specifically, it was conducted on the method of producing a high yield of SFN from a cruciferous plant by preventing SFN from being compounded by treating phenyl isothiocyanate (PITC), the results are as follow:

- 1) In order to establish the concentration conditions of the enzyme myrosinase, myrosinases extracted from four mustard seeds (from USA, India, Sri Lank and Canada) on the same condition were mixed by the same ratio and were treated with broccoli crushing solution depending on concentrations. For two hours the treatment of the enzyme was conducted at 60 °C after myrosinase mixed with broccoli grinding solution was added at a sequence of 1 %, 5 %, 10 % and then myrosinase manufactured by Sigma-Aldrich Company was added 5 %. Less SFN content was detected. Despite adding myrosinase from Sigma-Aldrich, the fact that it has less SFN than the negative control group showed the result in which there are a variety of proteins and as higher the concentration of refined myrosinase is, the more the protein content increased and it decreased by mixing with SFN.
- 2) A broccoli sprout known to have a higher SFN content than broccoli was obtained. It was crushed under the same conditions (broccoli: water=1:4), all of which showed substantial difference from broccoli. The broccoli sprout with the highest content was 3,800 mg/kg, which was 63 times higher than broccoli. When myrosinase extracted from mustard seeds and broccoli was added, the higher result was shown, and when adding mustard seeds, the content of SFN increased by 3.2 times. In addition, it showed that myrosinase derived from mustard seeds and broccoli can

be activated and myrosinase derived from mustard seeds in comparison with that from broccoli was more effective. As mentioned earlier, ESP (epithiospecifier protein) prevents the action of myrosinase and converts GR into sulforaphane nitrile. After heat treatment of broccoli sprouts at 100 °C for 20 minutes, in order to remove ESP the treatment of heat was conducted at 60 °C for ten minutes. An experiment was conducted to reduce the action of ESP and maximize the content of SFN. The treatment of heat inactivated ESP, which led to an increase in the size of content but did not show much difference; therefore, PITC treatment was conducted.

- 3) In order to conduct the experiment, after treating PITC of 100 g/l in the pulverized solution obtained by crushing broccoli heat treated at 100 °C for 20 minutes, and after centrifugation was conducted for two hours at a rate of 10,000 rpm, a supernatant was obtained. After treating myrosinase with 5 % of the obtained supernatant, the reaction was induced at 40 °C for two hours, and the amount of sulforaphane present in the reaction solution sample was measured. Meanwhile, in the case of the control group, after myrosinase was treated by 5 % at the broccoli crushed liquid, the sample treated at 40 °C for two hours, after treating PITC at the broccoli crushed liquid, was used. As a result of the experiment to compare the amount of production depending on the treatment of PITC, it was confirmed that the content of SFN improved by 5.7 % compared with that of the control sample, which did not treat PITC.
- 4) By treating PITC and eliminating unnecessary proteins pure SFN was obtained and experiments were conducted to establish the temperature of enzyme treatment and the pH condition. Enzyme is the main component of protein and the rate of activity and reaction vary depending on the concentration of hydrogen ions. In order to establish the optimal pH condition, pH was adjusted with acetic acid and NaOH. As a result of checking the safety depending on the temperature of SFN and pH, it showed a peak of activity at 40 °C and pH was best at pH 4-5; however, the acidity was too low and in the following experiments, the supernatant treated with PITC was used at pH 5.5.

Experiment 3. Experiment on functionality and evaluation of broccoli enzyme treatment solution and fermentation liquid

This study crushed traditional fermented foods of Jeju Province, smeared them on MRS solid medium in which lactic acid bacteria and gram positive bacteria were selectively cultivated, and cultivated separated 1000 individuals; then, each was fermented individually and DPPH analysis, a test method for antioxidant and MTT analysis, and a test method for cancer cell death were conducted. Microorganisms which exhibited a radical scavenging activity (antioxidant capacity) with an absorbance rate of 0.15 or less were selected based on the criteria for native fermentation microorganisms and among them, the fermentation of broccoli pulverized liquid was conducted to the top 25 microorganisms. The results obtained in the study are summarized as follows:

- 1) As a result of measuring the antioxidant capacity, it was shown that the antioxidant capacity was about 3 times higher than negative control group, which indicated that a large number and a large amount of antioxidant active substance exist in fermented broccoli solution. The measurement of the antioxidant capacity of the enzyme solution and the fermented broth showed the negative control group showed an antioxidant capacity of 4.4 %, when diluted with untreated broccoli solution. The enzyme solution. compared with negative control group, showed 17.6 %, four times more, and the fermentation broth was 20.5 %, which amounted to 4.7 times higher antioxidant capacity.
- 2) The test was conducted by using macrophage RAW 264.7 cells, and in the case of the macrophage cells, which are related to immunity, the test was conducted to select strains toxic to the cells through the macrophage cells. It was confirmed that when MTT assay was conducted by diluting unfermented broccoli four times, other microorganisms were shown to increase more than 3 times other than *Weissella cibaria*, and in the case of enzyme treated solution, it was shown that after diluted four times, it showed more than potent toxicity against more than 95 % of macrophages. In addition, all broccoli treated with enzymes showed the inhibition of the growth of the macrophage cells more than

10 times more. The results of liver toxicity test of broccoli enzyme solution showed 27.6 % of cell growth inhibition when diluted 4 times with broccoli solution. Compared with the negative control group, the enzyme solution was 63.9 %, which amounted to 2.3 times higher and the fermentation broth was 70.7 %, which amounted to 2.6 times higher.

- 3) Based on the judgment that adding 1/20, 1/50, 1/100 of fermentation broth in order to check oral health was thought too low in its concentration, the rate of concentration increased to 1/2, 1/4. Though positive results were obtained about the dilution of bacteria, more tests were conducted to dilute it further based on the result of 10^8 . Cavity bacteria are Streptococcus mutans and the results of the inhibition capacity of cavity bacteria by broccoli fermentation broth showed that the negative control group showed 1.3×10^8 number of the bacteria with untreated broccoli solution and when they were dispensed into the medium of broccoli fermentation broth, the number decreased by 100 %. It was confirmed that adding fermentation solution has a much higher inhibition capacity than the unfermented broccoli solution of the negative control group.

목 차

ABSTRACT	i
목 차	viii
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF TABLES	xix
LIST OF ABBREVIATIONS	xxiii
I. 서 론	1
II. 연구사	3
1. 십자화과 (<i>Brassicaceae</i>) 채소의 분류 및 특징	3
1) 분자 계통학적 분류	3
2) 형태적 특징	5
3) 글루코시놀레이트 (glucosinolate)	5
4) 경제적 이용	6
2. 브로콜리의 효능 및 특징	7
1) 품종 및 생리 생태적 특징	8
2) 국내 생산현황	9
3) 식품 영양적 가치	13
4) 브로콜리의 효용성	15
3. 마이로시네이즈 (myrosinase)	17
1) 마이로시네이즈의 활성	17
2) 생물학적 기능	21
3) 마이로시네이즈의 적용	22

4. 이소티오시아네이트 (isothiocyanate)	23
1) 대사작용 및 생물학적 이용도	25
(1) 대사작용	25
(2) 생물학적 이용도	27
2) 생물학적 활성	28
(1) 항산화능	28
(2) 항염증능	29
(3) 항암능	30
(4) 항균력	30
3) 질병 예방	31
4) 식품 소재	31
(1) 십자화과 채소	31
(2) 브로콜리 새싹과 보충제	32
5) 안전성 (safety)	35
(1) 역효과	35
(2) 임신과 수유	35
(3) 약물 상호작용	35
5. 설포라판 (sulforaphane)	36

III. 십자화과 식물 유래의 myrosinase 추출 최적화

1. ABSTRACT	38
2. 재료 및 방법	41
1) 재료	41
2) 조효소 myrosinase의 정제	41
3) 분자량 측정 (SDS-PAGE)	41
4) 원산지별, 품종별 겨자씨의 myrosinase 활성 분석	44
5) 효소처리액의 sulforaphane 함량 분석	44
6) 단백질 농도 측정 (Bradford assay)	46
7) 효소 활성 측정 (Enzymatic assay)	48

8) 통계분석	48
3. 결과 및 고찰	50
1) 원산지와 품종별 겨자씨 myrosinase 추출	50
2) Myrosinase 정제방법에 따른 효소 활성	59
3) 겨자씨와 추출 용매의 비율	70
4) ESP 단백질의 불활성화에 따른 myrosinase의 정제 및 활성 측정	73
5) 착유한 겨자씨의 myrosinase 추출 및 활성	76
6) 세포벽 효소 처리에 따른 겨자씨의 myrosinase 활성	85
4. 요약	92
5. 참고문헌	94

IV. 고품량 sulforaphane 추출을 위한 효소처리 조건 최적화	113
1. ABSTRACT	113
2. 재료 및 방법	116
1) 재료	116
2) 브로콜리의 효소처리에 따른 sulforaphane 함량 분석	116
3) 브로콜리액에 농도별로 효소처리 후 sulforaphane 함량 분석	116
4) 가열한 브로콜리에 겨자가루를 넣었을 때 sulforaphane 함량 분석	116
5) 브로콜리 분쇄액의 pH에 따른 sulforaphane 함량 분석	117
6) PITC 처리 후 SFN 형성 및 안정성	117
7) 통계분석	117
3. 결과 및 고찰	118
1) 구입처별 브로콜리의 효소처리에 따른 sulforaphane 함량	121
2) Myrosinase 농도에 따른 sulforaphane 형성	124
3) 겨자가루의 활성 실험	126
4) 브로콜리액 pH에 따른 myrosinase 활성 및 sulforaphane 안정도	129
5) Sulforaphane 함량이 높은 브로콜리 새싹 실험	131
6) Sulforaphane과 amine 결합 저해를 위한 PITC 처리	135

4. 요약	151
5. 참고문헌	153
V. 브로콜리 효소처리액과 발효액의 기능성 실험 및 평가	159
1. ABSTRACT	159
2. 재료 및 방법	161
1) 재료	161
2) 발효	161
3) DPPH assay	161
4) MTT assay	162
5) 구강건강	165
6) 통계분석	165
3. 결과 및 고찰	166
1) 항산화능 (DPPH assay)	177
2) 간독성검사 (MTT assay)	194
3) 구강 건강도	206
4. 요약	213
5. 참고문헌	215

LIST OF FIGURES

Figure 1-1. Texonomy of Brassicales (Edgar et al., 2014)	4
Figure 1-2. Mechanism of glucosinolate hydrolysis by myrosinase	19
Figure 1-3. Active site of myrosinase during the first step of glucosinolate hydrolysis (Bones et al., 2006)	20
Figure 1-4. Chemical Structures of Some Glucosinolates and their Isothiocyanate Derivatives (Fahey et al., 2001)	24
Figure 1-5. Metabolism of glucoraphanin via the mercapturic acid pathway (Barba et al., 2016)	26
Figure 1-6. Enzymatic conversion of glucoraphanin to sulforaphane and sulforaphane nitrile (Matusheski, 2004)	37
Figure 2-1. Absorbance of BSA sample by concentration for bradford assay	47
Figure 2-2. Heat stability of myrosinase for various mustard seeds (Okunade et al., 2015)	51
Figure 2-3. The mustard seeds by origins	52
Figure 2-4. Qualitative analysis of myrosinase extracted from mustard seeds by origins	55

Figure 2-5. 98 % glucoraphanin treated with myrosinase extracted from mustard seeds by origins	56
Figure 2-6. Enzymatic activity of myrosinase from Sri Lanka mustard seed and India mustard seed	57
Figure 2-7. Active analysis of sulforaphane treated with various mustard seeds and myrosinase of broccoli	58
Figure 2-8a. Sulforaphane content of purified enzyme solution with 55-80 % ammonium sulfate precipitation	68
Figure 2-8b. Sulforaphane content of purified enzyme solution with 80 % ammonium sulfate precipitation	69
Figure 2-9. After mixing mustard seeds and solvent in 4 ratios	71
Figure 2-10. Mustard seeds and solvent are crushed to 1:4, and mustard seeds remain in the blender	72
Figure 2-11a. The changes of SFN content with non heat treatment of broccoli	74
Figure 2-11b. The changes of SFN content after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes	75
Figure 2-12. Qualitative analysis of myrosinase with or without oil expression from mustard seeds	78
Figure 2-13. Enzymatic activity of myrosinase from Sri Lanka mustard seed and India mustard seed with or without oil expression	79

Figure 2-14. Enzymatic activity of purified myrosinase on the storage period	89
Figure 2-15. Enzymatic activity of India mustard seeds by cell-wall enzymes	90
Figure 2-16. Enzymatic activity of India mustard seeds by adding cell-wall enzymes and removing fat	91
Figure 3-1. Quantitative analysis of sulforaphane	119
Figure 3-2. Quantitative analysis of SFN and AITC	120
Figure 3-3a. Content of sulforaphane with no enzyme treatment of broccoli by purchase place	122
Figure 3-3b. Content of sulforaphane with enzyme treatment of broccoli by purchase place	123
Figure 3-4. Comparison of sulforaphane content for broccoli juice with enzyme treatment by alternative concentrations	125
Figure 3-5. SFN content of body for 12 adults when they consumed with cooked broccoli and mustard powder	127
Figure 3-6. SFN content of when mustard seed powder is added to cooked broccoli	128
Figure 3-7. The analysis of SFN content by different pH of broccoli grinding liquid	130

Figure 3-8. SFN content of broccoli sprouts on different purchasing places	132
Figure 3-9. SFN content when enzyme and mustard seed powder are added to broccoli sprouts	133
Figure 3-10. Sulforaphane content with or without heat treatment	134
Figure 3-11. Comparison of LC/MS for broccoli concentrate and GR standard form	139
Figure 3-12. SFN formation in PITC-treated broccoli concentrate	141
Figure 3-13a. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from E-mart everyday	142
Figure 3-13b. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from OK mart	143
Figure 3-13c. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from GOM food mart	144
Figure 3-13d. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from OK point mart	145
Figure 3-14. Bonding mechanism of sulforaphane and amine (Bello et al., 2018)	146
Figure 3-15. Broccoli heat-treated at 100 °C for 20 minutes + PITC 37 °C, 2 hours centrifugation	147

Figure 3-16. Sulforaphane content of PITC-treated broccoli	148
Figure 3-17. Sulforaphane content assay according to temperature	149
Figure 3-18. Sulforaphane content assay according to pH	150
Figure 4-1. DPPH assay	167~169
Figure 4-2. Probability analysis of DPPH assay	171
Figure 4-3. MTT assay	172~175
Figure 4-4. 16S rRNA sequence analysis of antioxidant and anti-cancer related strains	176
Figure 4-5a. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 12 and 36 hours	178~184
Figure 4-5b. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 24 hours	185~186
Figure 4-5c. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 12 hours after adding 0.3 % glucose	187~189
Figure 4-6a. DPPH analysis of broccoli fermentation broth (50-fold dilution)	190
Figure 4-6b. DPPH analysis of broccoli fermentation broth (100-fold dilution)	191

Figure 4-7a. Antioxidant activity of enzyme treated broccoli solution	192
Figure 4-7b. Antioxidant activity of fermented broccoli solution	193
Figure 4-8. Cytoplasmic apoptosis according to place of purchasing broccoli	195
Figure 4-9. Cytoplasmic apoptosis of enzyme treated broccoli solution with 20 % myrosinase	196
Figure 4-10a. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C	197
Figure 4-10b. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C	198
Figure 4-10c. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C	199
Figure 4-11a. 1 st MTT assay of fermented liquid	200
Figure 4-11b. 2 nd MTT assay of fermented liquid	201
Figure 4-11c. 3 rd MTT assay of fermented liquid	202
Figure 4-12. MTT assay of enzyme treated broccoli	203
Figure 4-13a. MTT assay of enzyme treated broccoli	204
Figure 4-13b. MTT assay of fermented liquid	205

Figure 4-14a. Inhibition activity of <i>Weissella cibaria</i> JSKIU 18-18 fermented liquid for <i>Streptococcus mutans</i>	211
Figure 4-14b. Inhibition activity of <i>Lactobacillus paracasei</i> JSKIU 12-9 fermented liquid for <i>Streptococcus mutans</i>	212

LIST OF TABLES

Table 1-1a. Broccoli production in Korea (1999~2008)	10
Table 1-1b. Broccoli production in Korea (2009~2018)	11
Table 1-2. Broccoli production area in Korea (2009~2018)	12
Table 1-3. Nutrient composition of broccoli	14
Table 1-4. Glucosinolate Content of Selected Cruciferous Vegetables (McNaughton et al., 2003)	33
Table 1-5. Food sources of selected isothiocyanates and their glucosinolate precursors (Ishida et al., 2014)	34
Table 2-1. Composition of Seperating gel and Stacking gel	42
Table 2-2. Composition of Running buffer and Sample buffer	43
Table 2-3. Composition of k-phosphate buffer, glucoraphanin and myrosinase	45
Table 2-4. Composition of blank and sample for enzymatic assay	49
Table 2-5a. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 55-80 % Ammonium sulfate	60
Table 2-5b. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 80 % Ammonium sulfate	61

Table 2-6a. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 55-80 % Ammonium sulfate after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes	62
Table 2-6b. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 80 % Ammonium sulfate after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes	63
Table 2-7. Total amount of protein from the setting time for treatment with 80 % Ammonium sulfate	64
Table 2-8a. Enzymatic activity after leaving for 16 hours in 80% AS treatment step of Sri Lanka mustard seeds	65
Table 2-8b. Enzymatic activity after leaving for 4 hours in 80% AS treatment step of Sri Lanka mustard seeds	66
Table 2-9. Total amount of protein from the purification of Sri Lanka and and India mustard seeds with or without oil expression	80
Table 2-10a. Enzymatic activity of Sri Lanka mustard seeds without oil expression	81
Table 2-10b. Enzymatic activity of India mustard seeds without oil expression	82
Table 2-10c. Enzymatic activity of Sri Lanka mustard seeds with oil expression	83
Table 2-10d. Enzymatic activity of India mustard seeds with oil expression	84

Table 2-11. Total amount of protein from mustard seeds with or without cell-wall enzymes	86
Table 2-12a. Enzymatic activity of India mustard seeds purified with cell-wall enzymes	87
Table 2-12b. Enzymatic activity of India mustard seeds purified without cell-wall enzymes	88
Table 3-1a. Sulforaphane content of enzyme-treated solution purified with 55-80 % ammonium sulfate	137
Table 3-1b. Sulforaphane content of enzyme-treated solution purified with 80 % ammonium sulfate	138
Table 3-2. SFN stability of broccoli concentrate by treating PITC	140
Table 4-1. Composition of sample and medium for MTT assay	164
Table 4-2. Fermentation at 37 °C for 24 hours	207
Table 4-3a. Fermentation at 37 °C for 24 hours (Test 1)	208
Table 4-3b. Fermentation at 37 °C for 24 hours (Test 2)	209
Table 4-4. Mixing 36 hours fermented liquid with 72 hours fermented liquid at 37 °C	210

LIST OF ABBREVIATIONS

AITC	Allyl isothiocyanate
AM	Alveolar macrophage
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AS	Ammonium sulfate
BITC	Benzyl isothiocyanate
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX-2	cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	α -diphenyl- β -picrylhydrazyl
ESP	Epithiospecifier protein
FBS	fetal bovine serum
GR	Glucoraphanin
GSH	Glutathione
GSL	Glucosinolate
GST	Gluconasturtiin
HO-1	Heme oxygenase 1
HPLC	High performance liquid chromatography
IL-1B	Interleukin-1

iNOS	inducible oxide synthase
ITC	Isothiocyanate
I3C	Indole-3-carbinol
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	Nuclear factor kappa-B
NO	Nitric oxide
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NQO-1	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1
OD	Optical density
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate buffered Saline
PEITC	Phenethyl isothiocyanate
PGE	Prostaglandin E
PITC	Phenyl isothiocyanate
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFN	Sulforaphane
SIN	Sinigrin
SOD	Superoxide dismutase
SPSS	Statistical package for the social sciences
TNF- α	Tumor necrosis factor

I. 서론

최근 문제가 되고 있는 사스 (중증급성호흡기증후군, Severe Acute Respiratory Syndrom, SARS), 메르스 (중동호흡기증후군, Middle East Respiratory Syndrom. MERS), 코로나-19 (코로나바이러스감염증-19, corona virus disease 19, COVID-19) 사태로 인해 건강에 대한 우려와 동시에 사회적 거리두기와 외출 자제 등으로 집에서 머무는 시간이 많아지고 있다. 이에 따른 스트레스와 활동 부족으로 면역 저하와 소화불량 등의 증상을 호소하는 사람들이 늘어나고 있는 실정이다. 그러나 아직 효과적인 치료법은 부족한 상태이고, 남녀노소를 막론하고 바이러스와 면역력뿐만 아니라 건강에 대한 관심은 지속적으로 확대 될 것으로 예상하고 있다.

십자화과 채소 중 브로콜리에 설포라판의 함량이 풍부하다고 알려져 있고, 건강과 관련하여 설포라판이라는 물질에 관심을 갖게 되었다. 설포라판 (SFN; 1-isothiocyanate-4-methyl sulfonyl butane)은 브로콜리와 같은 십자화과 채소에서 유래한 항산화 기능이 있는 파이토 케미컬 (phytochemical)로 항산화뿐만 아니라 항염증, 면역력 등 기능이 입증된 원료이다. 그러나 설포라판은 열에 약하고 조리 시 손실되는 부분이 발생하기 때문에 브로콜리로부터 고효율의 설포라판을 추출하여 기능성을 확보하기 위해 본 연구를 수행하게 되었다.

최근 연구 결과에 의하면, 설포라판은 치매, 자폐 예방 효과에 대한 규명이 되었으며, 항산화 효과를 통해 알츠하이머병 (Alzheimer's Disease), 파킨슨병 (Parkinson's Disease), 종양, 심장병과 같은 다른 질병에서의 nuclear factor erythroid 2-related factor 2-Kelch like-ECH associated protein 1-antioxidant response element (Nrf2-Keap1-ARE) signaling pathway를 통한 신경보호 효과를 발휘한다 (Talalay 등, 1988; Itoh 등, 1999; Kraft 등, 2004; Andrea 등, 2013; Xuling 등, 2018; Sestili 등, 2015; Eastwood, 1999; Yang 등, 2015; Paul 등, 2017).

본 연구에서 제주산 십자화과 재배작물 중 브로콜리에서 다량의 설포라판을 추출할 수 있는 기술을 확보하였고, 본 기술은 국내외 독창적이고 독점적 기술로서 충분한 가치를 가진다. 또한 설포라판을 추출하는 근본 기술은 겨자씨를 활용한 고효율 마이로시네이즈 (myrosinase) 활성화에서 비롯한다.

십자화과 채소에는 myrosinase라는 효소가 포함되어 있는데, 이 효소는 십자화과 채소에 존재하는 글루코라파닌 (glucoraphanin)이라는 배당체를 분해하여 항산화, 항암 등이

기능성이 보고된 이소티오시아네이트 (isothiocyanate) 계의 설포라판 (sulforaphane)이라는 물질을 생성한다. 효소 myrosinase를 산업적으로 이용하기 위해서는 구조 및 물리화학적 특성을 구명하는 것은 매우 중요한 일로서, 현재 다양한 십자화과 식물에서 연구가 진행되고 있지만, 우리나라에서 생산되고 있는 겨자씨에 대한 연구보고는 부족한 실정이다. 그런데, 시판되는 myrosinase 정제 효소는 고가인데 야채즙, 음료 등의 생산에는 적용할 수 없는 실정이다. 따라서 경제적인 방법으로 myrosinase 효소를 정제할 수 있는 방법의 개발이 요구되는데 십자화과 식물들로부터 컬럼 방식의 고순도 정제가 아닌 암모늄 설페이트 (ammonium sulfate) 법을 이용하여 myrosinase 효소 함유 조단백질 (crude protein)을 경제적으로 정제할 수 있는 방법을 개발하고자 한다.

그런데, myrosinase 효소에 의해 sulforaphane이 생성되면 십자화과 식물 내의 nucleophile들이 sulforaphane과 화합물 (sulforaphane conjugate)을 이루어 sulforaphane의 수득에 부정적인 영향을 주는 문제가 있기 때문에 십자화과 식물로부터 설포라판을 고수율로 수득 할 수 있는 방법에 대한 개발이 요구된다. 이를 극복하기 위하여 십자화과 식물 분쇄액에 과량의 isothiocyanate 작용기를 포함하는 화합물을 처리하여 십자화과 식물 내의 단백질, 펩타이드 또는 아미노산들을 침전시켜 sulforaphane이 화합물화 되는 것을 원천적으로 막을 수 있다.

따라서 본 연구에서는 경제적인 방법으로 겨자씨의 myrosinase를 분리 및 정제하고 그 효소학적 특성을 조사하였으며, 고효율 추출된 sulforaphane을 추출하는 방법을 통한 향산화, 항충치 등 sulforaphane의 기능성을 입증하기 위하여 실시하였다.

II. 연구사

1. 십자화과 (*Brassicaceae*) 식물의 분류 및 특징

십자화과 (*Brassicaceae*)는 속씨식물 중 두 개의 공식적인 학명을 갖고 있으며, 모든 과명이 공통적으로 갖고 있는 어미인 *-aceae*를 그대로 사용한 *Brassicaceae*와 전통적으로 많이 알려진 *Cruciferae*를 모두 사용한다.

십자화과 식물은 쌍떡잎식물로서, 전 세계적으로 340속, 약 3,350종이 존재한다고 알려져 있으며 (Schmidt 등, 2001), 북반구의 온대에 많이 서식한다. 대표적으로 브로콜리, 양배추, 순무, 유채, 겨자, 케일 등이 있으며 뛰어난 영양과 기능적 가치가 있어 널리 이용되고 있다.

1) 분자 계통학적 분류

전통적으로 광의의 십자화과는 근연의 풍접초과 (*Cleomaceae*)와 카페리스과 (*Capparaceae*)를 포함하고 있는데, APG 분류체계에 의하면 세 개의 과를 모두 독립적으로 인식하고 있다 (Stevens, 2001). 최근 DNA에 의한 분자계통학적 연구에서 십자화과가 장미군 (*Rosids*) 내 아욱군 (*Malvids*)의 십자화목 (*Brassicales*)에 속한다는 것을 밝혔다 (Soltis 등, 1999; Zeng 등, 2014; Cole 등, 2019).

분자 계통학 연구를 통한 많은 노력들이 있었지만, 십자화과 내의 관계가 항상 잘 해결된 것은 아니다. 오래전부터 애티오네마속 (*Aethionema*)이 자매군이라는 사실은 분명했다 (Al-Shehbaz, 2012). Edgar 등 (2014)은 39개의 분류에서 관계를 분석하여 분류체계를 나타냈다 (Fig. 1-1). 또한 목 내에서 가장 근연인 자매군은 풍접초과로 나타났고, 이들 두 분류군에 대한 자매군이 카페리스과이다 (Cole 등, 2019). 풍접초과와 십자화과를 이루는 분계조는 초분성, 위격막 (replum)의 파생형질을 공유한다 (Judd 등, 2016).

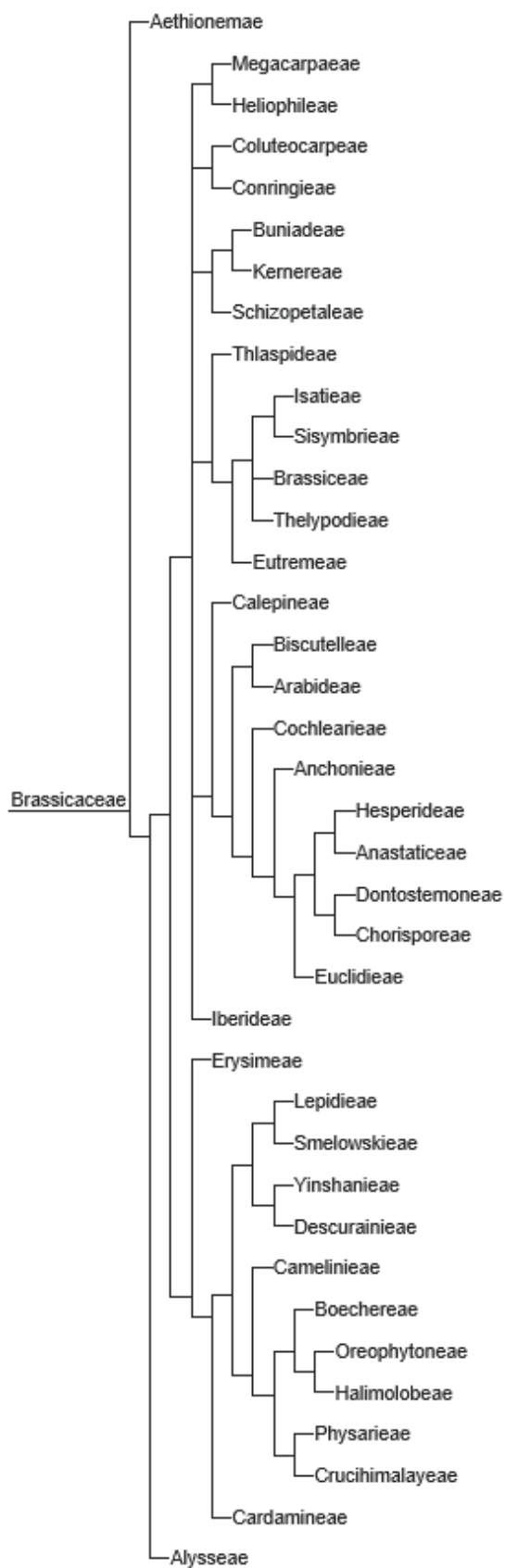


Figure 1-1. Taxonomy of *Brassicales* (Edgar et al., 2014).

2) 형태적 특징

십자화과 식물체는 대부분 초본이지만 교목 또는 관목도 있다. 잎은 보통 호생하고, 홀잎(단엽) 또는 우상열편을 갖는 겹잎(복엽)으로 턱잎은 없다. 대부분 무한꽃차례를 갖고 있고, 포가 없는 총상꽃차례를 이룬다. 꽃은 양성화이고 십자형의 방사상칭이다. 꽃잎과 꽃받침은 각각 4장으로 떨어져 있고, 대부분 6개의 수술이 있는데, 4개는 긴 4장수술(tetradynamous)을 이루고 있고, 2개는 작다. 씨방은 2심피가 합쳐져 있고, 상위이며 측벽태좌를 갖는다. 열매는 대부분 장각과(silique) 또는 단각과(silicle)로 다 익으면 두 개의 열 개선을 따라 터지는데, 얇은 격막인 위격막(replum)이 계속 남아있다(Judd 등, 2016).

3) 글루코시놀레이트(glucosinolate)

십자화과 채소에는 글루코시놀레이트(glucosinolate), 플라보노이드(flavonoid), 페놀(phenol) 화합물 등이 풍부하게 존재하고 있다. 특히 십자화목에 속하는 대부분의 과들이 글루코시놀레이트를 가지고 있으며 십자화과 채소에는 약 30여 종의 글루코시놀레이트를 함유하고 있다(Fenwick 등, 1983). 브로콜리와 양배추를 비롯한 십자화과 채소가 지니고 있는 글루코시놀레이트라는 식물 화학물질(phytochemicals)은 다양한 효능이 있다는 연구 결과들이 발표되고 있다(Liang 등, 2006; Li 등, 2010; Draghici 등, 2013; Shams 등, 2017).

모든 식물 화학물질이 필수 영양소(분)로서 확고한 위치를 차지하고 있지는 않으나 건강에 많은 영향을 끼치고 있다는 과학적 증거들이 계속 보고되고 있기 때문에 식물 화학물질을 포함하는 채소들은 미래에 중요한 먹거리로 등장할 가능성이 높다.

글루코시놀레이트는 생활성 성분으로 십자화과 식물의 2차 대사산물로서 약 120종의 서로 다른 글루코시놀레이트들이 알려져 있으며(Fahey 등, 2001), 트립토판(tryptophan), 메티오닌(methionine), 페닐알라닌(phenylalanine), 타이로신(tyrosine)과 같은 아미노산들로부터 합성된다.

십자화과 채소들을 씹거나 씹거나 소화 시킬 때 가수분해효소인 마이로시네이즈(myrosinase)에 의해 글루코시드(glucoside)인 글루코시놀레이트에서 이소티오시아네이트(isothiocyanate)로 전환된다(Singh 등, 2012). 또한 글루코시놀레이트가 장내로 흡수되면 장내 미생물에 의하여 분해되어 이소티오시아네이트가 형성되기도 한다. 이소티오시아네이트는 전구체인 글루코시놀레이트가 현저한 항암효과가 입증되고 있으며, 발암 물질의 분비 및 발암물질의 유독한 영향을 줄이고 발암물질을 무력화시킴으로써 항암작용을 한다. 또한 과민성 증상을 유발하는 세포의

증식을 억제하고, 강한 항균 작용 및 살충작용이 있는 것으로 알려져 있다 (Singh 등, 2012; Gupta 등, 2014).

글루코시놀레이트와 그 분해효소인 마이로시네이즈는 정상적인 조건에서 물리적으로 분리되어 있으나 조직이 파괴되면 글루코시놀레이트가 마이로시네이즈에 의해 포도당 계열이 분해되면서 이때 남아있는 분자는 티오시아나염 (thiocyanate)인 이소티오시아네이트 또는 나이트릴 (nitrile)로 변화된다 (Cole, 1983; Matusheski 등, 2004).

글루코시놀레이트는 강력한 항암작용을 하는 것으로 알려져 있는데 (Murillo 등, 2001; Le 등, 2003; Minich 등, 2008), 특히 방광암, 유방암, 간암 등에 효과적이다. 글루코시놀레이트는 백혈구와 사이토카인 (cytokine)의 조율 능력이 뛰어나며 유방, 간, 대장, 폐, 위, 식도 등에서 종양이 성장을 억제하는 효소를 가지고 있다. 글루코시놀레이트에 의해 생산되는 인돌-3-카비놀 (indole-3-carbinol)도 강력한 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다.

4) 경제적 이용

십자화과 식물은 많은 식용자원을 포함하고 있는데, 대표적으로 무 (*Raphanus sativus*), 배추 (*Brassica oleracea*), 순무 (*Brassica rapa*) 등이 있다. 또한 유채 (*Brassica napus*)의 종자에서 추출한 기름은 식용유로 사용한다. 관상용 식물들도 많이 포함되어 있으며, 특히 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 현재 유전학, 분자생물학, 유전체학에 있어서 대표적인 모델 식물인데, 약 135 Mbp의 작은 유전체를 갖고 있다 (Schmidt 등, 2001).

2. 브로콜리의 효능 및 특징

브로콜리 (*Brassica oleracea var. italica Plenck*)는 영문으로 broccoli, asparagus broccoli, Italian broccoli, sprouting broccoli 등으로 불리우며 우리나라에서는 겨자과에 속하는 짙은 녹색채소로 ‘녹색꽃양배추’라고도 한다 (김 등, 2003). 또한 타임지가 선정한 세계 10대 푸드 중 하나이기도 하다.

브로콜리는 기원전 6세기경부터 지중해 북부에서 재배된 배추속 식물 (Brassica)의 품종 개량에서 비롯되었다 (Maggioni 등, 2010). 또한 브로콜리는 로마 제국에서 재배된 원시 품종에서 유래한다 (Nonnecke, 1989).

브로콜리는 보통 짙은 녹색의 큰 꽃머리를 가지고 있는데, 연한 녹색인 두꺼운 줄기에서 가지를 뺀 나무와 같은 구조로 배열되어 있다. 브로콜리는 많은 꽃머리가 앞으로 둘러싸여 있고, 배추속 식물의 다른 품종인 콜리플라워 (Cauliflower)를 닮았다. 콜리플라워는 브로콜리의 개량종으로 2017년에 중국과 인도를 합치면 전 세계 브로콜리와 콜리플라워 작물의 73 %가 생산되었다.

1) 품종 및 생리 생태적 특징

일반적으로 재배되는 브로콜리에는 세 종류가 있다. 가장 익숙한 것은 칼라브레세 브로콜리 (Calabrese broccoli)인데, 흔히 간단히 “브로콜리”라고 불리며 이탈리아의 칼라브리아의 이름을 따서 명명되었다. 녹색머리 10~20 cm 정도로 크고 줄기가 굵으며 연중 재배가 가능한 호냉성 채소로 최적 온도 범위가 비교적 낮은 온도에서 품질이 좋고 최대수량을 생산할 수 있는 채소이다.

또한 white sprouting broccoli와 purple sprouting broccoli는 줄기가 얇은 것이 많은 다수의 머리가 있다. Purple broccoli는 유럽과 북미에서 재배된 품종이다. 머리는 콜리플라워 모양이지만, 작은 꽃봉오리로 이루어져 있다. 향상은 아니지만 꽃봉오리의 끝에 보라색 주조를 가지고 있다.

브로콜리의 주요 품종으로는 그린코메트 (Green comet), 보난자, 프리미디움크롭, 미디움, 로열그린, 녹령, 녹풍, 봉록, 그린뷰티 등이 있다. 우리나라에서는 그린코메트와 녹령이 추천 품종으로 재배되고 있는데, 그린코메트는 개장성이고 내서, 내한성이 강하다. 정식 후 약 40일이면 직경이 17 cm, 무게 400 g 내외의 농록색의 꽃봉오리를 수확할 수 있다.

브로콜리 씨앗의 발아 적온은 25 °C 전후이고, 생육 적온은 15~20 °C로 내서성, 내한성이 비교적 강하지만 5 °C 이하의 저온과 25 °C 이상의 고온에서는 생육이 지연된다. 발아 과정은 먼저 수분을 흡수해 껍질이 깨어지고 다음으로 유근이 나오면서 떡잎이 퍼지게 된다. 이때 고온 다습한 환경을 주면 배축이 지나치게 길어져 불량묘가 되기 쉽다. 브로콜리 씨앗은 발아 시 산소 요구량이 많기 때문에 복토를 얇게 하고 제1차 관수는 발아에 지장이 없을 정도만 약하게 관리해 주어야 한다.

2) 국내 생산현황

브로콜리는 우리나라에 도입된 확실한 기록은 없으나 '70년대 말로 추정되며 그 당시에는 주로 시험재배가 이루어졌고, '80년대 초반부터 일부 농가에서 재배되기 시작했다. 그리고 '99년까지는 재배면적이 많이 늘어나고 있지 않지만 '00년도부터는 매년 두 배 가까이 재배면적이 늘어나 '02년도부터는 재배면적의 세배 수준으로 수요에 맞추어 재배면적이 급격히 늘어난 것으로 보인다. '06년도에 전국적으로 1,762 ha가 재배되어 생산량이 40,065 톤으로 제일 많이 생산되었지만 그 후 정체기가 지속되었다. '14년도부터 재배면적이 다시 상승하기 시작하였고, '18년도 현재 2,014 ha가 재배되어 25,101 톤이 생산되었다 (Table 1-1a, 1-1b). 식생활의 변화와 현대인의 고급 건강 채소에 대한 의식이 높아져 현재 소비가 증가 추세에 있으며 생산량 또한 지속적으로 증가할 것으로 판단된다.

브로콜리는 제주도와 강원을 비롯한 충북, 전남, 경기 지방에서 재배되며, 특히 제주도는 74.3 %로 브로콜리 생산면적의 대부분을 차지하고 있다. 그다음으로 강원과 충북은 각각 13.2 %와 7.3 %를 차지하고 있다. 우리나라 브로콜리의 전체 생산량 또한 제주도에서 74.7 %로 가장 많이 생산되고 있고, 그 외 강원과 충북은 각각 9.8 %와 7.2 % 생산된다. 겨울철에는 제주도, 여름철에는 대관령지방에서 많이 재배되며 대부분 시설재배보다는 노지재배로 생산되고 있다 (Table 1-2).

Table 1-1a. Broccoli production in Korea (1999~2008).*

	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08
Area (ha)	14	28	36	150	413	955	1,211	1,762	1,771	1,668
Production (ton)	555	778	1,632	3,075	12,762	22,640	25,483	40,065	38,852	35,562
Production per unit area (kg/10a)	3,964	2,779	4,484	2,050	3,090	2,371	2,104	2,274	2,194	2,132

*2019. The Ministry of Agriculture and Forestry.

Table 1-1b. Broccoli production in Korea (2009~2018).*

	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'17	'18
Area (ha)	1,717	1,639	1,737	1,545	1,692	1,903	1,918	1,992	2,126	2,014
Production (ton)	25,647	27,742	20,706	21,871	26,065	24,232	24,288	30,950	25,847	25,101
Production per unit area (kg/10a)	1,494	1,693	1,192	1,416	1,540	1,273	1,266	1,554	1,216	1,246

*2019. The Ministry of Agriculture and Forestry.

Table 1-2. Broccoli production area in Korea.*

Categories	Total			Field culture			Solution culture		
	Area (ha)	Production per unit area (kg/10a)	Production (ton)	Area (ha)	Production per unit area (kg/10a)	Production (ton)	Area (ha)	Production per unit area (kg/10a)	Production (ton)
Seoul	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Busan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daegu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Incheon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gwangju	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Daejeon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulsan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sejong	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gyeonggi	36	1,645	597	33	1,654	546	3	1,558	51
Gangwon	267	927	2,477	255	902	2,299	12	1,450	178
Chungbuk	148	1,226	1,809	141	1,155	1,633	6	2,871	175
Chungnam	7	1,287	84	4	675	24	3	2,000	60
Jeonbuk	16	1,212	191	12	1,196	141	4	1,259	50
Jeonnam	25	3,184	807	25	3,204	801	0	1,704	6
Gyeongbuk	16	966	157	16	966	157	-	-	-
Gyeongnam	3	796	27	3	796	27	-	-	-
Jeju	1,496	1,267	18,953	1,496	1,267	18,953	-	-	-
The whole country	2,014	1,246	25,101	1,985	1,238	24,580	29	1,794	521

*2019. The Ministry of Agriculture and Forestry.

3) 식품 영양적 가치

브로콜리는 생으로 먹거나 요리해서 먹는다. 브로콜리는 샐러드, 수프, 스투 등 서양 음식에 가장 많이 사용하는 채소 중 하나로 11월부터 4월까지가 채철이지만 요즘은 사철 구별 없이 먹을 수 있다. 브로콜리 생채 식용 부위 100 g 당 비타민 C 29.17 mg, K 182.46 μ g, Ca 29.17 mg, P 195 mg이 들어있다. 그리고 칼륨이 365 mg 정도로 풍부하게 들어있어 고혈압 예방 등 아주 유용한 작물이다 (농촌진흥청, 2013; Table 1-3).

브로콜리는 특히 비타민 C와 비타민 K의 풍부한 공급원이다. 브로콜리는 녹색채 채소 중에서도 영양가가 높으며 비타민 C를 비롯하여 폴리페놀, 카로티노이드, 토코페롤과 같은 건강에 좋은 성분을 다량 함유하고 있다 (Kurilich 등, 1999; Borowski 등, 2008). 비타민 C의 경우 양배추의 4배, 양상추의 27배나 들어있어 미국에서 선정한 채소의 영양적인 평가에서 16개 채소 중 1위를 차지하였다. 비타민 K가 다량 함유된 흔치 않은 식품이기도 하며 한국에서는 살짝 데치거나 삶아서 고추장에 찍어 먹는 것이 흔하다.

또한 브로콜리에는 암세포의 증식을 억제하는 설포라판 (sulforaphane)이라는 물질이 들어있어 항암 채소로도 널리 알려져 있으며 주로 화퇴 (꽃봉오리의 집합체, 식물의 생식기) 부분을 먹으며 식품 영양적으로 가치가 높은 채소이다. 특유의 황을 함유하고 있는 글루코시놀레이트 (glucosinolate) 성분인 이소티오시아네이트 (isothiocyanate)와 sulforaphane 화합물의 함량은 끓이면 줄어들지만, 찌거나 전자레인지 또는 볶으면 오히려 잘 보존된다 (Nugrahedhi 등, 2005). 한편, 브로콜리는 sulforaphane 이외에도 뛰어난 항산화 기능을 가진 β -carotene, rutin, ascorbic acid, selenium, quercetin, glutathione 등을 다량 함유하고 있어서 항암 및 해독 효소의 유도 효과가 크다고 알려져 있다 (Kim 등, 1999; Sok 등, 2003).

브로콜리와 같은 십자화과 채소의 쓴맛은 사람마다 다르지만, 이러한 변화의 기능적인 기반은 아직 정확하게 알려져 있지 않다. Lipchok 등 (2013)은 TAS2R38 유전자가 브로콜리의 쓴맛 인식에 원인이 있을 수 있다고 보고하였다. 또한 isothiocyanate나 polyphenol과 같은 요소들도 쓴맛 인식에 관여할 가능성이 있다고 보고하였다 (Wooding 등, 2010). 어떤 품종에서는 보통 쓴맛을 내는 화합물이 덜 휘발성인 형태로 되어 있다.

Table 1-3. Nutrient composition of broccoli (Per 100 g of edible portion).*

Energy (kcal)	Water (%)	Protein (g)	Fat (g)	Carbohydrate (g)	
32	89.4	3.08	0.2	6.32	
Ash (%)	Vitamin				
	β -carotene (μ g)	Niacin (mg)	C (mg)	K (μ g)	
1	264	1.024	29.17	182.46	
Minerals					
Calcium (mg)	Phosphorus (mg)	Iron (mg)	Sodium (mg)	Potassium (mg)	Selenium (μ g)
39	195	0.8	3	365	0.78

*2013. Rural Development Administration.

4) 브로콜리의 효용성

브로콜리에는 고혈압 위험을 낮추는 칼륨이 100 g 당 370 mg이 들어있다. 또한 임산부의 기형아 출산 위험을 낮추고 빈혈을 예방하는 엽산과 당뇨병 환자에게 유익한 크롬도 함유하고 있다. 한편 열량은 100 g 당 32 kcal로 체중 감량을 하려고 식이요법 중인 사람에게도 좋다 (박 등, 2010).

브로콜리를 대파와 함께 달여 먹으면 초기 감기 증세인 두통과 오한을 줄일 수 있다. 서양인들은 감기 증세가 있으면 브로콜리 샐러드를 먹는다. 또한 브로콜리는 평소 스트레스를 심하게 받거나 아름다운 피부를 원하는 사람에게 추천된다 (박 등, 2010).

서양인들이 브로콜리를 즐겨 먹는 가장 큰 이유는 암에 강한 채소로 인식되어 암 예방에 효과적일 것으로 기대하기 때문이다. 브로콜리에는 베타카로틴, 비타민 C, 비타민 E, 루테인, 셀레늄, 식이섬유 등 항암 물질들이 다량 함유되어 있다. 또한 발암 물질을 해독하는 인돌(indole-3-carbinol)도 들어있다. Indole-3-carbinol은 발암 물질을 해독할 뿐만 아니라 (Park 등, 2010), 항산화와 항동맥경화 효과도 있다.

일본 농수산성이 우리가 흔히 먹는 16종의 채소와 과일이 음식의 탄 부분에 든 발암 물질에 대해 어느 정도 발암 억제력을 갖고 있는지 검사한 결과, 브로콜리는 가지에 이어 두 번째로 발암 억제력이 큰 것으로 나타났다.

Munday 등 (2008)은 브로콜리, 콜리플라워, 양배추 등 브라시카과 채소에 들어있는 화학 물질이 방광암에 걸릴 위험을 50 % 이상 줄여 줄 수 있다고 보고했다. Munday 등 (2008)은 쥐에게 브로콜리 썩의 추출물을 먹인 결과 방광 안의 암세포를 파괴하는 효소가 크게 증가하는 것을 발견하였다.

또한 ITC라고 불리는 항암 합성물은 양배추과 채소에 많이 함유되어 있어 양배추과 채소를 많이 먹는 사람들은 이런 채소를 조금 먹는 사람들보다 방광암에 걸릴 가능성이 현저히 낮은 것으로 알려져 있다 (Tang 등, 2004; Zhao 등, 2007).

Mukherjee 등 (2008)은 브로콜리가 심장병을 예방하는 데 효과가 있다고 보고하였다. 동물 실험에서 한 달 동안 브로콜리 추출물을 먹은 쥐의 심장 기능이 크게 향상되었으며, 산소가 없는 환경하에서 심장 손상이 적은 것으로 나타났다. 특히 브로콜리는 조리하지 않은 상태로 섭취하는 것이 효과가 좋았고, 너무 많이 끓이거나 익히면 효과가 줄어들었다. 브로콜리에 많이 들어있는 셀레늄과 글루코시놀레이트가 심장병을 막아주는 단백질 티오리독신(thioredoxin) 생산에 관여하는 것으로 드러났다 (Mukherjee 등, 2008).

브로콜리를 즐겨 먹으면 폐암, 위암, 대장암, 유방암, 자궁암, 전립선암 등에 걸릴 위험이 낮아진다는 것이 여러 역학조사를 통해 발표되었다. 미국 국립암연구소는 브로콜리와 콜리플라워가 특히 전립선암에 효과가 있다고 보고하였다. 즉 2만 9,000명의 남성을 대상으로 식습관을 추적 조사한 결과 일주일에 2회 먹으면 브로콜리는 전립선암 발병 가능성을 45 %, 콜리플라워는 52 % 정도 낮추는 것으로 나타났다 (Kirsh 등, 2007).

브로콜리와 음식궁합이 잘 맞는 식품에는 아몬드, 오렌지 등이 꼽힌다. 즉 브로콜리 (비타민 C)와 아몬드 (비타민 E)를 함께 먹으면 머리가 좋아지고, 브로콜리에 오렌지를 곁들이면 비타민 C가 강화되어 질병에 대한 저항력이 높아진다.

3. 마이로시네이즈 (myrosinase)

마이로시네이즈 (myrosinase)는 초식동물에 대응하여 식물방어에 관여하는 효소 계열로서 thioglucoside glucohydrolase, sinigrinase, sinigrase라고도 한다. 글루코시드 하이드로레이즈 (glucoside hydrolase) 중 하나인 마이로시네이즈는 보다 보편적인 O-glucosides와 몇 가지 유사성이 있다 (Halkier 등, 2006; Bones 등, 2006).

그러나 마이로시네이즈는 자연에서 싸이오 연결 글루코스 (thio-linked glucose)를 쪼갤 수 있는 유일한 효소이다. 생물학적 기능으로 글루코시놀레이트 (glucosinolate)라고 불리는 화합물에 대해서 가수분해를 촉진한다 (Shikita 등, 2000). 글루코시놀레이트는 마이로시네이즈 (myrosinase)와 반응할 때 매운맛을 내는 자극적인 겨자유를 방출한다. 또한 마이로시네이즈는 비활성형의 글루코라파닌 (glucoraphanin)을 활성형의 설폴라판 (sulforaphane)으로 전환시키는 효소이다.

1) 마이로시네이즈의 활성화

마이로시네이즈는 방어 관련된 효소로서 글루코시놀레이트를 다양한 화합물로 가수분해할 수 있으며, 그 중 일부는 독성이 있다 (Taipalensuu 등, 1996).

마이로시네이즈는 화학반응을 촉진시킨다.



따라서 이 효소의 두 기질은 티오글루코사이드 (thioglucoside)와 물 (H₂O)인 반면, 두 결과물은 설탕 (sugar)과 티올 (thiol)이다. 물이 있을 때 마이로시네이즈는 글루코시놀레이트부터 글루코스 그룹을 분리한다. 그리고 나서 남은 분자는 티오시아네이트 (thiocyanate) 또는 질산염 (nitrile)으로 빠르게 전환되는데, 이들은 식물을 방어하는 역할을 하는 활성 물질들이다.

마이로시네이즈에 의한 글루코시놀레이트의 가수분해는 pH와 같은 다양한 생리적 조건과 특정 보조인자 (cofactor)의 유무에 따라 다양한 결과물을 생산할 수 있다. 모든 알려진 반응은 동일한 초기 단계를 공유하는 것으로 관찰되었다 (Halkier 등, 2006; Fig. 1-2).

먼저 β-thioglucoside 결합은 마이로시네이즈에 의해 갈라져 D-glucose를 방출한다. 그 결과 아글리콘 (aglycone)은 황산염 (sulfate)을 방출하면서 자연적으로 로센 (Lossen)과 같은 재배열이 일어나게 된다. 메커니즘의 마지막 단계는 반응이 일어나는 생리적 조건에 따라 가장 큰 변종의 대상이다. 중성 pH에서 1차 생산물은 이소티오시아테이트 (isothiocyanate)이다. 산성 조건

(pH<3)에서는 철이온이나 에피티오스피커 단백질 (epithiospecifer protein)이 존재하는 경우 대신 질산염 (nitrate)을 형성하려고 한다 (Halkier 등, 2006; Lambrix 등, 2001).

아스코르브산염 (ascorbate)는 마이로시네이즈의 알려진 보조인자로서 글루코시놀레이트 가수분해에서 기본 촉매 역할을 한다 (Burmeister 등, 1997; Burmeister 등, 2000). 예를 들어, 무 (*Raphanus sativus*)에서 분리된 myrosinase는 500 μ M 아스코르브산염이 있을 때 알릴 글루코시놀레이트 (sinigrin) 기질에서 mg당 단백질이 2.06 μ mol/min에서 280 μ mol/min으로 최고속도 (V max)가 증가하는 것을 보여주었다 (Shikita 등, 2000).

글루코시놀레이트 가수분해의 부산물인 황산염 (sulfate)은 마이로시네이즈의 경쟁적 저해제 (competitive inhibitor)로 확인되었다 (Shikita 등, 2000). 또한 마이로시네이즈의 메커니즘을 연구하기 위해 합성된 2-F-2-데옥시벤질글루코시놀레이트 (2-F-2-deoxybenzylglucosinolate)는 활성 부위 Glu 409의 글루타민산 (glutamic acid) 잔류물 중 하나를 포획하여 효소를 억제 하였다 (Bones 등, 2006; Cottaz 등, 1997).

마이로시네이즈는 각각 60-70 kDa의 서브유닛 (subunit)을 가진 이합체 (dimer)로 존재한다 (Björkman 등, 1972; Pessina 등, 1990). 백겨자 (*Sinapis alba*)에서 분리된 마이로시네이즈의 X선 결정학 (X-ray crystallography)에서 두 개의 서브유닛이 아연 원자에 의해 연결되었다는 것이 밝혀졌다 (Burmeister 등, 1997). 염교 (salt bridge), 이중황화교 (disulfide bridge), 수소 결합 (hydrogen bonding), 글리코실화반응 (glycosylation)의 중요성은 효소의 안정성에 기여 하는 것으로 생각되며, 특히 식물이 공격을 받아 심각한 조직 손상이 있을 때 더욱 중요하다 (Halkier 등, 2006). 다수의 β -glucosinolate의 특징은 활성 부위의 촉매 글루탐산염 (glutamate) 잔류물인데, 이 중 2가지는 마이로시네이즈의 글루타민 (glutamine) 잔류물로 대체되었다 (Bones 등, 2006; Henrissat 등, 2000). 아스코르브산염은 글루타민 잔류물의 활성을 대체하는 것으로 나타났다 (Burmeister 등, 2000; Bones 등, 2006; Fig. 1-3).

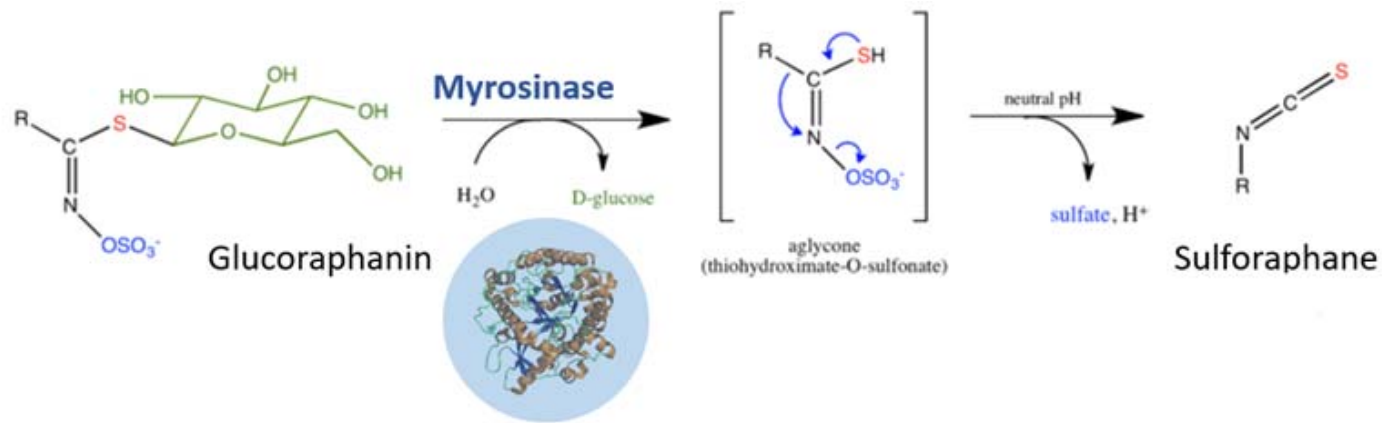


Figure 1-2. Mechanism of glucosinolate hydrolysis by myrosinase.

2) 생물학적 기능

마이로시네이즈와 그 천연 기질인 글루코시놀레이트 (glucosinolate)는 식물의 방어 반응의 일부로 알려져 있다. 식물이 병원균, 곤충이나 다른 초식동물의 공격을 받으면 마이로시네이즈를 사용하여 글루코시놀레이트로 변환하거나 다른 경우라면 양성인 글루코시놀레이트를 이소티오시아네이트 (isothiocyanate), 티오시아네이트 (thiocyanate), 질산염 (nitrile)과 같은 독성물질로 변환한다 (Halkier 등, 2006).

글루코시놀레이트-마이로시네이즈 방어 시스템은 식물 내에서 독특한 방식으로 패키징된다. 식물은 마이로시네이즈 글루코시놀레이트를 구획화하여 저장하는데, 이는 식물이 공격을 받을 때만 후자가 방출되어 활성화된다. 마이로시네이즈는 주로 미로신 세포 (myrosin cell)라고 불리는 특정 이형 세포의 액포에서 미로신 알갱이 (myrosin grain)로 저장되지만 단백질체나 액포로도 보고 되어 왔으며, 세포막에 결합하기 쉬운 세포성 효소로서 보고 되어 왔다 (Lüthy 등, 1984; Andréasson 등, 2001).

글루코시놀레이트는 인접하지만 별도의 “S-cells”에 저장된다 (Koroleva 등, 2000). 식물이 조직 손상을 경험할 때, 마이로시네이즈는 글루코시놀레이트와 접촉하게 되고, 그들의 강력한 향균 형태로 빠르게 활성화시킨다 (Halkier 등, 2006). 이 중 가장 강력한 것은 이소티오시아네이트, 그 다음이 티오시아네이트와 질산염이다 (Gimsing 등, 2009).

마이로시네이즈-글루코시놀레이트 방어 시스템을 진화한 것으로 알려진 식물들은 백겨자 (*Sinapis alba*; Björkman 등, 1972), 큰다닥냉이 (*Lepidium sativum*; Durham 등, 1989), 와사비 (*Wasabia japonica*; Ohtsuru 등, 1979), 무 (*Raphanus sativus*; Iversen 등, 1980; El-Sayed 등, 1995) 뿐만 아니라 십자화과 (*Brassicaceae*)인 황색 겨자 (*Brassica juncea*; Ohtsuru 등, 1972), 유채씨 (*Brassica napus*; Lönnerdal 등, 1973), 그리고 브로콜리, 콜리플라워, 양배추, 청경채, 케일과 같은 일반적인 식이 십자화과 (dietary brassicas) 채소가 있다.

이러한 채소의 쓴맛은 종종 음식 조리과정이나 생것으로 섭취할 때 조직 손상에 따른 글루코시놀레이트의 가수분해에 의한 것이라고 할 수 있다 (Halkier 등, 2006). 파파야 씨 (papaya seed)도 이런 방어의 방법을 쓰지만 과육 자체는 사용하지 않는다 (Nakamura 등, 2007).

마이로시네이즈는 양배추가루 진딧물 (cabbage aphid)에서도 분리되어 있다 (Husebye 등, 2005). 이는 양배추가루 진딧물이 주요 식품소재와 공진화 (coevolution)되었음을 시사한다. 진딧물은 식물에 유사한 방어 전략을 사용한다. 양배추가루 진딧물은 주요 식품소재처럼

토종 마이로시네이즈와 섭취하는 글루코시놀레이트를 구획화한다. 양배추가루 진딧물이 공격을 받아 조직이 손상되면 저장된 글루코시놀레이트가 활성화되어 이소티오시아네이트를 생산하고 포식자가 다른 진딧물을 공격하는 것을 막는다 (Bridges 등, 2002).

3) 마이로시네이즈의 적용

역사적으로 글루코시놀레이트-마이로시네이즈를 함유한 유채와 같은 식물은 가축에게 독성이 있는 것으로 알려졌었기 때문에 동물 사료에 함유된 유채는 글루코시놀레이트 함량을 최소화하기 위해 의도적으로 육종되었다 (Brabban 등, 1994). 글루코시놀레이트-마이로시네이즈 시스템은 농작물을 해충으로부터 보호하기 위한 생물학적 효소로 조사 되어 왔다. 강력한 글루코시놀레이트 가수분해 제품 (GHP)을 농작물에 분사하여 초식을 억제할 수 있다. 해충에 대한 저항력을 강화하기 위한 또 다른 수단으로 글루코시놀레이트-마이로시네이즈 시스템을 도입하기 위해 유전공학의 기술을 사용하는 것이다 (Gimsing 등, 2009).

글루코시놀레이트 가수분해의 1차 산물인 이소티오시아네이트가 갑상선의 요오드 흡수를 막아 갑상선종 (goiter)을 일으키는 것으로 알려져 왔다 (Bones 등, 1996). 고농도의 이소티오시아네이트도 간독성, 즉 간 손상을 일으키는 것으로 보고되었다 (Shikita 등, 2000). 또한 Chu 등(2010)에 따르면 매일 1.5 kg (2.2~3.3 lb)의 생 청경채를 먹은 중국 여성이 미로신 효소의 과다 섭취로 인해 갑상선 기능 저하증이 심해졌다고 보고된 바 있다. 그러나 최근의 연구에서 글루코시놀레이트가 함유된 식이 십자화과 채소가 많은 식단이 심장병, 당뇨병, 암의 위험성을 낮추는 것과 관련이 있다는 것을 보여주었다 (Halkier 등, 2006; Hayes 등, 2008).

이소티오시아네이트가 발암 물질의 생체 공학 대사에 관여하는 phase II 해독 효소를 유도하는 것으로 나타났다 (Ahn 등, 2010). 마이로시네이즈와 같은 효소가 인간의 장내 세균 (gut micorobiome)의 구성 요소에도 존재할 수 있다는 증거들이 증가하고 있다. 많은 효소들과 마찬가지로 마이로시네이즈는 고온에서 변성되어 조리 시 활성을 잃게 되지만, 글루코시놀레이트의 가수분해를 촉진할 수 있는 장내 미생물은 섭취한 글루코시놀레이트를 보다 강력한 형태로 활성화할 수 있을 것이다 (Cheng 등, 2004; Elfoul 등, 2001).

4. 이소티오시아네이트(isothiocyanate)

브로콜리, 양배추, 케일과 같은 십자화과 채소는 글루코시놀레이트 (glucosinolate)라 불리는 황 함유 화합물의 풍부한 공급원이다. 이소티오시아네이트 (isothiocyanate)는 생물학적으로 글루코시놀레이트의 활성화 가수분해 산물이다. 십자화과 채소는 다양한 글루코시놀레이트를 함유하고 있으며, 각각은 가수분해 시 다른 이소티오시아네이트를 형성한다 (Fahey 등, 2001; Fig. 1-4).

예를 들어 브로콜리는 설포라판의 글루코시놀레이트 전구체인 글루코라파닌 (glucoraphanin)과 알릴 (allyl) 이소티오시아네이트 (AITC)의 글루코시놀레이트 전구체인 시니그린 (sinigrin)의 좋은 공급원이다 (Zhang, 2004). 물냉이 (watercress)는 페네틸 이소티오시아네이트 (phenethyl isothiocyanate; PEITC)의 전구체인 글루코나스투르티인 (gluconasturtiin; GST)의 풍부한 공급원이며, 큰다닥냉이 (garden cress)는 벤질 이소티오시아네이트 (benzyl isothiocyanate; BITC)의 전구체인 글루코트로페올린 (glucotropaeolin)이 풍부하다. 글루코시놀레이트와 이소티오시아네이트가 풍부한 채소의 암 예방에 대해 관심을 갖고 연구를 진행하고 있다 (Hecht, 1995).

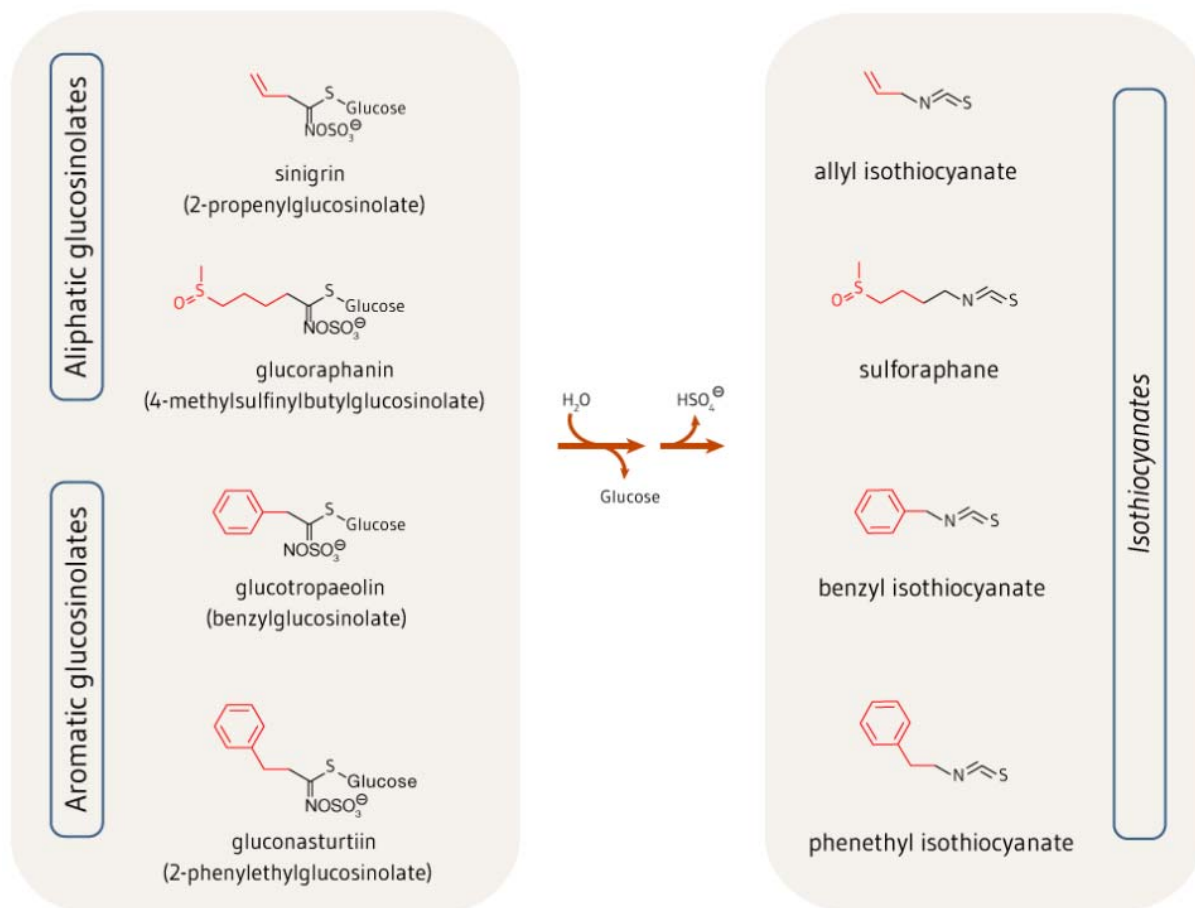


Figure 1-4. Chemical Structures of Some Glucosinolates and their Isothiocyanate Derivatives (Fahey et al., 2001).

1) 대사작용 및 생물학적 이용도

(1) 대사작용

마이로시네이즈 (β -thioglucosidase)라는 효소에 의해 축매되는 글루코시놀레이트의 가수분해효소는 티오시아네이트 (thiocyanate), 이소티오시아네이트 (isothiocyanate), 인돌 (indole), oxazolidine-2-thiones (예: goitrin), 에피티오나이트릴 (epithionitrile), 나이트릴 (nitrile)과 같은 분해 화합물의 형성으로 이어진다.

온전한 식물 세포에서 마이로시네이즈 (myrosinase)는 물리적으로 글루코시놀레이트로부터 분리된다. 그러나 식물 세포가 손상되면 마이로시네이즈가 분비되어 글루코시놀레이트와 접촉하여 자극적인 향과 매운맛을 주는 반응성이 높은 대사물로의 전환을 촉진한다. 마찬가지로, 조리과정에서 십자화과 채소를 썰면 글루코시놀레이트가 마이로시네이즈에 의해 빠르게 가수분해되고 대사물이 생성되어 십이지장 (proximal intestine)에 흡수된다. 이와는 대조적으로 섭취하기 전에 십자화과 채소를 조리하는 것은 마이로시네이즈를 무효화시켜 글루코시놀레이트의 분해를 방지한다. 가벼운 조리 (5분 미만의 가벼운 증기)로 하면 마이로시네이즈 일부를 보존하고 이소티오시아네이트의 전환을 허용하게 된다. 온전한 글루코시놀레이트의 일부분은 소장 에 흡수될 수 있으나 대부분은 대장에 이른다 (Barba 등, 2016). 결장에서는 마이크로바이오타 (microbiota)가 생성하는 마이로시네이즈가 pH와 보조인자 (cofactor)의 유무에 따라 글루코시놀레이트로부터 광범위한 대사물 생성을 촉진시킬 수 있다 (Barba 등, 2016; Luang-In 등, 2016).

중성 pH에서 글루코시놀레이트의 가수분해는 고유한 이소티오시아네이트를 형성한다 (Fig. 1-4). 예를 들어, 시니그린 (sinigrin), 글루코라파닌 (glucoraphanin), 글루코트로페올린 (glucotropaeolin), 글루코나스투르티인 (gluconasturtiin)은 각각 AITC, 설포라판, BITC, PEITC의 글루코시놀레이트 전구체이다 (Fig 1-4). 일단 흡수되면 글루코시놀레이트에서 유래한 이소티오시아네이트 (설포라판과 유사)는 간에서 글루타치온 S-전이효소 (glutathion S-transferase; GST)로 알려진 phase II 해독 효소에 의해 글루타치온에 즉시 결합되고, 이후 순차적으로 메르캡투르산 (mercapturic acid) 경로에서 대사된다 (Fig. 1-5). 이러한 메커니즘은 이소티오시아네이트의 용해도를 증가시켜 소변의 빠른 배설을 촉진시키는 것을 의미한다. 이소티오시아네이트의 모델로서 설포라판을 사용하여 그 대사물인 설포라판-글루타치온 (sulforaphane-glutathione), 설포라판-시스테인-글리신 (sulforaphane-cysteine-glycine), 설포라판-시스테인 (sulforaphane-cysteine), 디티오카바메이트 (dithiocarbamate)로 알려진 설포라판 N-acetylcysteine이 궁극적으로 소변으로 배설된다는 것이 입증되었다 (Barba 등, 2016; Fig. 1-5).

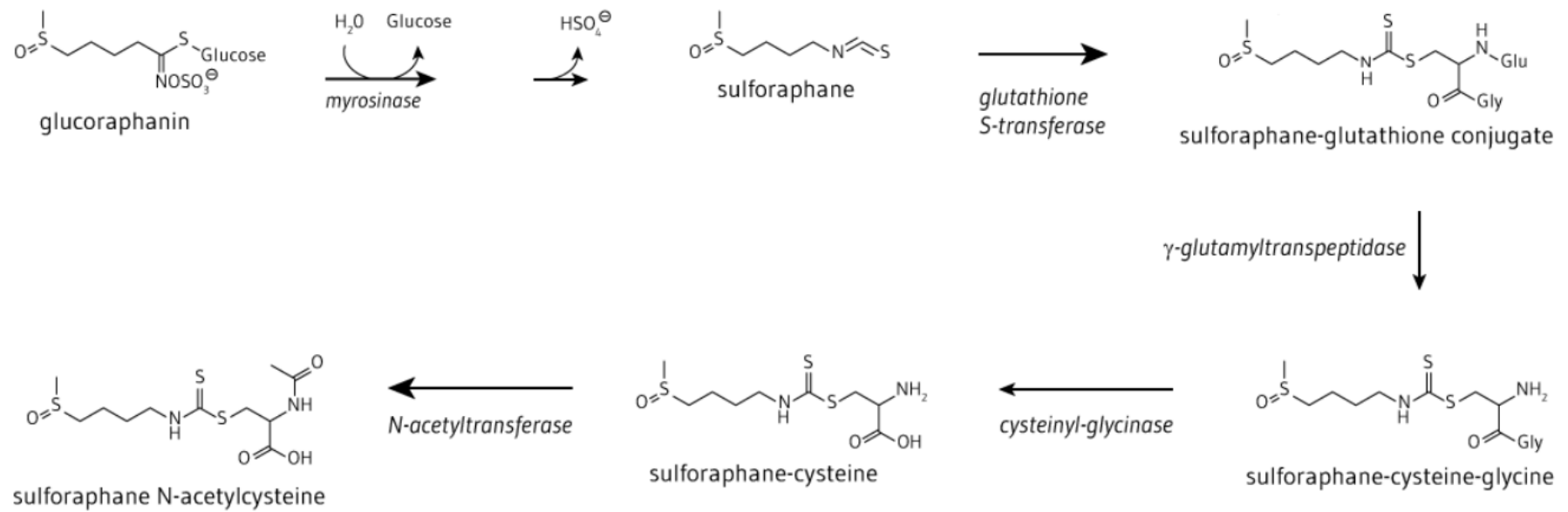


Figure 1-5. Metabolism of glucoraphanin via the mercapturic acid pathway (Barba et al., 2016).

(2) 생물학적 이용도

십자화과 채소에서 글루코시놀레이트의 성분과 함량은 비교적 안정적이지만 종과 속에 따라 달라지며, 식물 재배 및 수확 후 저장 조건과 조리과정에 따라 달라질 수가 있다 (Fahey 등, 2012; Verkerk 등, 2009). 대부분의 십자화과 채소는 조리하고 섭취하기 때문에 식물의 마이로시네이즈가 아닌 장내 세균 마이로시네이즈가 글루코시놀레이트 분해의 초기 단계를 담당한다. 45개 건강한 피험자 (healthy subject)를 대상으로 한 급식 연구에서 24 시간 동안 글루코시놀레이트 (그 중 85 %가 글루코라파닌)에서 디티오카바메이트 (dithiocarbamate)로의 평균 전환율은 약 12 %로 추정됐으며, 참가자들 간 편차 범위가 1.1~40.7 %로 컸다 (Fahey 등, 2012). 반면 섭취된 이소티오시아네이트의 70~75 %가 디티오카바메이트에 대사되는 것으로 나타났다. 따라서 조리된 십자화과 채소의 섭취에 이어 장내 마이로시네이즈에 의한 글루코시놀레이트의 이소티오시아네이트로의 전환은 디티오카바메이트 발생에 있어 제한적인 단계로 보인다 (Fahey 등, 2012). 그러나 Li 등 (2011)은 글루코시놀레이트를 대사하는 각각의 능력 차이는 장내 미생물 조성의 차이와 관련이 없다고 보고했다.

2) 생물학적 활성

(1) 항산화능 (Antioxidant activity)

다수의 이소티오시아네이트 (isothiocyanate), 특히 설포라판 (sulforaphane)은 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-dependent pathway의 활성화를 통해 항산화 효소의 발현을 유도하는 것으로 나타났다 (Hu 등, 2006; Wagner 등, 2012). 간단히 말해서, Nrf2는 세포질 (cytosol)에서 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 결합 되는 전사 인자이다. 이소티오시아네이트는 Keap1의 술프하이드릴 (sulfhydryl) 잔류물과 반응하여 Nrf2의 방출을 유도할 수 있다. 그런 다음 Nrf2는 핵으로 변환하여 항산화/해독 효소와 스캐빈저 (scavenger)에 대한 유전자 코딩의 촉진자 (promoter)에 위치한 산화 방지제 반응 성분 (antioxidant response element; ARE)에 결합할 수 있다. Nrf2/ARE-dependent gene은 글루타치온 S-전이효소 (glutathione S-transferase; GST), 티오레독신 (thioredoxin), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) 및 헴산화효소 (heme oxygenase 1; HO-1)를 포함한 항산화 반응의 여러 매개체에 대해서 코딩한다 (Bryan 등, 2013).

수많은 동물 모델에서 설포라판은 Nrf2/ARE-dependent pathway를 활성화하여 여러 조직과 장기에 보호 효과를 발휘하는 것으로 나타났다 (Guerrero-Beltran 등, 2012). 예를 들어 설포라판은 Nrf2 핵 변환을 증가시키고 HO-1과 NQO-1의 발현을 upregulation 하여 조영제 (contrast agent)를 유도한 쥐에서 신장 손상을 줄여주었다 (Zhao 등, 2016). 그리고 설포라판에 의한 Nrf2 pathway의 upregulation은 제2형 당뇨병의 마우스 모델에서 산화성 손상에 의한 혈관내피세포 (vascular endothelial cell; VEC) 손상을 감소시킨다 (Wang 등, 2014). 간 허혈 재관류 손상 (hepatic ischemia reperfusion injury)이 있는 토끼 모델에서 저산소 간으로는 산소 공급 회복에 의해 세포 손상이 발생하였고, 설포라판을 이용한 전처리를 글루타치온 (GSH), 항산화 효소, 과산화 디스무타아제 (superoxide dismutase; SOD), GSX 과산화효소 (GSX peroxidase; GPx)의 감소를 제한하였다. 또한 설포라판은 Nrf2, NQO-1, HO-1등의 발현을 upregulation 하고 허혈성 손상 (ischemic death)과 간세포의 사멸 (apoptosis)을 감소시켰다 (Chi 등, 2015).

브로콜리 새싹 파쇄액 형태에서 구강 설포라판은 섭취 후 2시간 이내에 NQO-1과 상기도 (upper airway)의 HO-1의 발현을 증가시켰다 (Riedl 등, 2009). 그러나 최근 만성폐쇄성폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) 환자를 대상으로 한 임상시험에서 4주간

설폰라판 경구 투여는 폐포 대식세포 (alveolar macrophage; AM), 기관지 상피세포 (bronchial epithelial cell) 또는 말초혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 등에서 Nrf2, NQO-1, HO-1의 발현을 유도하지 못했다 (Wise 등, 2016).

(2) 항염증능 (Anti-inflammatory activity)

설폰라판 (sulforaphane)의 치료적 잠재성은 pro-inflammatory pathway를 타겟으로 하는 능력과 연관되어 있다. 설폰라판은 급성췌장염 마우스 모델에서 Nrf2 유도 항산화 효소를 자극해 췌장 손상을 약화 시키는 것으로 밝혀졌다 (Dong 등, 2016). 설폰라판은 췌장 샘 세포 (pancreatic acinar cell)에서 pro-inflammatory 전사인자(NF)- κ B의 핵내 이동 (nuclear translocation)을 현저히 감소시켜 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α), 인터류킨-1 (interleukin-1; IL-1 β), IL-6와 같은 pro-inflammatory 전달물질에 대해 암호화하는 NF- κ B 표적 유전자의 발현을 축소시켰다 (Dong 등, 2016). 설폰라판은 NF- κ B pathway의 억제를 통해 효소 cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E (PGE) synthase, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등 염증 반응의 다른 전달물질도 대상으로 한다.

설폰라판은 Nrf2/ARE pathway를 통해 NF- κ B, IL-6, TNF- α , COX-2의 발현을 감소시킬 뿐만 아니라 질산화물 (nitric oxide; NO), PGE2의 생산을 감소시켜 지질다당질 (lipopolysaccharide; LPS) 유래 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratory distress syndrome; ARDS)을 가진 생쥐의 폐에서 항염증 효과를 나타냈다 (Qi 등, 2016). 그리고 다른 이소티오시아네이트는 NF- κ B 억제제, I κ B의 감소, NF- κ B의 핵내 이동, NF- κ B의 체외 (in vitro) 또는 배양세포의 전사 활성 (transcriptional activity)의 저하를 방지하는 것으로 나타났으며 (Kumar 등, 2015), 이는 모두 염증 반응의 저하로 이어진다.

(3) 항암능 (Anticancer activity)

이소티오시아네이트에 의한 Nrf2 및 NF- κ B 신호전달체계의 조절은 특히 암의 발생과 진행에 있어 산화 스트레스와 염증 모두 유의미한 원인이기 때문에 암 예방과 관련이 있다.

생체내 변화 (biotransformation) 효소는 약물, 독소, 발암 물질을 포함한 다양한 화학물질의 물질대사와 제거에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 phase II 생체 내 변화 효소에 의해 촉매되는 반응에 대비하여 phase I 대사 효소는 소수성 (지방 용해성) 화합물의 반응도를 증가시키는 작용을 촉진한다. phase II 효소에 의해 촉매 되는 반응은 용해도를 증가시키고, 신체에서 화합물의 제거를 촉진한다 (Lampe 등, 2002).

(4) 항균력 (Antibacterial activity)

헬리코박터균 (*Helicobacter pylori*)에 의한 세균감염은 펩틱 위궤양 (peptic ulcer disease)과 위암 (gastric cancer)의 위험이 현저하게 증가하는 것과 관련이 있다. 시험관 및 조직 배양에서 정제된 설포라판은 항생제 내성 균주를 포함한 여러 종류의 헬리코박터균들을 죽이고, 성장을 억제하였다 (Fahey 등, 2002). Haristoy 등 (2003)은 헬리코박터균 감염의 동물 모델에서 5일간 설포라판 투여로 면역시스템이 손상된 생쥐에 인간의 위 조직이 이식된 11번의 이종이식 중 8번 헬리코박터균을 퇴치하였다고 보고하였다. 그리고 다른 헬리코박터균 감염 마우스 모델에서는 브로콜리 새싹을 먹인 생쥐의 위염과 감염을 줄이기 위해 기능적인 Nrf2 pathway가 필요한 것으로 나타났다 (Yanaka 등, 2009).

소규모 임상시험에서 글루코라파닌 (glucoraphanin)이 풍부한 브로콜리 새싹을 1주일 동안 최대 56 g/일 (2 oz/day) 섭취한 것은 위염 환자 9명 중 3명만 헬리코박터균 박멸과 관련이 있었다 (Galan 등, 2004). 또한 다른 연구에서는 알팔파 새싹 (alfalfa sprout)을 섭취한 사람에 비해 글루코라파닌이 풍부한 브로콜리 새싹을 2개월 동안 매일 70 g (2~3 인분/일)씩 섭취하면 염증 및 감염 징후가 현저하게 줄어들었다 (Yanaka 등, 2009). 그러나 브로콜리 새싹을 먹은 참가자의 글루코라파닌이 설포라판으로 전환된 정도는 측정되지 않았다.

3) 질병 예방

이소티오시아네이트는 십자화과 채소 소비와 관련된 잠재적인 항암 및 심혈관에 유익하고 중요한 역할을 한다고 여겨진다 (Bai 등, 2015; Higdon 등, 2007). 글루타치온 S-전이효소 (glutathion S-transferase; GST)에 대한 유전자 코딩 시퀀스 (sequence)의 유전적 변화는 GST의 활동에 영향을 미칠 수 있다. 이런 변화는 인간에게서 확인되었고, 구체적으로는 GSTM1과 GSTT1 유전자의 null 변이형은 large deletion를 포함하며 GSTM1-null 또는 GSTT1-null 유전자의 2개 복제본을 물려받은 각각의 해당 GST 효소를 생산할 수 없다 (Coles 등, 2003). Seow 등 (1998)은 GST 활성이 감소하면 이소티오시아네이트의 분비 속도가 느려져 십자화과 채소 섭취 후 이소티오시아네이트에 대한 조직 노출을 증가시킬 수 있다고 제안하였다. 또한 GST는 발암 물질과 같이 잠재적으로 유해한 물질을 감식하는데 작용하고 있어 GST 활성이 감소된 개체는 암에 더 취약할 수 있음을 시사한다 (Economopoulos 등, 2010; Egner 등, 2014; Yuan 등, 2016).

4) 식품 소재

(1) 십자화과 채소

청경채 (bok choy), 브로콜리 (broccoli), 방울다다기양배추 (Brussels sprout), 배추 (cabbage), 콜리플라워 (cauliflower), 고추냉이 (horseradish), 케일 (kale), 콜라비 (kohlrabi), 겨자 (mustard), 무 (radish), 루타바가 (rutabaga), 순무 (turnip), 물냉이 (watercress)와 같은 십자화과 채소는 이소티오시아네이트의 전구체인 글루코시놀레이트의 풍부한 공급원이다. 글루코시놀레이트는 다른 식물의 화학물질과는 달리 십자화과 채소의 일반적인 소비되는 부분에 비교적 높은 농도로 존재한다. 예를 들어 생브로콜리 1/2 컵은 총 글루코시놀레이트 25 mg 이상을 제공할 수 있다. 선별된 십자화과 채소의 글루코시놀레이트 함량은 Table 1-4에 제시하였다 (McNaughton 등, 2003). 십자화과 채소의 글루코시놀레이트 성분과 함량은 비교적 안정적이지만 종과 속에 따라서 달라지며, 조리 가공뿐만 아니라 식물 재배 및 수확 후 저장 조건에 따라 크게 달라질 수 있다는 점에 유의해야 한다.

Ishida 등 (2014)은 현재 잠재적인 항암 특성에 대해 연구되고 있는 일부 이소티오시아네이트의 비교적 좋은 공급원이 되는 채소를 나열하였다 (Table 1-5). 식품에서 글루코시놀레이트로부터 형성되는 이소티오시아네이트의 양은 가변적이며 부분적으로 식품 가공과

조리에 따라 달라진다. 최근의 연구에 따르면 미국에서 흔히 소비되는 9가지 종류의 십자화과 채소 (브로콜리, 양배추, 콜리플라워, 방울다다기양배추, 케일, 콜라드그린, 겨자잎, 순무우 잎)의 73개 표본에서 총 이소티오시아네이트 함량을 조사한 결과 평균 16.2 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ 의 습증량을 보고했으며, 채소 전체에서 이소티오시아네이트 수율의 41배 차이가 났다. 이소티오시아네이트 수율의 최저 평균치는 생콜리플라워가 1.5 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ 로 나타났으며, 생 겨자잎의 수율이 61.3 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ 로 가장 높았다 (Tang 등, 2013).

(2) 브로콜리 새싹과 보충제

설포라판의 전구체인 글루코라파닌의 양은 브로콜리 씨앗이 싹을 틔우고 완전히 자란 식물로 되면서 다소 일정하게 된다. 따라서 3일 된 브로콜리 새싹은 글루코라파닌의 집중된 공급원으로, 완전히 자란 브로콜리보다 10배에서 100배 더 많은 글루코라파닌을 함유하고 있다 (Fahey 등, 1997). 브로콜리 새싹은 1-oz당 글루코라파닌 (설포라판 글루코시놀레이트라고도 함)이 최소 73 mg 이상 함유된 것으로 인증된 일부 건강식품 및 식료품점에서 구입할 수 있다.

브로콜리 새싹, 브로콜리 및 다른 십자화과 채소의 추출물이 함유된 건강보조식품은 처방전 없이 구입할 수 있다. 일부 제품은 글루코시놀레이트 또는 설포라판의 최소량을 함유하도록 표준화되어 있다. 다만 이소티오시아네이트의 생체이용성은 신선한 브로콜리 새싹을 섭취할 때보다 마이로시네이즈가 없는 브로콜리 보충제를 섭취할 경우 훨씬 낮은 것으로 나타났다. 또한 설포라판 대사물질의 최고 농도는 신선한 브로콜리와 보충제 섭취에 비해 혈장과 소변에서 각각 8배와 5배 더 높은 것으로 나타났다 (Clarke 등, 2011). 흥미롭게도 브로콜리 새싹 소비자의 말초혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC)에서의 총 HDAC 활성도는 보충제를 섭취한 소비자의 PBMC보다 현저히 낮은 것으로 보고되었다 (Clarke 등, 2011).

Table 1-4. Glucosinolate Content of Selected Cruciferous Vegetables (McNaughton et al., 2003).

Food (raw)	Serving	Total Glucosinolates (mg)
Brussels sprouts	1/2 cup (44 g)	104
Garden cress	1/2 cup (25 g)	98
Mustard greens	1/2 cup, chopped (28 g)	79
Turnip	1/2 cup, cubes (65 g)	60
Cabbage, savoy	1/2 cup, chopped (45 g)	35
Kale	1 cup, chopped (67 g)	67
Watercress	1 cup, chopped (34 g)	32
Kohlrabi	1/2 cup, chopped (67 g)	31
Cabbage, red	1/2 cup, chopped (45 g)	29
Broccoli	1/2 cup, chopped (44 g)	27
Horseradish	1 tablespoon (15 g)	24
Cauliflower	1/2 cup, chopped (50 g)	22
Bok choy (pak choi)	1/2 cup, chopped (35 g)	19

Table 1-5. Food sources of selected isothiocyanates and their glucosinolate precursors (Ishida et al., 2014).

Isothiocyanate	Glucosinolate (Precursor)	Food sources
Allyl isothiocyanate (AITC)	Sinigrin	broccoli, brussels sprouts, cabbage, horseradish, kohlrabi, mustard, radish
Benzyl isothiocyanate (BITC)	Glucotropaeolin	cabbage, garden cress, indian cress
Phenethyl isothiocyanate (PEITC)	Gluconasturtiin	watercress
Sulforaphane	Glucoraphanin	broccoli, brussels sprouts, cabbage, cauliflower, kale

5) 안전성(safety)

(1) 역효과

인간에게 이소티오시아네이트의 심각한 부작용은 보고되지 않았다. 대다수의 동물 연구에서 이소티오시아네이트가 화학적 발암물질에 앞서 주어진 경우 암의 발달을 억제한다는 사실을 밝혀냈다. 그러나 화학물질에 의해 암이 시작된 후 PEITC나 BITC의 매우 많은 양을 섭취하였을 때 (인간의 평균 이소티오시아네이트의 섭취량의 25~300배), 쥐의 방광암을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다 (Okazaki 등, 2003). 적어도 하나의 전향 코호트 연구 (prospective cohort study)에서 십자화과 채소가 남성의 방광암 (Urinary Bladder Cancer; UBC) 위험과 반비례한다는 것을 발견한 이후로 이러한 발견이 인간의 방광암과 관련성은 명확하지 않다 (Michaud 등, 1999). 설치류에서 보고된 다른 잠재적 독성 영향은 인간에서의 관찰에 의해 확증되지 않았다 (Kumar 등, 2015).

(2) 임신과 수유

십자화과 채소에서 글루코시놀레이트를 과량 섭취한 것이 임신이나 수유 중에 부작용이 있는 것으로 알려져 있지 않지만 인간의 임신이나 수유 중에 글루코시놀레이트 또는 이소티오시아네이트를 과량 함유한 정제 이소티오시아네이트나 보충제의 안전성에 관한 정보는 없다.

(3) 약물 상호작용

이소티오시아네이트는 어떤 약물이나 약과도 상호작용을 하지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 이소티오시아네이트가 cytochrome P450 (CYP) 효소 계열의 다양한 동형 단백질 (isoform)을 억제할 가능성은 CYP 기질인 약물과의 상호작용에 대한 가능성을 높인다.

이소티오시아네이트는 *in vitro* 및 동물 모델에서 볼 수 있듯이 항암제에 대한 암세포를 민감하게 만들거나 약물 세포독성을 증가시킬 수 있다. 그러나 암 치료에서 이소티오시아네이트의 이러한 잠재적인 이점은 임상 실험에서 발견되지 않았다 (Minarini 등, 2014).

5. 설포라판 (sulforaphane)

설포라판 (sulforaphane)은 유기황 화합물의 이소티오시아네이트 (isothiocyanate)계에 속하는 성분으로 브로콜리, 양배추 등 십자화과 채소에서 얻을 수 있다. 마이로시네이즈 (myrosinase) 효소가 식물에 손상을 입었을 때 (chewing 등) 글루코시놀레이트인 글루코라파닌 (glucoraphanin)을 설포라판으로 변형시켜 두 화합물이 섞이고 반응할 수 있게 하는 방식으로 생산된다. 브로콜리와 콜리플라워의 어린 새싹은 특히 글루코라파닌이 풍부하다.

십자화과 채소에 많이 함유된 생리활성 물질들이 발암에 대해서 높은 방어 효과를 나타낸다고 알려져 있으며, 특히 브로콜리의 대표적인 기능성 물질인 sulforaphane (S-methylsulfinylbutyl isothiocyanate)은 십자화과 채소의 조직 마쇄 시 전구물질인 glucoraphanin이 myrosinase의 활성화에 의해 분해됨으로써 sulforaphane nitrile과 함께 생성된다 (Cole, 1983; Matusheski 등, 2004; Fig. 1-6).

Sulforaphane은 신체의 자연적 항암 기능을 강화해 주고 암 발생의 위험성을 줄여주는 물질로 알려져 있으며, 위암이나 위궤양의 원인인 *helicobacter pylori*균을 죽이는 효과도 있다. 또한 암 유발인자를 분해하여 소변으로 배출시키는 탁월한 능력이 있으며 강력한 포유류 제독 효소 활성화 유도자로서 설치류에서 초기 암 성장을 억제하는 등 그 효과가 많이 입증되고 있다 (Kim, 1997).

Talalay 등 (1988)은 브로콜리 추출물에서 항암유도 활동이 큰 것을 관찰하였고, 관련 물질은 sulforaphane으로 알려진 isothiocyanate임을 확인하였으며 sulforaphane 동족체의 활성을 검토한 결과 강한 활성을 나타내는 것은 (-)-1-isothiocyanate-(4R)-(methylsulfinyl)butane[CH₃-SO-(CH₂)₄-NCS]이라고 보고하였다. 또한 sulforaphane은 monofunctional inducer로서 다른 anticarcinogenic isothiocyanates와 마찬가지로 phase II 효소만을 선택적으로 유도 시키는데 이 효소는 자유 라디칼과 같은 발암 화학물질을 공격해서 이들이 DNA를 손상시키는 것을 저해하게 만든다. DNA가 손상을 입을 경우 암이 유발될 수 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. Zhang 등 (1992)은 sulfide 및 sulfone 유도체들도 쥐의 장기에서 quinone reductase와 glutathione transferase의 활성을 유도 시킨다고 보고하였고, Talalay 등 (1988)은 sulforaphane에 의한 항발암해독효소의 유도가 항발암해독활동 (anticarcinogenic action)에 중요하다고 보고하였다.

설포라판은 브로콜리 새싹에서 발생하는데, 이는 십자화과 채소 중 설포라판의 전구체인 글루코라파닌 농도가 가장 높다 (Houghyon 등, 2013).

III. 십자화과 식물 유래의 myrosinase 추출 최적화

1. ABSTRACT

This study is mainly concerned with a method to refine myrosinase enzyme from a cruciferous plant; more in detail, the research was conducted to economically refine myrosinase by taking advantage of then ammonium sulfate (AS) method from a cruciferous plant. Commercially available myrosinase refining enzyme (thioglucosidase, CAT number T4528) costs more than 4,000 Korean *won*, which makes it impossible to apply the method to producing vegetable juices, beverages, etc. (the definition of 1 unit: the amount of enzyme produced by the decomposition of 1.0 μmol from sinigrin under a condition of pH 6.0 at 25 $^{\circ}\text{C}$). Therefore, the method to refine the myrosinase needs developing in an economical way; the results are as follows:

- 1) A method to refine myrosinase by using the ammonium sulfate method (AS), not column type high refinement, has been developed from broccoli, a cruciferous vegetable. After precipitating and removing the protein by treating 50~60 % (w/v) AS of cruciferous vegetables, crude protein was precipitated and fractionated including myrosinase. When myrosinase enzyme activity was measured after obtaining the crude protein fraction, and when crude protein from Sri Lanka mustard seed was applied with glucoraphanin (GR) of 66.6 mg per ℓ , 44.02 % of GR was converted to sulforaphane (SFN) and the result showed about higher activity of 2.6 % compared with myrosinase purchased from Sigma-Aldrich (the column type refinement method)
- 2) Compared with the column type refinement method, the enzyme titer of myrosinase was proved to be excellent. In order to confirm the advantage the two-tier AS refinement method has over one-tier refinement, refinement yields of the control group of 55-80 %, which used 55 % of AS in the first step, and in the second

stage, used 80 % of AS were compared with those of 80 % of AS in its counterpart. SFN content of broccoli treated with 55-80 % compared with that of broccoli treated with 80 % of AS was shown to be twice higher. It was found that from this result, the two-tier AS processing method was much higher than one-tier AS treatment method.

- 3) The refinement and activation of myrosinase was measured in accordance with the inactivation of ESP (epithiospecifier proteins). First, by treating 55 % (w/v) of AS on pulverized mustard seeds, and precipitating and removing the protein, AS of 80 % (w/v) was treated and crude protein containing myrosinase was obtained by precipitating crude protein. In the following process, the crude protein fraction containing myrosinase obtained to inactivate ESP protein was dissolved by the buffer and heat-treated at 60 °C for 10 minutes (the control group). On the control group, at this stage, heat was not treated to inactivate ESP protein. When undergoing inactivation the produced content of SFN was 4,200 mg/dry kg, which showed a higher rate of 55 % compared with the SFN content of 2,700 mg/dry kg of the content in the subject group. From this result it draws a conclusion that the activation can enhance the enzyme activity.
- 4) Myrosinase refinement and activity were measured from oiled mustard seeds. Based on the judgment that in the course refining myrosinase into a water-soluble substance, removing fat soluble ingredients in the refinement process would obtain a highly dense concentration of myrosinase, it was refined after oiling mustard seeds by using the oil extractor (the oil presso oil extractor manufactured by Liquid), the enzymatic assay confirmed enzymatic activation. The result showed that while the use of the oiled mustard seeds in 30 minutes of measurement showed the activation of 39.63 units/mg, the use of the un-oiled mustard seeds in 30 minutes of measurement showed the activation of 29.33 units/mg. Therefore, it is estimated that oiling the seeds produces the higher activation of enzymes.

5) Change in the activation of myrosinase enzymes depending on the treatment of cell wall degrading enzymes was confirmed. The mustard seeds treated with Viscozyme[®] L (Cellulase, multi enzyme), Pectinex[®] Ultra Pulp (Pectin lyase), Fungamyl[®] 800L (Fungal alpha amylase) produced by Novozyme company by 0.5 % for each were used. In the case of refined mustard seeds without adding cell wall disintegrating enzymes, the activation of the enzymes was measured 87.67 units/mg after measuring for thirty minutes. In contrast, in the case of the sample of refined mustard seeds after adding cell disintegrating enzymes, the activation of the enzymes was 103.92 units/mg after thirty minutes of measurement. From these results more myrosinase with a higher degree of enzyme activation when using refined mustard seeds after adding cell wall disintegrating enzymes than not using them at all.

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용된 미국산 겨자씨는 FRONTIER, 인도산 겨자씨는 ROYAL Organic, 스리랑카산 겨자씨는 Boon Foods, 캐나다산 겨자씨는 솔표식품에서 구입하여 사용하였으며, Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase를 표준품으로 사용하였다.

브로콜리는 마트 4곳 (A: 이마트에브리데이, B: OK mart, C: (주)곰식자재마트, D: OK point mart)에서 구입하여 사용하였다.

2) 조효소 myrosinase의 정제

겨자씨 100 g을 취하여 40 초간 분쇄한 후 겨자씨와 extraction buffer를 1:4의 비율로 blender를 이용하여 마쇄한 다음 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4 °C)하여 불용성 물질을 제거하였다. Li 등 (2005)의 Ammonium sulfate precipitation 정제방법에 따라 ammonium sulfate 55 %를 녹인 뒤 4 °C 냉장고에 2시간 정치하였다. 상등액을 원심분리 (10,000 rpm, 30 min, 4 °C)하여 ammonium sulfate 80 %를 녹인 뒤 4 °C 냉장고에 2 시간 정치한 후 다시 원심분리 (10,000 rpm, 40 분, 4 °C)하였다. 가라앉은 pellet에 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)를 넣어 녹여준 후 효소 myrosinase 정제에 사용하였다.

3) 분자량 측정(SDS-PAGE)

각 정제 단계별 전기영동 패턴과 최종 정제물질의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 12 % SDS-polyacrylamide gel에 정제된 효소를 점적한 후 전기영동을 수행하였다. SDS-polyacrylamide gel을 제작하여 유리 plate 조립한 후 running gel 용액을 조제 한 후 주입하였다. 에탄올(ethanol)을 넣어 30~60 분 굳힌 뒤 stacking gel 용액을 주입하고, comb 삽입 후 20~30 분 굳힌 뒤 sample buffer와 sample을 16 μ l, 4 μ l씩 넣어 혼합하였다. Sample을 heat block 100 °C에서 30 분 동안 열처리하고 gel을 전기영동 조에 세팅하였다. Running buffer를 넣고 comb를 꺼낸 뒤 sample을 loading하였다.

Table 2-1. Composition of Separating gel and Stacking gel.

12 %	Separating gel	Stacking gel
Volume	5 ml	2 ml
H ₂ O	1.65 ml	1.34 ml
Separating buffer (pH 8.8 Tris-HCl)	1.25 ml	-
Stacking buffer (pH 6.8 Tris-HCl)	-	1 ml
30 % Acryl/bis acry	2 ml	0.6 ml
10 % SDS	50 μ l	20 μ l
10 % APS	50 μ l	20 μ l
TEMED	3.5 μ l	2.5 μ l

Table 2-2. Composition of Running buffer and Sample buffer.

Running buffer		Sample buffer	
Tris (1.5 M)	3 g	Tris	1.2 g
Glycine	14.4 g	HCl	0.7 ml
		SDS	0.8 g
SDS	1 g	Glycerol	8 ml
		2-mercaptoethanol	4.0 ml
D.W	1 l	1 % Bromphenol Blue D.W	5.3 ml
		Total volume	20 ml

4) 원산지별, 품종별 겨자씨의 myrosinase 활성 분석

Table 2-3처럼 원산지별 겨자씨의 myrosinase 활성 분석을 위해 Conical tube에 k-phosphate buffer와 glucoraphanin을 첨가하였다. 원산지가 서로 다른 겨자씨 myrosinase 효소 4종류를 50 μ l씩 첨가하여 5 초간 vortex하였다. Shaking incubator에서 250 rpm, 40 $^{\circ}$ C, 3 시간 열처리하여 0.45 μ m syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

품종별 겨자씨의 myrosinase 활성 분석을 위해 브로콜리:증류수 = 1:4 비율로 믹서기를 이용하여 5분간 분쇄하여 50 ml conical tube에 10 ml씩 나누어 담았다. 정제한 myrosinase와 Sigma-Aldrich사 myrosinase 1 % (100 μ l)를 첨가한 뒤 모든 sample에 세포벽 효소 0.2 % (200 μ l)를 첨가하여 5 초간 vortex하였다. Shaking incubator에서 250 rpm, 50 $^{\circ}$ C, 3 시간 열처리하여 0.45 μ m syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

5) 효소처리액의 sulforaphane 함량 분석

브로콜리 열처리 조건에서는 진공팩에 브로콜리를 진공하여 100 $^{\circ}$ C, 20 분간 열처리 후 얼음물에서 10 분간 냉각 후 사용하였다. 브로콜리와 증류수를 1:4 비율로 믹서기를 이용하여 3 분간 분쇄하였다. Conical tube에 20 ml씩 나누어 담고 water bath에서 60 $^{\circ}$ C, 10 분간 열처리 후 얼음물에서 10 분간 냉각하였다. 냉각한 브로콜리액에 정제 myrosinase 효소 20 % 첨가한 후 shaking incubator에서 40 $^{\circ}$ C, 3 시간, 250 rpm으로 열처리하여 0.45 μ m syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

Table 2-3. Composition of k-phosphate buffer, glucoraphanin and myrosinase.

Component	Amount
50 mM k-phosphate buffer (pH 7)	3 ml
glucoraphanin	100 μ l (0.2 mg)
myrosinase	50 μ l

6) 단백질 농도 측정 (Bradford assay)

단백질의 정량은 Bradford법 (Bradford, 1976)에 따라 10배씩 희석한 BSA sample 200 μl 에 bradford reagent 800 μl 를 넣어 5 초간 vortex하였다. 상온에서 5 분간 반응한 뒤 spectrophotometer 파장 595 nm에서 BSA sample을 농도별로 측정하였다. 측정값을 X, Y축에 대입하여 직선 그래프를 만들어 R^2 값이 1에 가까운 상태로 하였다.

증류수를 이용하여 400배 희석한 정제한 겨자씨 myrosinase sample 200 μl 에 bradford reagent 800 μl 를 넣어 5 초간 vortex하였다. 상온에서 5 분간 반응한 뒤 spectrophotometer 파장 595 nm에서 측정하였고, 측정값을 BSA standard 그래프에 대입하여 단백질 농도를 측정하였다 (Fig. 2-1).

standard curve

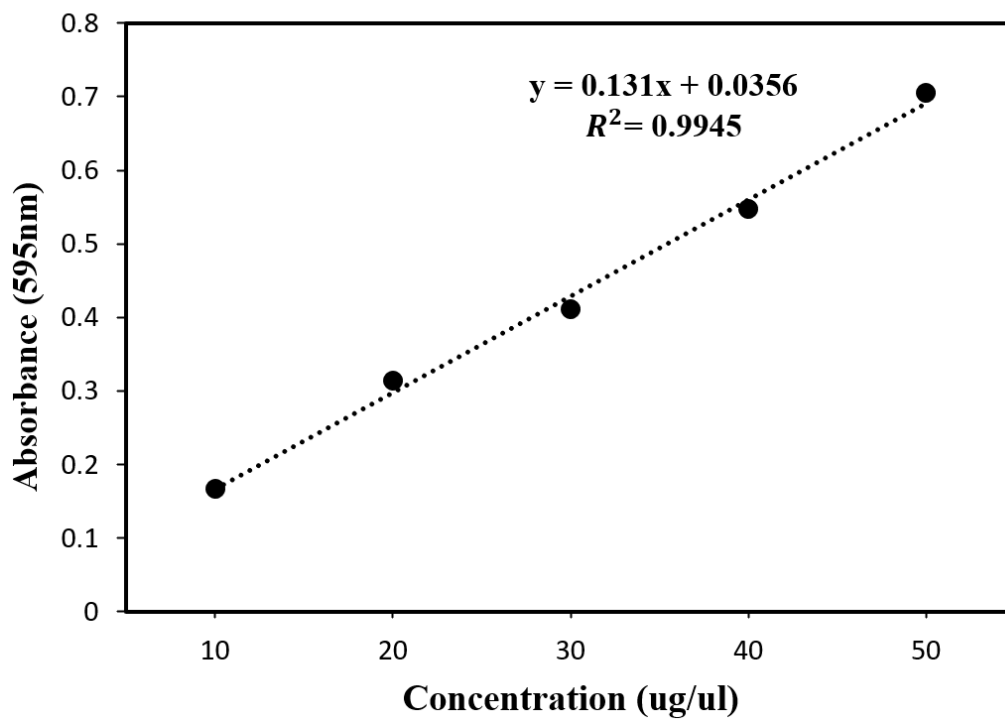


Figure 2-1. Absorbance of BSA sample by concentration for bradford assay.

7) 효소 활성 측정 (Enzymatic assay)

효소활성 측정은 Sumner (1925)의 방법에 따라 효소액 100 μl , 10 mM L-ascorbic acid 100 μl 를 넣고 sinigrin은 50 mM sodium acetate buffer에 녹여서 사용하였다. Blank는 50 mM sodium acetate buffer로 잡아주었다. 최종 부피를 1 ml로 조절하여 37 $^{\circ}\text{C}$ water bath에서 10 분간 반응시킨 후 5 분마다 흡광도를 측정하였으며, 효소활성도 1 unit은 반응시간 1 분당 1 μmol 의 기질을 가수분해시키는 효소의 양으로 정의하였다 (Table 2-4).

$$\text{계산식: units} = \text{U cm}^{-3} = \frac{\Delta A}{\text{Min}} \frac{1}{\epsilon l} \frac{V_A}{V_E} 10^3$$

ΔA = 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분당 1 μmol 의 sinigrin을 분해하는 효소 양을 측정한 것

V_A = total volume of the assay mixture (3.0 cm^3)

ϵ = extinction coefficient of sinigrin at 227 nm ($6784 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l = cuvette path length (1 cm)

V_E = volume of enzyme solution (0.1 cm^3)

8) 통계분석

실험 결과는 통계분석 프로그램 SPSS statistics (SPSS ver. 12.0, SAS Inc.)를 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였고, 유의성 검정은 ANOVA를 이용하였다. Duncan 다중 검정 (Duncan's multiple range test)을 통해 $P=0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Table 2-4. Composition of blank and sample for enzymatic assay.

	Component	Amount
Blank	50 mM sodium acetate buffer	2.5 ml
	0.5 mM sinigrin	1,125 μ l
Sample	Sample (20-fold dilution)	125 μ l
	50 mM sodium acetate buffer	1,250 μ l

3. 결과 및 고찰

1) 원산지와 품종별 겨자씨 myrosinase 추출

효소 (enzyme)란 에너지의 소비 없이 물질 전환을 특이적으로 촉매하는 단백질로 보통 열에 약하다. 식품으로부터 식용방법에 의해 추출한다면 KFDA의 허가 없이 식용으로 사용 가능하다. 겨자는 기원전부터 유럽 및 중국에서 식품의 향신료로 이용되었으며, 종류는 백색, 황색, 갈색 및 흑색의 4종이 있으나 갈색과 흑색이 매우 유사하여 백겨자, 황겨자 및 흑겨자로 구분하였다 (MacLeod, 1974). 겨자는 풍부한 화학적 성분을 가지고 있고 겨자씨 가루는 식품 가공에 널리 쓰이고 있다 (Abul-Fadl 등, 2011; Wanasundara, 2008). 또한 겨자는 마이로시네이즈 효소에 의한 글루코시놀레이트의 가수분해로부터 만들어지는 매운맛을 내는데도 이용된다 (Wanasundara, 2008).

Van Eylen 등 (2006, 2008)은 십자화과 식물들 중 겨자씨 유래의 myrosinase가 열과 압력에 안정하다고 보고하였는데, 이를 참고하여 효소 추출 원물을 겨자씨로 결정하였다. 겨자씨는 조미료로 널리 쓰이나 유리한 화학적 성분과 비교적 낮은 가격은 사람의 음식과 동물 사료에 첨가제로 활용할 수 있는 폭넓은 가능성을 제공한다 (Abul-Fadl 등, 2011; Wanasundara, 2008).

십자화과 채소의 마이로시네이즈 효소는 열 안정도의 변화를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Ghawi 등, 2012; Ludikhuyze 등, 1999; Matusheski 등, 2003; Van Eylen 등, 2006; Yen과 Wei, 1993). 겨자씨의 재배 시기, 온도, 수분과 같은 재배조건, 원산지 혹은 품종 등에 따라 myrosinase의 함량과 열에 대한 안정성 (Fig. 2-2)이 다르기 때문에 어떤 겨자씨의 효소 함량이 높고 활성이 좋은지 알아보고, 어떤 겨자씨에서 myrosinase를 최종 추출할지 결정하기 위한 실험을 진행하였다. Okunade 등 (2015)은 갈색 겨자씨 myrosinase의 효소 활성이 다른 겨자씨에 비해 높으며, 열에 안정적이라고 보고하였다 (Fig. 2-2).

Myrosinase 추출 최적화 실험에 사용된 미국산 겨자씨는 Frontier, 인도산 겨자씨는 Royal Organic, 스리랑카 겨자씨는 Boon Foods, 캐나다 겨자씨는 솔표식품에서 구입하여 사용하였으며 Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase를 표준품으로 사용하였다 (Fig. 2-3). 4가지 원산지별 (미국, 인도, 스리랑카, 캐나다) 겨자씨로부터 myrosinase를 추출하여 SDS-PAGE로 단백질 정성분석을 실시했으며, myrosinase를 브로콜리 98 % glucoraphanin에 처리하여 생성되는 sulforaphane (SFN)을 HPLC로 정량분석하였다.

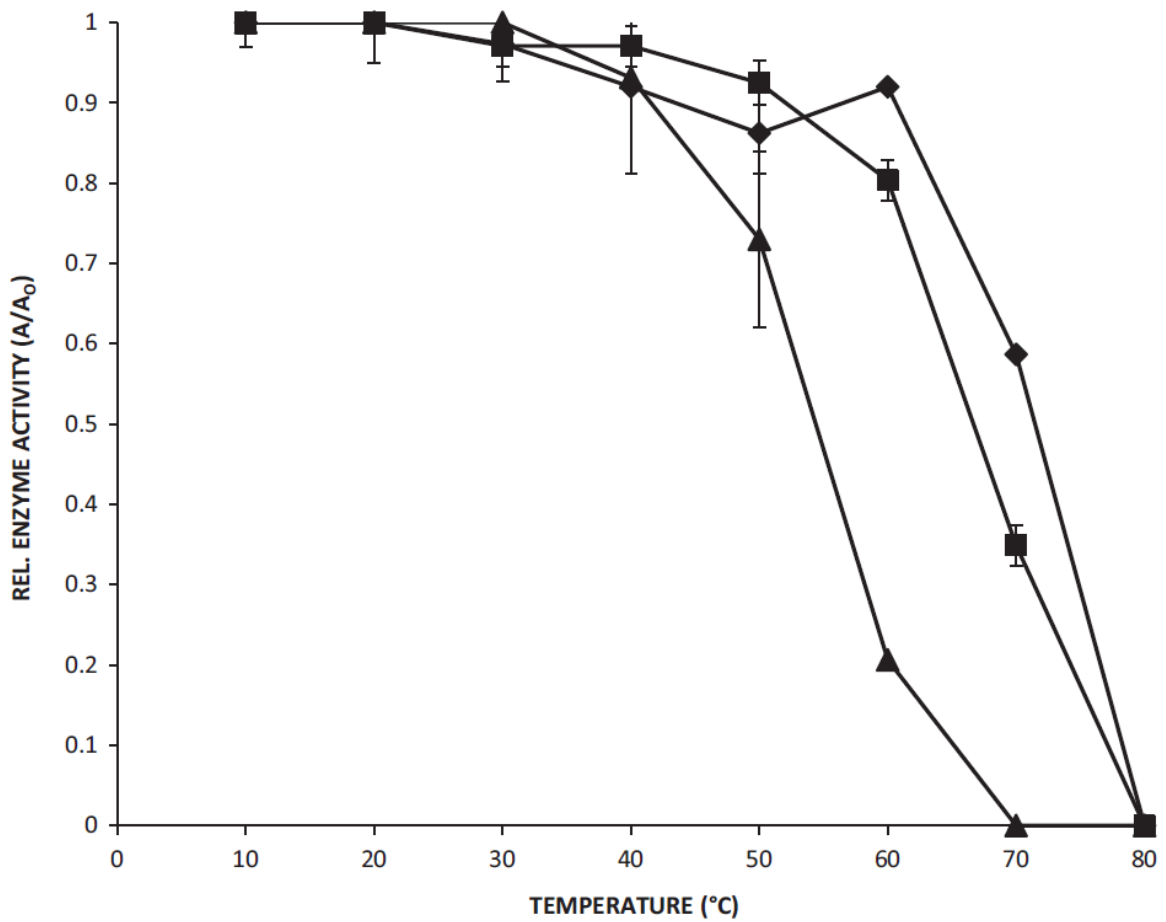


Figure 2-2. Heat stability of myrosinase for various mustard seeds (Okunade et al., 2015).

(◆) Black mustard seed (■) Brown mustard seed (●) Yellow mustard seed

 A silver, crinkled bag of Frontier Mustard Seed Brown, Whole. The label is green and white with the Frontier logo and text: "FRONTIER™ NATURAL PRODUCTS CO. Mustard Seed Brown, Whole".	 A black bag of Royal Organic Mustard Seed. The label is orange and white with a leaf logo and text: "ROYAL Organic Go Organic. Live Healthy. 4 GMO-Free 4 Synthetic Pesticide Free. Certified by: ACOF".	 A brown and white bag of Boon Foods Mustard Seeds. The label features the Boon Foods logo, Sinhala text "අඹ කටුකු", and English text "MUSTARD SEEDS". It also includes "Net Weight 100g" and "PRODUCT OF SRI LANKA".	 A clear plastic jar with a red lid containing brown mustard seeds. The label is white with a red logo and text: "Brown Mustard Seed".
<p>USA</p>	<p>India</p>	<p>Sri Lanka</p>	<p>Canada</p>

Figure 2-3. The mustard seeds by origins.

원산지별 겨자씨로부터 추출한 myrosinase를 정성분석 한 결과로 표준품은 Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase이며, 인도와 스리랑카에서 구입한 겨자씨에서 myrosinase의 함량이 높게 나왔다. 또한 겨자씨에 myrosinase뿐만 아니라 다른 단백질도 많이 있는 것을 단백질 정성분석법 (SDS-PAGE)으로 확인할 수 있다 (Fig. 2-4). 원산지별 겨자씨의 myrosinase를 추출한 후 Sigma-Aldrich사의 myrosinase를 standard로 두어 75 kDa에서 myrosinase를 확인하였다. 정성분석 결과 인도 겨자씨와 스리랑카 겨자씨에서 많은 양의 myrosinase가 있을 거라고 판단하였다.

원산지별 겨자씨로부터 추출한 myrosinase와 Sigma-Aldrich사의 myrosinase를 1 %씩 98 % glucoraphanin에 50 °C에서 3 시간 처리 후 생성되는 SFN 함량이며, 캐나다 겨자씨 18.4 mg/l, 미국 겨자씨 13 mg/l, 인도 겨자씨 19.9 mg/l, 스리랑카 겨자씨 24.6 mg/l의 SFN을 나타내고 있다. 인도와 스리랑카 겨자씨에서 설포라판으로의 전환율이 높기 때문에 두 원산지에서 효소 활성이 가장 높음을 알 수 있다 (Fig. 2-5). 최종 원물을 결정하기 위해 스리랑카 겨자씨와 인도 겨자씨의 myrosinase 효소 활성 측정 결과 인도 겨자씨의 myrosinase의 활성이 스리랑카 겨자씨의 4배 정도로 가장 높아 인도산 겨자씨를 사용하기로 최종결정하였다 (Fig. 2-6).

가장 높은 효소 활성을 보인 스리랑카의 겨자씨는 1 l 기준 66.6 mg의 glucoraphanin을 넣어줬을 때 44.02 %의 glucoraphanin이 sulforaphane으로 전환되었으며 Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase보다 약 2.6 % 높은 활성을 보였다. Li 등 (2005)의 방법에 따라 컬럼 방식의 고순도 효소 추출법이 아닌 분획법을 적용한 ammonium sulfate 법으로 추출한 myrosinase를 산업적으로 사용이 가능할 것으로 사료 된다 (Fig. 2-5). 이 방법에 의해 분리된 마이로시네이즈는 다양한 글루코시놀레이트의 분해 산물에 대한 향후 연구에 이용할 수 있다 (Li 등, 2005).

황겨자씨와 유채의 마이로시네이즈는 십자화과 식물 중 열 안정성이 가장 높은 것으로 알려져 있다 (Kozłowska 등, 1983; Ludikhuyze 등, 1999; Pérez 등, 2014; Van Eylen 등, 2006, 2007; Verkerk와 Dekker, 2004; Yen과 Wei, 1993). 십자화과 식물의 열안정성에 대한 보고는 미흡하지만 갈색 겨자씨와 흑색 겨자씨의 마이로시네이즈 효소의 열 불활성화에 대한 데이터는 아직 활용할 수 없는 실정이다. 그러나 이미 황겨자와 관련이 있기 때문에 다른 십자화과의 마이로시네이즈보다 더 높은 열 안정성을 보여주고 있다 (Van Eylen 등, 2006; Van Eylen 등, 2008).

겨자씨의 품종별 효소 활성을 알아보기 위해 황겨자씨, 백겨자씨, 브로콜리로부터 정제한 myrosinase와 Sigma-Aldrich사 myrosinase를 1 %씩 브로콜리에 50 °C에서 3 시간 처리한 결과로 4가지 모두 효소 처리하지 않은 음성대조군보다 sulforaphane 생성률이 높았으며, 갈색 겨자의 myrosinase 활성이 가장 높음을 알 수 있다 (Fig. 2-7). 최근의 연구에서도 갈색 겨자씨의 효소 활성이 2.75 ± 0.22 units/ml로 흑겨자씨 (1.5 units/ml)와 황겨자씨 (0.63 units/ml)에 비해 높으며, 열에 안정적이라고 보고한 바 있다 (Okunade 등, 2015).

Van Eyllen 등 (2006, 2008)은 60 °C 이상 10 분 노출되었을 때 황색 겨자로부터 추출한 마이로시네이즈의 불활성화가 일어난다고 밝혔다. Stoin 등 (2009)은 흑겨자로부터 추출한 마이로시네이즈가 45~50 °C에서 최대 활성을 나타냈으며, 70~85 °C에서 소량의 효소 활성을 관찰할 수 있다고 보고하였다. 그러나 85 °C 이상에서의 활성은 예를 들어 기질로서 시니그린 (sinigrin)을 사용하는 열 안정의 desulphatase 효소와 같은 다른 원인이 있을 수 있다고 제안했다. 최근의 연구에서 흑겨자와 갈색 겨자의 마이로시네이즈는 80 °C 이상의 온도에서 완전히 비활성화되고 이 겨자들의 마이로시네이즈는 황색보다 더 안정적이라는 결론을 내렸다 (Okunade 등, 2015).

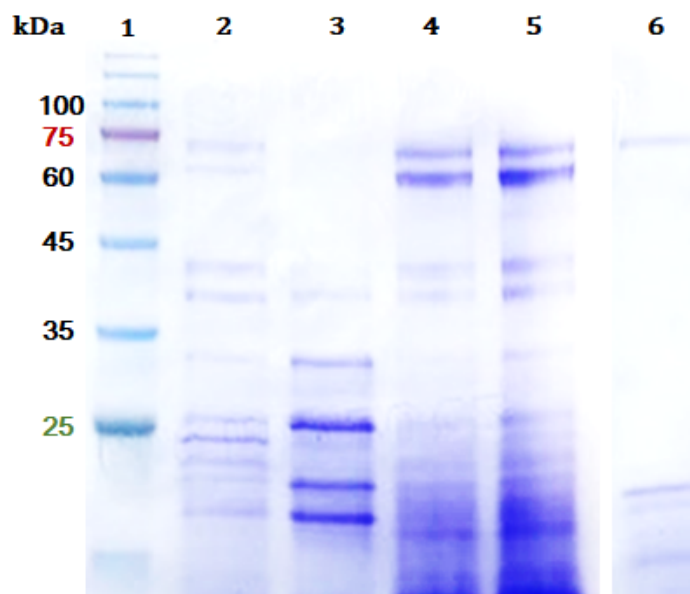


Figure 2-4. Qualitative analysis of myrosinase extracted from mustard seeds by origins.

(1: size marker, 2: Canada, 3: USA, 4: India, 5: Sri Lanka,
6: Myrosinase purchased from Sigma-Aldrich, appears at 75 kDa)

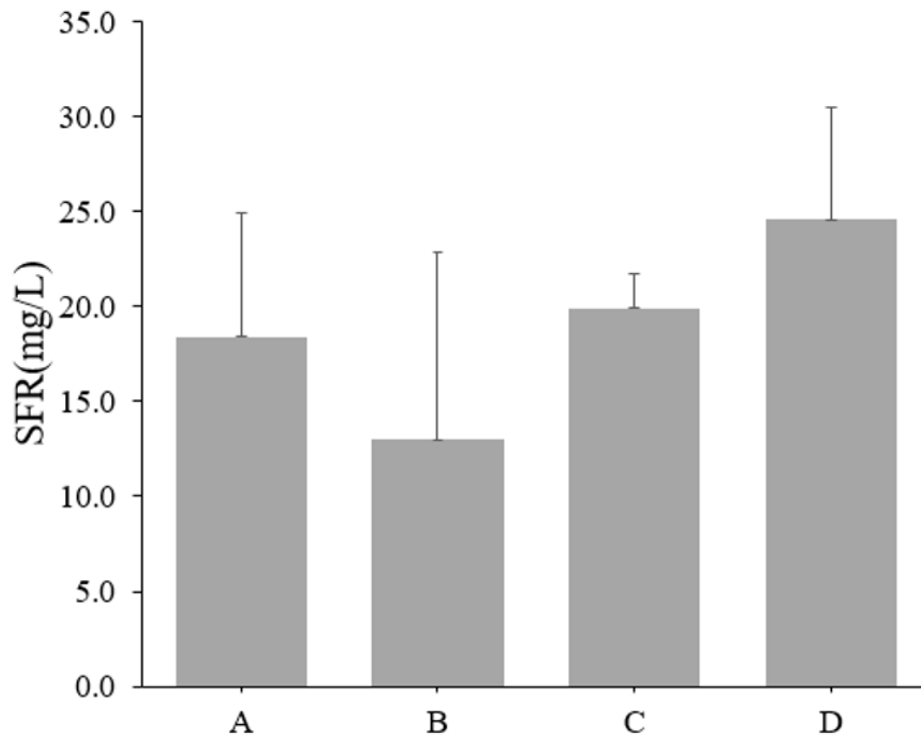


Figure 2-5. 98 % glucoraphanin treated with myrosinase extracted from mustard seeds by origins.

A: Canada, B: USA, C: India, D: Sri Lanka

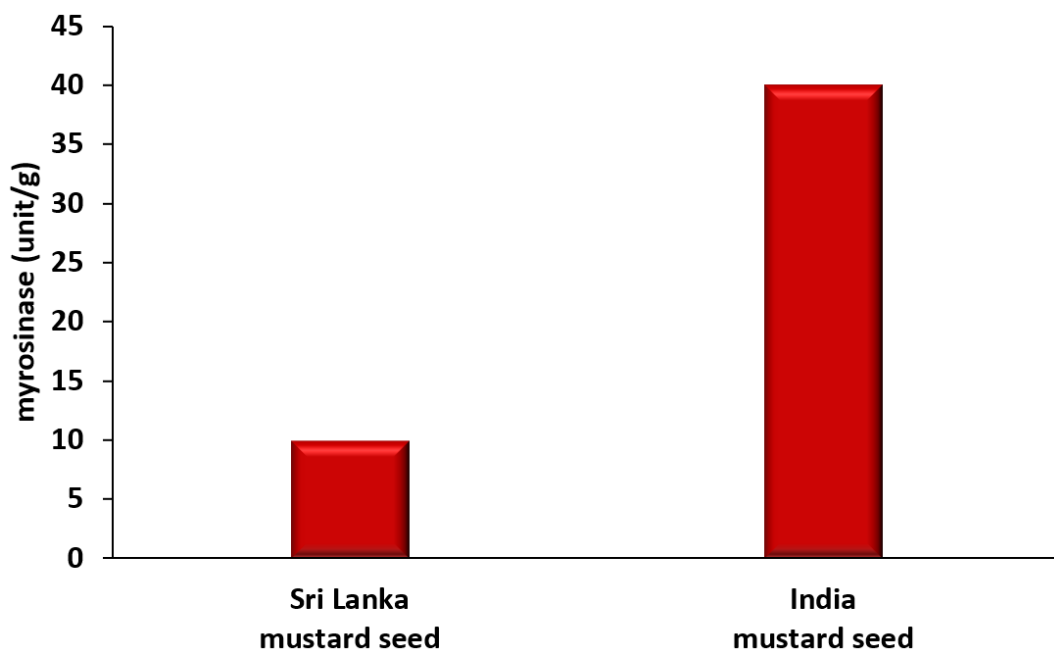


Figure 2-6. Enzymatic activity of myrosinase from Sri Lanka mustard seed and India mustard seed

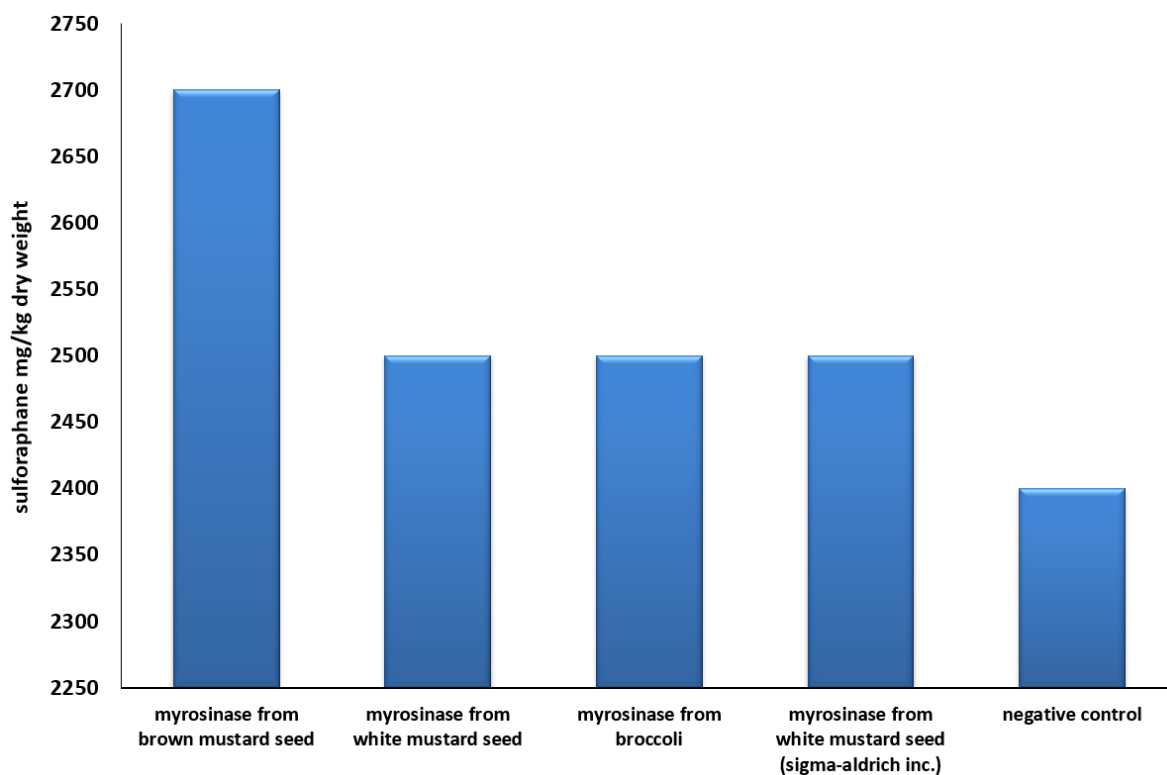


Figure 2-7. Active analysis of sulforaphane treated with various mustard seeds and myrosinase of broccoli.

2) Myrosinase 정제방법에 따른 효소 활성

경제적인 ammonium sulfate (AS)법을 통한 브로콜리 myrosinase 추출방법은 55 % AS 단계에서 불필요한 단백질을 제거한 후 80 % AS 단계에서 침전된 myrosinase 정제하는 공정이다. 효소 추출 단계를 줄임으로써 시간을 절약하고 공정을 최소화하고자 55-80 % AS와 80 % AS로 추출한 myrosinase를 브로콜리에 각각 처리하였으며 브로콜리 자체내의 단백질, 화합물 등을 제거하기 위해 열처리한 브로콜리로도 실험하여 HPLC로 sulforaphane (SFN) 함량을 분석하였다.

또한 80 % AS 단계에서 정치 시간 조건을 확립하기 위해 4 시간과 16 시간 동안 정치한 후 bradford assay로 단백질 총량을 분석하였다. 그리고 해당 정제 myrosinase를 이용하여 효소 활성을 enzymatic assay로 확인하였다. 브로콜리는 마트 4곳 (A: 이마트에브리데이, B: OK mart, C: (주)곰식자재마트, D: OK point mart)에서 구입하여 효소 활성을 비교하였다.

Table 2-5a. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 55-80 %

Ammonium sulfate.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,

C: GOM food mart, D: OK point mart)

Sample	Sulforaphane mg/kg dry weight
A	846.85
B	867.87
C	813.81
D	906.9

Table 2-5b. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 80 % Ammonium sulfate.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

Sample	Sulforaphane mg/kg dry weight
A	366.37
B	321.32
C	363.36
D	369.37

Table 2-6a. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 55-80 % Ammonium sulfate after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes.
 (A: E-mart everyday, B: OK mart, C: GOM food mart, D: OK point mart)

Sample	Sulforaphane mg/kg dry weight
A	129.13
B	30.03
C	813.81
D	195.2

Table 2-6b. Sulforaphane content of enzyme-treated juice purified with 80 % Ammonium sulfate after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

Sample	Sulforaphane mg/kg dry weight
A	30.03
B	90.09
C	144.14
D	201.2

Table 2-7. Total amount of protein from the setting time for treatment with 80 % ammonium sulfate.

Sample	mg/ml
Boon food left for 16 hours in 80 % AS	9,446.99
Boon food left for 4 hours in 80 % AS	6,785.31

Table 2-8a. Enzymatic activity after leaving for 16 hours in 80 % AS treatment step of Sri Lanka mustard seeds.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	0.837	0.823	0.795	0.771	0.757	0.738	0.72
units	-	12,382.08	18,573.11	19,457.55	17,688.68	17,511.79	17,246.46
units/mg	-	26.21	39.32	41.19	37.45	37.45	36.51

Table 2-8b. Enzymatic activity after leaving for 4 hours in 80 % AS treatment step of boon food mustard seeds.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	1.081	1.037	0.995	0.948	0.914	0.836	0.781
units	-	38,915.09	38,030.66	39,209.91	36,925.12	43,337.26	44,221.7
units/mg	-	114.7	112.1	115.57	108.84	127.74	130.35

열처리하지 않은 4가지 브로콜리에 55-80 % AS로 추출한 myrosinase와 80 % AS로 추출한 myrosinase 20 %를 열처리하지 않은 브로콜리에 각각 처리하였으며 Table 1과 Table 2의 결과를 비교해봤을 때 55-80 % AS로 추출한 효소를 처리했을 때 전체적으로 sulforaphane 함량이 높았으며, 55 % AS 단계에서 불필요한 단백질이 많이 제거되었음을 알 수 있다. Li 등 (2005)도 추출물에 최종농도 55-80 % AS를 첨가하여 겨자무 (horseradish)를 포함한 대부분의 단백질을 침전시켰다. 또한 시험한 27개의 접근법들 사이의 마이로시네이즈 활성에서 상당한 차이를 보여주었고, 겨자무 뿌리는 잎보다 2배 더 높은 마이로시네이즈를 함유하고 있다고 밝힌 바 있다 (Li 등, 2005). 효소 추출 단계를 줄이기 위해 55-80 % AS와 80 % AS로 추출을 했을 때 80 % AS에서 sulforaphane의 양이 오히려 감소하는 것을 확인하였다. 55-80% AS에서 설포라판 함량이 높다는 것은 55% AS에서 불필요한 단백질이 많이 제거되었음을 알 수 있다 (Fig. 2-8a, 2-8b).

Ammonium sulfate precipitation은 염의 농도에 따라 단백질의 용해도가 달라지는 것을 이용한 침전 방법으로, 염의 농도가 55-80 % 일 때 겨자씨의 myrosinase가 침전되는 것을 확인하였다 (Li 등, 2005). 그리고 시판되는 정제 효소는 unit 당 약 4,000원이 넘는 가격으로 음료나 식품 생산에 적용할 수 없는 고가이다. 경제적으로 추출하는 법을 강구하기 위해 컬럼 방식의 고순도 정제가 아닌 ammonium sulfate법을 이용하기로 하였다. 이는 비교적 낮은 단가로 식용이 가능하고 원심분리기(centrifuge) 이외의 장비는 필요 없다. 산, 열처리 과정도 필요 없어서 추출과정이 간단하고, 정제된 단백질의 활성이 유지되는 장점이 있다.

따라서 경제적으로 myrosinase를 추출하기 위해서 55-80 % AS가 적합하였다 (Table 1, 2). 4가지 브로콜리를 100 °C에서 20 분간 열처리한 후에 55-80 % AS로 추출한 myrosinase와 80 % AS로 추출한 myrosinase 20 %를 각각 처리하였을 때 열처리를 함으로써 전체적으로 sulforaphane의 함량이 줄어들었으며, 이마트에브리데이와 (주)곰식자재마트는 55-80 % AS 처리했을 때, OK mart와 OK point mart는 80 % AS 처리했을 때 sulforaphane이 많이 생성된 것으로 보아 브로콜리마다 온도에 대한 영향이 다르기 때문에 실험 결과를 판단하기 어려웠다 (Table 3, 4). 80 % AS 정치 시간을 4 시간과 16 시간으로 설정하였으며, 정치 시간이 길어질수록 침전되는 단백질의 총량은 높았으나 효소의 역가를 잃게 되었다 (Table 5-7).

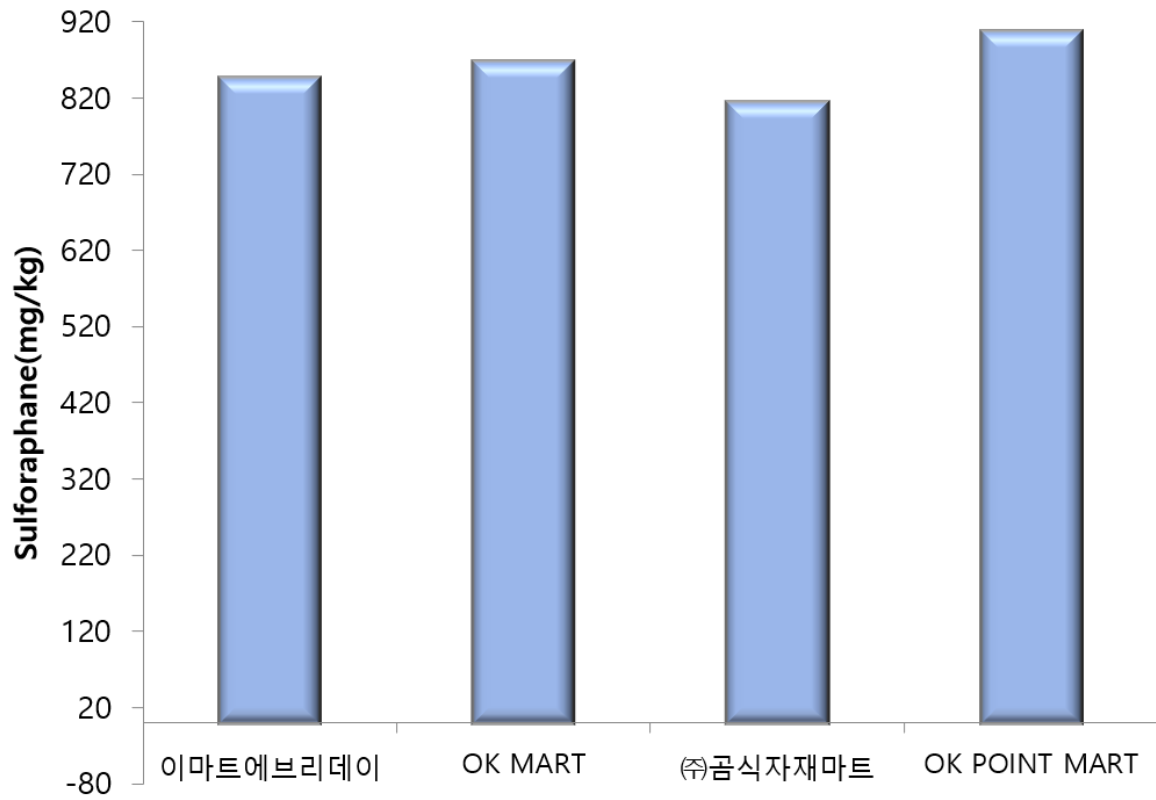


Figure 2-8a. Sulforaphane content of purified enzyme solution with 55-80 % ammonium sulfate precipitation.

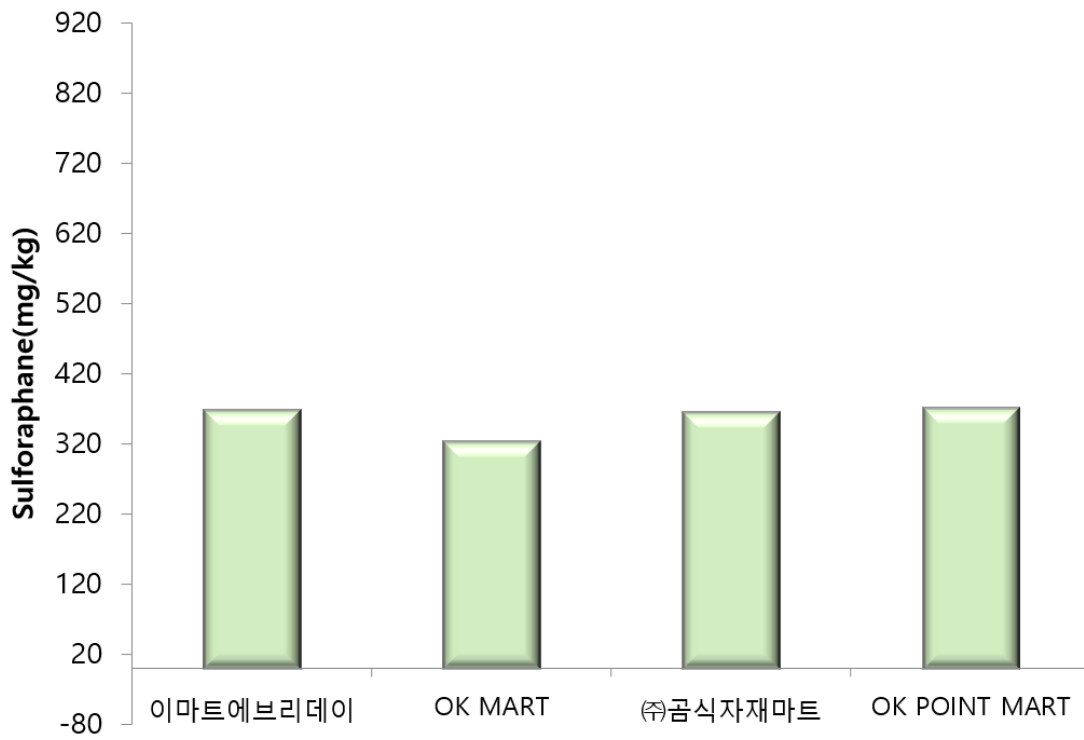


Figure 2-8b. Sulforaphane content of purified enzyme solution with 80 % ammonium sulfate precipitation.

3) 겨자씨와 추출 용매의 비율

겨자씨로부터 효소 myrosinase 추출과정에서 겨자씨와 추출 용매의 비율 조건을 확립하기 위한 실험으로 겨자씨와 추출 용매의 비율은 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 4가지 비율로 설정하였다. 겨자씨는 boon food (스리랑카), 추출 용매로는 안정적 pH를 유지하기 위해 extraction buffer (pH 7.2)를 이용 하였으며 실험 결과는 육안으로 확인하였다.

겨자씨와 추출 용매를 1:2로 분쇄했을 때 되직했으며 입자가 굵었다. 1:4 비율과 1:6, 1:8 비율의 경우 입자의 크기가 비슷하였으며 큰 차이를 보이지 않아 적당히 묽으며, 스케일을 줄이기 위해 1:4 비율로 사용했으나 1:4로 분쇄한 후 믹서기 남아있는 겨자씨가 많아 버퍼를 2만큼 더 가한 후 분쇄하여 최종 1:6 비율이 가장 적절하다고 판단하였다 (Fig. 2-9).

겨자씨와 용매를 함께 분쇄 후 믹서기에 남아있는 겨자씨를 최대한 확보하기 위해 extraction buffer를 2만큼 가하여 겨자씨와 추출 용매의 최종 비율 조건을 1:6으로 확립 하였다 (Fig. 2-10).

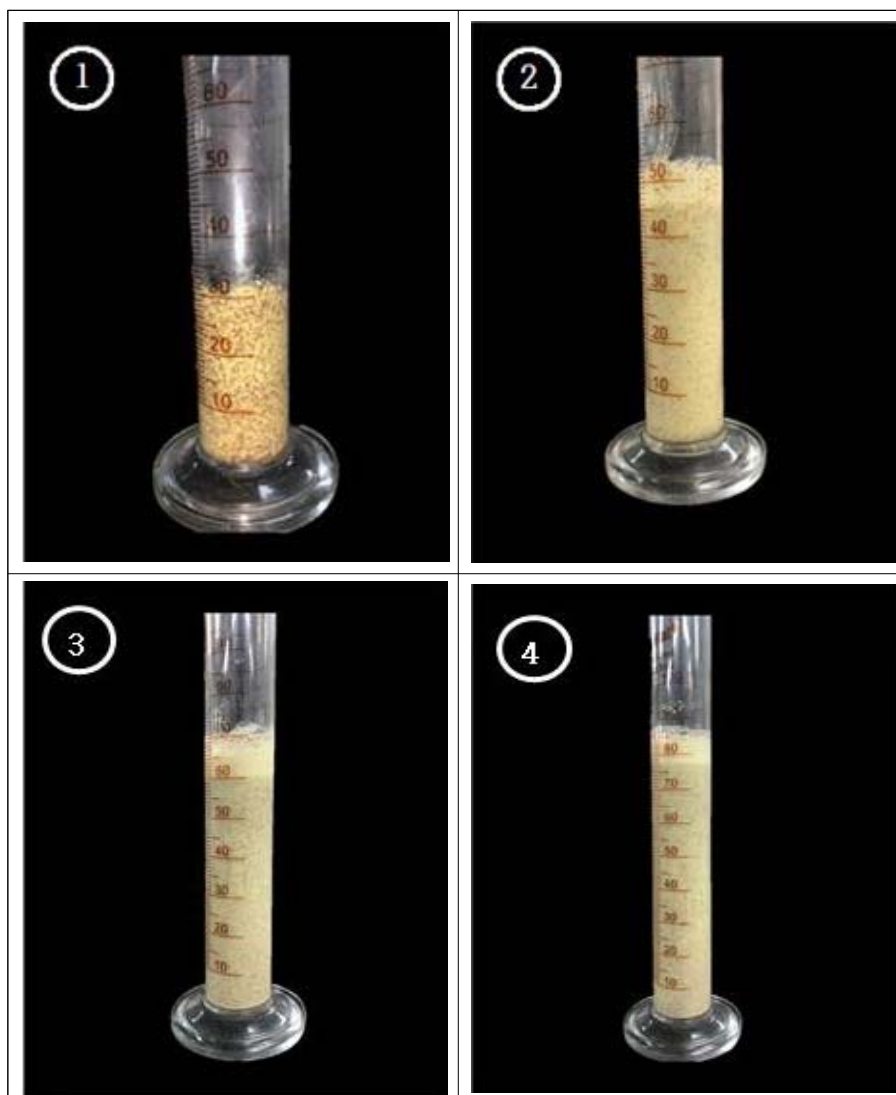


Figure 2-9. After mixing mustard seeds and solvent in 4 ratios.
(mustard seeds : extraction solvent = ① 1:2, ② 1:4, ③ 1:6, ④ 1:8)



Figure 2-10. Mustard seeds and solvent are crushed to 1:4,
and mustard seeds remain in the blender.

4) ESP 단백질의 불활성화에 따른 myrosinase의 정제 및 활성 측정

Glucoraphanin (GR)이 myrosinase에 의해 sulforaphane으로 가수분해되는 과정에서 sulforaphane nitrile로 전환 시켜 sulforaphane (SFN)의 형성을 방해하는 epithiospecifier protein (ESP)를 불활성화시키기 위한 실험을 진행하였다.

ESP를 불활성화하기 위해 4곳의 마트 (이마트에브리데이, OK 마트, (주)곰식자재마트, OK POINT 마트)에서 구입한 브로콜리를 분쇄 (브로콜리:물=1:4)하여 진공상태로 만든 후 100 °C에서 20 분간 열처리를 했으며 40 °C에서 3 시간 동안 효소 처리하였다.

HPLC 분석 결과 SFN이 약 1.5 배에서 238배까지 감소했다. 브로콜리의 구입처마다 SFN의 함량이 다를 뿐만 아니라 GR의 함량과 열에 대한 영향도 모두 다름을 알 수 있다 (Fig. 2-11).

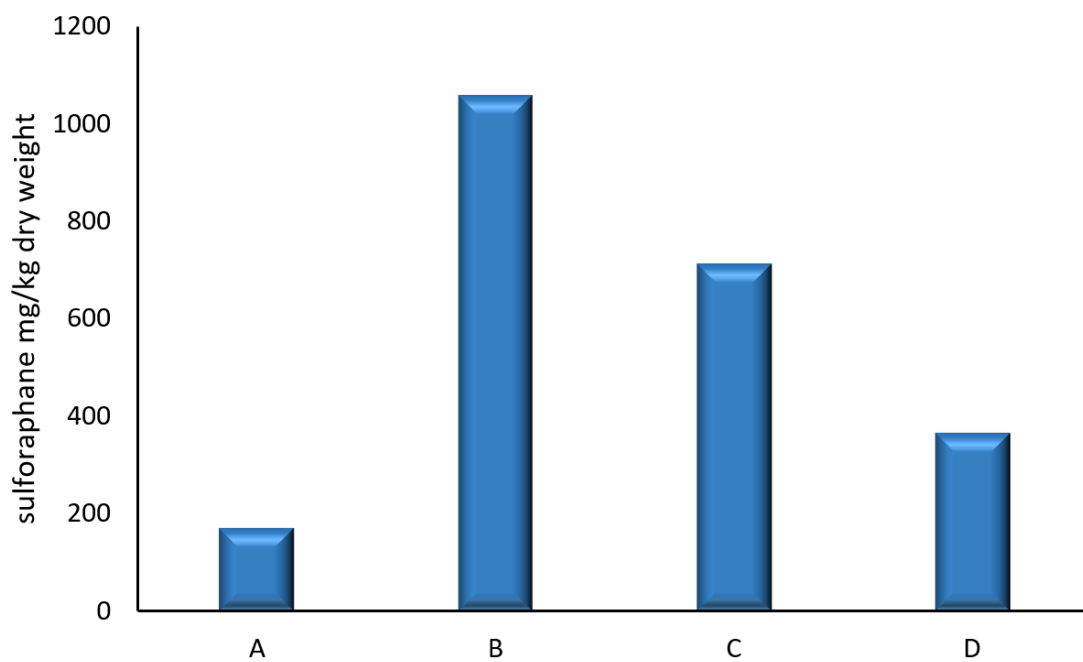


Figure 2-11a. The changes of SFN content with non heat treatment of broccoli.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

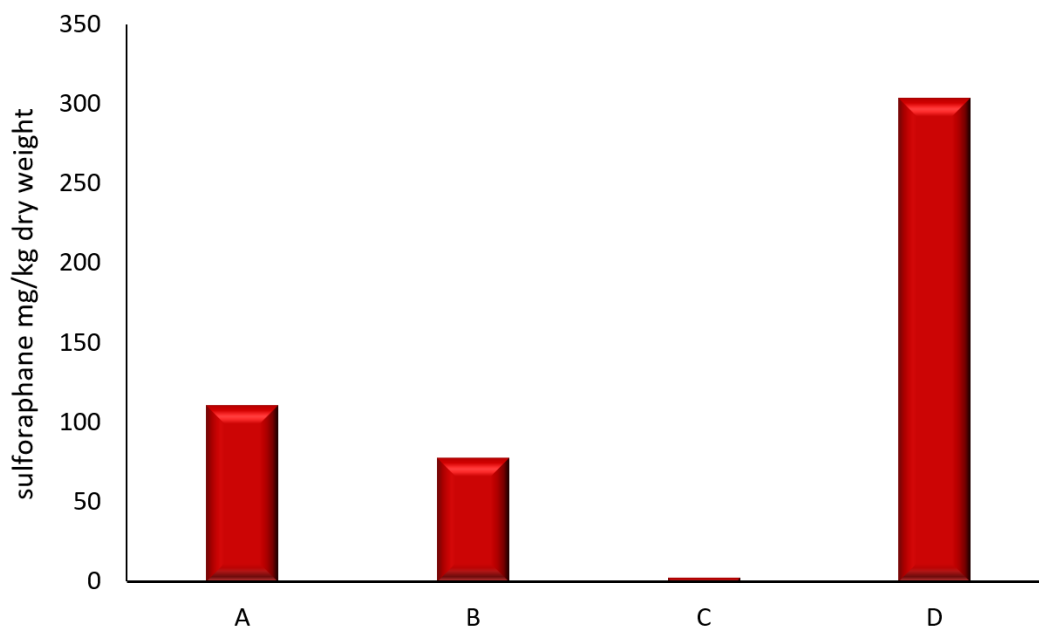


Figure 2-11b. The changes of SFN content after heat treatment of broccoli at 100 °C for 20 minutes.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

5) 착유한 겨자씨의 myrosinase 추출 및 활성

효소 myrosinase는 수용성 물질로 myrosinase를 추출하는 과정에서 지용성 성분을 제거하면 고농축의 myrosinase를 얻을 수 있을 거라 판단하여 착유기 (리큘사의 오일 프레소 채유기)를 이용하여 각 원산지별 겨자씨를 착유 한 후에 추출하여 정성분석 (SDS-PAGE)을 하였고, boon food와 royal의 겨자씨를 착유 후 정제했을 때와 착유 하지 않고 정제했을 때 단백질량의 차이를 bradford assay로 확인하였다. 그리고 해당 정제 myrosinase를 이용하여 효소 활성 (enzymatic assay)을 확인하였다.

유채 (*Brassica napus*), 겨자 (*Sinapis alba*)씨, 무 (*Raphanus sativus*), 큰다닥냉이 (*Lepidium sativum*) 묘목으로부터 정제한 마이로시네이즈 동종효소 (isoenzyme)는 분자량이 65~75 kDa인 2합체 단백질 (dimeric protein)인 것으로 보고되었는데 (Björkman 등, 1972; Durham 등, 1989; Lenman 등, 1990; Rouzaud 등, 2004), 본 연구에서 겨자씨 (*Brassica juncea*)로부터 분리한 myrosinase는 Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase를 standard로 두어 74 kDa에서 확인할 수 있었는데, 선행 연구와 유사한 결과가 나왔다. 이와는 대조적으로 고추냉이 (*Wasabi Japonica*) 뿌리에서 정제한 마이로시네이즈 동종효소는 분자량이 각각 45 kDa인 12개의 subunits을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (Ohtsuru 등, 1979).

Reese 등 (1958)은 *Aspergillus niger*와 *Asp. sydowi*에서 myrosinase를 분리 및 정제 하였으며, 분자량이 각각 90 및 120 kDa이고, Tani 등 (1974)은 *Enterobacter cloacae*에서 분리한 myrosinase의 분자량이 61 kDa라고 보고하였다. Lönnerdal과 Janson (1973)은 평지씨에서 분리한 myrosinase의 분자량이 135 kDa라고 밝혔고, Ohtsuru와 Kawatani (1979)는 와사비 (*wasabi japonica*)에서 분리한 myrosinase의 분자량이 580 kDa라고 보고하였다. 또한 Palmieri 등(1986)은 백겨자에서 단일결핍으로 정제한 myrosinase의 분자량은 약 140 kDa라고 보고하였고, Li 등 (2005)은 겨자무 (*Armoracia rusticana*) 뿌리에서 추출한 myrosinase의 분자량은 65 kDa라고 밝혔다. 이와 같이 품종에 따라 분리 및 정제한 myrosinase의 분자량이 다르다는 것을 알 수 있다.

원산지별 (캐나다, 미국, 인도, 스리랑카) 겨자씨를 착유 후 정제한 것과 착유 하지 않고 정제한 겨자씨를 육안으로 비교해봤을 때 전체적으로 착유 후 정제한 겨자씨에서 myrosinase가 많이 검출된 것으로 보였다 (Fig. 2-12). 스리랑카 (boon food)의 겨자씨는 착유 하지 않고 정제했을 때 단백질이 약 2배 이상, 인도 (royal) 겨자씨는 착유 후 정제했을 때 약 2배 이상의 단백질이 추출되었다 (Table 2-9).

이 결과를 통해 겨자씨의 원산지에 따라 효소 myrosinase의 함량과 그 외의 단백질의 총량이 다르며 지용성 성분에 대한 영향이 다름을 알 수 있다 (Figure 2-12, Table 2-9). 그러나 효소 역가 측정 실험에 사용된 효소의 저장 기간과 80 % AS 처리 단계에서 정치 시간이 상이 하여 결과를 정확하게 비교할 수 없었다 (Table 2-10a~2-10d).

그러나 인도와 스리랑카 겨자씨의 착유 유무에 따라 효소 활성을 측정한 결과 스리랑카 (boon food) 겨자씨는 착유 전 9,713.5 unit/g, 착유 후 39,675.7 unit/g로 4배 정도 증가하였고, 인도 (royal) 겨자씨는 착유 전 7,540.6 unit/g, 착유 후 35,986.8 unit/g로 4.8배 정도 증가하였다 (Fig. 2-13). 따라서 겨자씨를 착유 하여 탈지하였을 때 효소의 활성이 4배 이상 증가하는 것을 확인하여 겨자씨를 착유 하여 사용하기로 최종결정하였다.

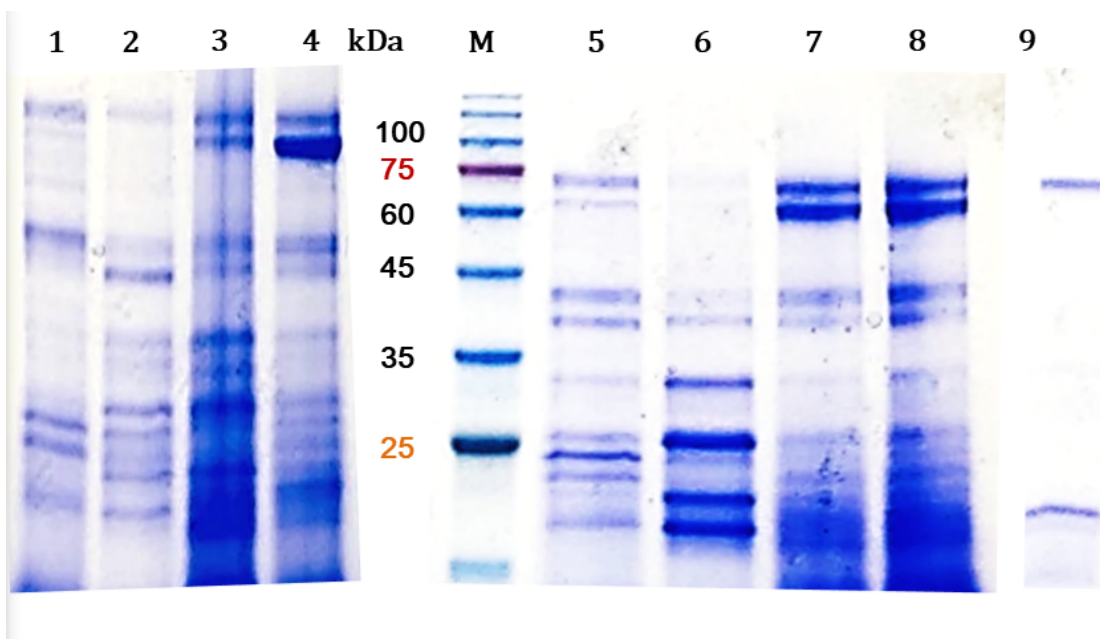


Figure 2-12. Qualitative analysis of myrosinase with or without oil expression from mustard seeds.

(1-4: Enzyme extraction after oil expression, 1: Canada, 2: USA, 3, India, 4, Sri Lanka, M: size marker, 5-8: Enzyme extraction without oil expression, 5: Canada, 6: USA, 7: India, 8: Sri Lanka, 9: Myrosinase purchased from Sigma-Aldrich, appears at 75 kDa)

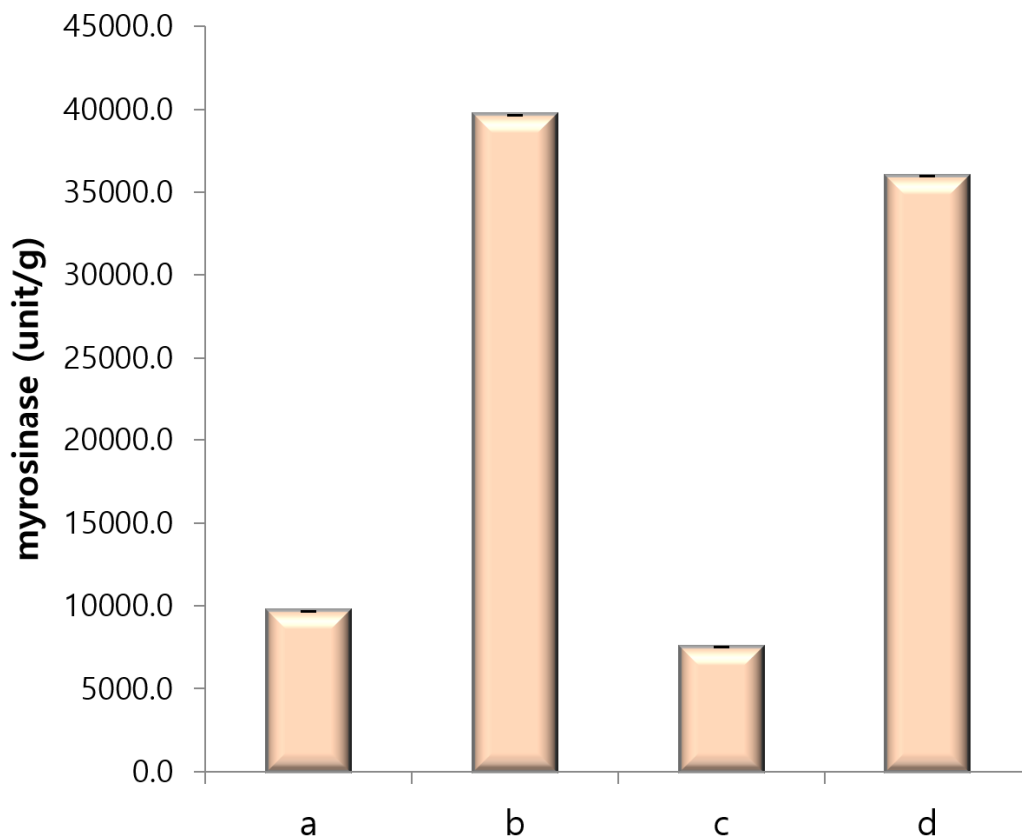


Figure 2-13. Enzymatic activity of myrosinase from Sri Lanka mustard seed and India mustard seed with or without oil expression.

- (a: Sri Lanka mustard seed without oil expression,
- b: Sri Lanka mustard seed with oil expression,
- c: India mustard seed without oil expression,
- d: India mustard seed with oil expression)

Table 2-9. Total amount of protein from the purification of Sri Lanka and India mustard seeds with or without oil expression.

Sample	mg/ml
boon food	17,451.67
royal	20,908.24
purified boon food after oil expression	38,177.98
purified royal after oil expression	9,446.99

Table 2-10a. Enzymatic activity of Sri Lanka mustard seeds without oil expression.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	2.188	2.152	2.137	2.13	2.132	2.133	2.133
units	-	31,839.62	6,633.255	17,099.06	483,785.4	387,028.3	322,523.6
units/mg	-	18.24	12.92	9.8	7.1	5.57	4.65

Table 2-10b. Enzymatic activity of India mustard seeds without oil expression.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	1.48	1.413	1.364	1.355	1.303	1.301	1.272
units	-	59,257.08	51,297.17	399,469.3	39,136.2	31,662.74	30,660.38
units/mg	-	56.68	49.07	35.25	37.44	30.29	29.33

Table 2-10c. Enzymatic activity of Sri Lanka mustard seeds with oil expression.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	2.333	2.302	2.302	2.277	2.284	2.276	2.28
units	-	27,417.45	13,708.73	16,509.43	10,834.32	10,082.55	7,812.5
units/mg	-	14.36	7.18	8.65	5.68	5.28	4.09

Table 2-10d. Enzyme activity of India mustard seeds with oil expression.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	1.555	1.544	1.515	1.501	1.472	1.433	1.428
units	-	9,728.774	17,688.68	15,919.81	18,352	21,580.19	18,720.52
units/mg	-	20.6	37.45	33.7	38.85	45.69	39.63

6) 세포벽 효소 처리에 따른 겨자씨의 myrosinase 활성

겨자씨 세포 내의 myrosinase의 용출을 극대화하기 위해 겨자씨의 세포벽을 효과적으로 허무는 상용화 효소들을 처리하였다. Novozyme사의 Viscozyme[®] L (Cellulase, multi enzyme), Pectinex[®] Ultra Pulp (Pectin lyase), Fungamyl[®] 800L (Fungal alpha amylase) 0.5 %씩 30 분간 처리하여 5 분 간격으로 효소 활성을 측정하였다.

세포벽 효소 유무에 따른 겨자씨의 단백질 총량을 측정한 결과 세포벽 효소를 넣어 정제한 royal 겨자씨의 단백질은 9,447mg/ml, 세포벽 효소를 넣지 않고 정제한 인도 겨자씨의 단백질은 10,659.8 mg/ml로 세포벽 효소를 넣지 않았을 때 겨자씨의 단백질 총량이 더 높았다 (Table 2-11). 효소 활성은 저장 기간이 달라 효소 역가를 잃어 비교하기 어려웠지만, 겨자씨로부터 추출한 myrosinase를 -20 °C에서 보관 후 1달마다 측정한 결과로 시간이 지날수록 효소의 역가가 줄어드는 것을 알 수 있었고 (Fig. 2-14), 세포벽 분해 효소 단계로 myrosinase 단백질의 열변성을 일으키는 것을 확인하였다.

그러나 인도 겨자씨에 세포벽 효소 처리하여 효소 활성을 측정한 결과 효소처리 전 99,413.3 unit/g, 효소처리 후 116,808.3 unit/g으로 효소 활성이 약 1.17배 가량 증가하는 것을 확인하여 세포벽 효소를 사용하기로 최종결정하였다 (Fig. 2-15). 세포벽 효소 첨가와 착유 유무에 따른 효소 활성을 측정한 결과 음성대조군이 단순하게 물리적으로만 분쇄한 myrosinase의 활성은 18,647.8 unit/g, 세포벽 효소 첨가 후 77,838.2 unit/g이 나왔고, 겨자씨를 탈지하여 세포벽 효소 첨가 후 효소 활성은 108,077.5 unit/g으로 가장 높았다. 세포벽 효소 첨가 후 물리적으로 분쇄한 겨자씨로부터 정제한 myrosinase는 음성대조군에 비해 효소 활성이 4.17배 증가하였고, 착유 하여 탈지한 겨자씨를 세포벽 효소 첨가 후 물리적으로 분쇄한 겨자씨로부터 정제한 myrosinase는 음성대조군에 비해 효소 활성이 5.79배 증가하였다 (Fig. 2-16). 앞서 myrosinase의 추출 수율을 증대시키기 위해 인도 (royal) 겨자씨를 사용하여 겨자씨와 추출 용매 (extraction buffer)를 1:6 비율로 분쇄하고, 55-80 % ammonium sulfate 법으로 효소를 추출하였다. 겨자씨를 착유 후 효소를 추출하고 세포벽 효소 0.5 %를 첨가하였을 때 myrosinase의 추출 수율이 가장 좋다는 것을 확인하였다. 따라서 탈지한 겨자씨를 세포벽 효소 첨가 후 분쇄한 겨자씨로부터 정제한 myrosinase의 활성이 가장 높은 것을 볼 때 세포벽 효소와 착유를 동시에 진행했을 때 고농도의 myrosinase를 추출할 수 있다는 것을 확인하였다.

Table 2-11. Total amount of protein from mustard seeds with or without cell-wall enzymes.

Sample	mg/mL
purified royal with cell-wall enzymes	9,447
purified royal without cell-wall enzymes	10,659.8

Table 2-12a. Enzymatic activity of India mustard seeds purified with cell-wall enzymes.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	1.016	0.942	0.887	0.833	0.77	0.727	0.683
units	-	65,448.11	57,045.99	53,950.47	54,392.69	51,120.28	49,086.08
units/mg	-	138.56	120.77	114.22	115.15	108.23	103.92

Table 2-12b. Enzymatic activity of India mustard seeds purified without cell-wall enzymes.

min	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance (227 nm)	0.874	0.812	0.742	0.687	0.636	0.59	0.557
units	-	54834.91	58372.64	55129.72	52623.82	50235.85	46727.59
units/mg	-	102.88	109.52	103.43	98.73	94.25	87.67

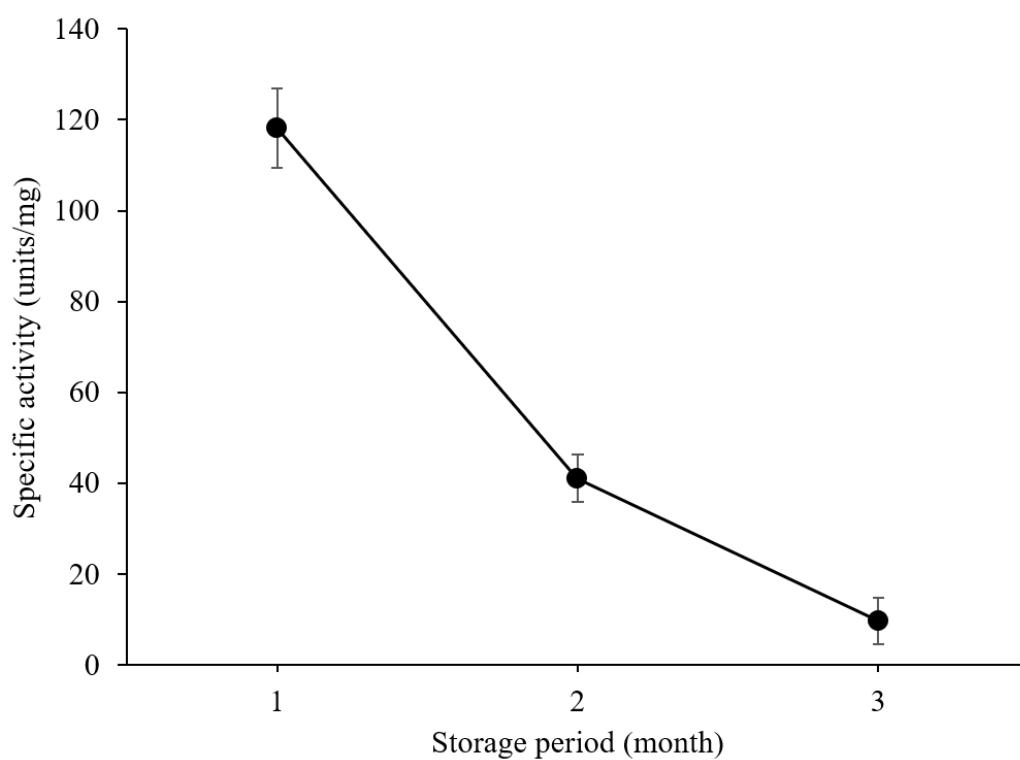


Figure 2-14. Enzymatic activity of purified myrosinase on the storage period.

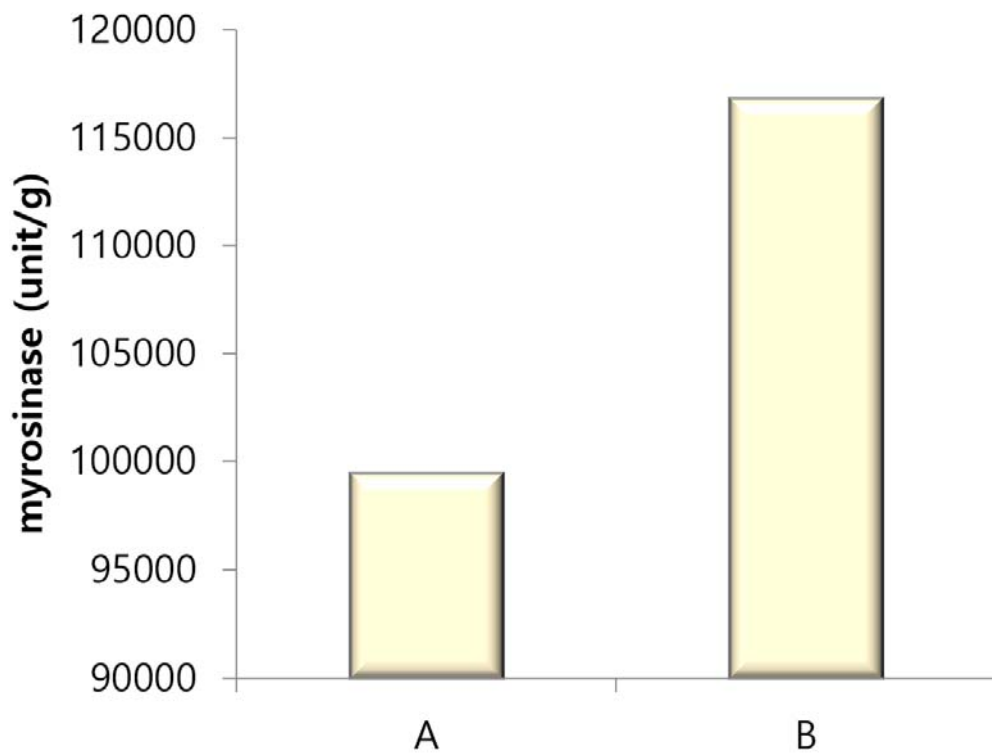


Figure 2-15. Enzymatic activity of India mustard seeds by cell-wall enzymes.
(A: no treatment of cell-wall enzymes, B: treatment of cell-wall enzymes)

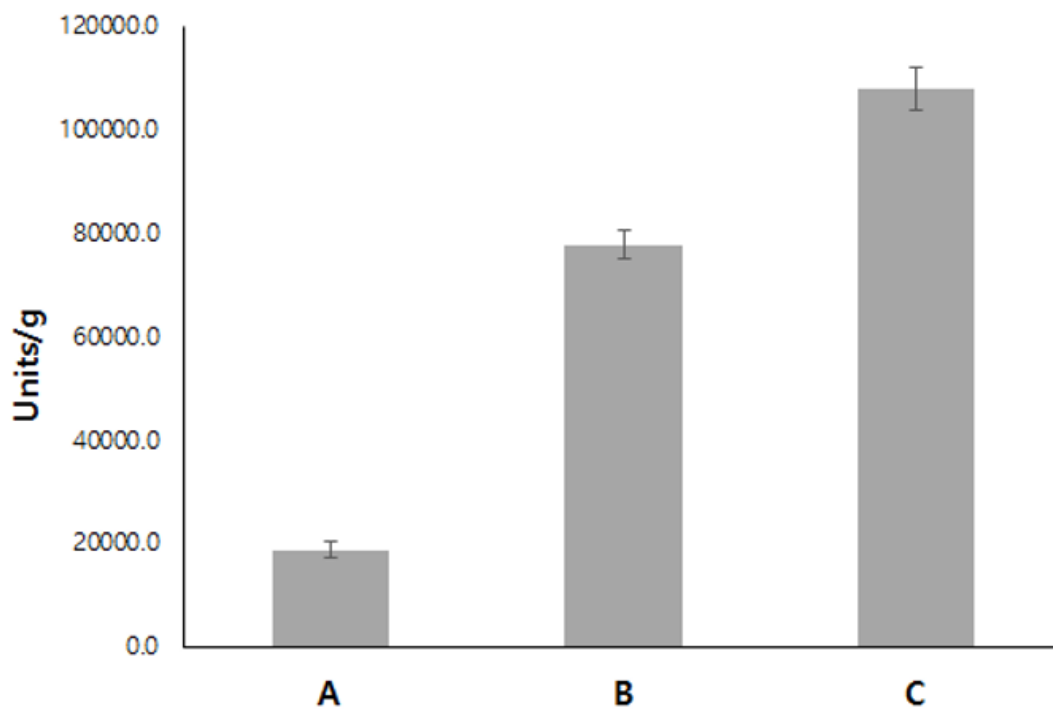


Figure 2-16. Enzymatic activity of India mustard seeds by adding cell-wall enzymes and removing fat.

A: myrosinase purified from the physically crushed mustard seed (negative control),

B: myrosinase purified from the physically crushed mustard seed after cell wall enzymes were added,

C: myrosinase purified from physically by using skimmed mustard seed

4. 요약

본 연구는 십자화과 식물로부터 마이로시네이즈 (myrosinase) 효소를 정제하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 십자화과 식물로부터 암모늄 설페이트 (ammonium sulfate; AS) 법을 이용하여 myrosinase를 경제적으로 정제하기 위해 수행하였다. 시판되는 myrosinase 정제 효소 (thioglucosidase, CAT number T4528)는 unit당 4,000원이 넘는 가격으로, 야채즙, 음료 등의 생산에는 적용할 수 없는 문제가 있었다 (1 unit의 정의 pH 6.0의 25°C 조건에서 sinigrin으로부터 1.0 μmol 의 glucose가 분해되어 발생하는 효소의 양). 따라서 경제적인 방법으로 마이로시네이즈 효소를 정제할 수 있는 방법의 개발이 요구되는데, 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 십자화과 채소인 브로콜리로부터, 컬럼 방식의 고순도 정제가 아닌, ammonium sulfate (AS)법을 이용하여 myrosinase를 경제적으로 정제할 수 있는 방법을 개발하였다.
십자화과 채소의 분쇄물에 50~60 % (w/v)의 AS를 처리하여 단백질을 침전시켜 제거한 후, 75~80 % (w/v)의 AS를 처리하여 myrosinase가 포함된 조단백질 (crude protein)을 침전시켜 분획하였다. 조단백질 분획을 수득 한 후, myrosinase 효소 활성을 측정하였는데 스리랑카 겨자씨 유래의 조단백질은 1 ℓ 기준 66.6 mg의 glucoraphanin (GR)을 넣어줬을 때 44.02 %의 GR이 sulforaphane (SFN)으로 전환되었으며, Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase (컬럼 방식의 정제)보다 약 2.6 % 높은 활성을 보였다.
- 2) 컬럼 방식의 정제법과 비교하여 AS법을 이용하여 정제한 myrosinase의 효소 역가도 우수함을 확인할 수 있었다. 두 단계 AS 정제법이 한 단계 AS 정제법에 비해 갖는 장점을 확인하고자, 1단계에서 55 %의 AS를 사용하고, 2단계에서 80%의 AS를 사용한 실험군 55-80 % AS와 80 %의 AS만 사용한 대조군 80 % AS의 정제 수율을 비교하였다. 55-80 % AS를 처리한 브로콜리의 SFN 함량이 80 % AS를 처리한 브로콜리의 SFN 함량 보다 2배 이상 높게 나타났다. 이와 같은 결과로부터 두 단계 AS 처리 방법이 한 단계 AS 처리 방법에 비해 myrosinase의 정제 수율이 훨씬 높았음을 알 수 있었다.

- 3) ESP (epithiospecifier proteins)의 불활성화에 따른 myrosinase의 정제 및 활성을 측정하였다. 우선 겨자씨의 분쇄물에 55 % (w/v)의 AS를 처리하여 단백질을 침전시켜 제거한 후 80 % (w/v)의 AS를 처리하여 myrosinase가 포함된 조단백질을 침전시켜 myrosinase 포함 조단백질 분획을 수득 하였다. 그 후, ESP 단백질을 불활성화하기 위해 수득한 myrosinase 포함 조단백질 분획을 버퍼 (buffer)에 녹여 60 °C에서 10 분간 열처리하였다 (실험군). 이때, 대조군은 ESP 단백질을 불활성화하기 위한 열처리 과정을 수행하지 않았다. ESP 단백질의 불활성화를 거친 경우 생성된 SFN 함량이 4,200 mg/dry kg으로 대조군의 SFN 함량 2,700 mg/dry kg에 비해 55 % 정도 더 높은 것으로 나타났다. 이로부터 ESP 단백질의 불활성화를 통해 효소 활성을 더 높일 수 있는 것으로 결론 내릴 수 있었다.
- 4) 착유한 겨자씨로부터 myrosinase 정제 및 활성을 측정하였다. Myrosinase는 수용성 물질로 정제하는 과정에서 지용성 성분을 제거하면 고농축의 myrosinase를 얻을 수 있을 거라고 판단하여 착유기 (리큘사의 오일 프레스 채유기)를 이용하여 겨자씨를 착유 한 후 정제하였고, 효소 활성을 enzymatic assay로 확인하였다. 착유한 겨자씨를 사용한 경우 30 분 동안 측정된 결과 39.63 units/mg의 활성을 나타냈고, 착유 하지 않은 겨자씨를 사용한 경우 30 분 동안 측정된 결과 29.33 units/mg의 활성을 나타냈다. 따라서 착유를 하는 것이 보다 높은 효소 활성을 나타낸 것으로 평가할 수 있었다.
- 5) 세포벽 분해효소의 처리 유무에 따른 myrosinase 효소의 활성 변화를 확인하였다. 세포벽을 효과적으로 허무는 상용화 효소들인 Novozyme사의 Viscozyme® L (Cellulase, multi enzyme), Pectinex® Ultra Pulp (Pectin lyase), Fungamyl® 800L (Fungal alpha amylase) 0.5 %씩 처리한 겨자씨를 사용하였다. 세포벽 분해효소를 넣지 않고 정제한 겨자씨를 이용한 샘플의 경우, 30 분 동안 측정된 결과 87.67 units/mg의 효소 활성을 보였다. 이에 반해 세포벽 분해 효소를 넣은 후 정제한 겨자씨를 이용한 샘플의 경우, 30분 동안 측정된 결과 103.92 units/mg의 효소 활성을 보였다. 이와 같은 결과로부터 세포벽 분해효소를 넣은 후 정제한 겨자씨를 이용한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 더 높은 효소 활성을 갖는 myrosinase를 수득 할 수 있었다.

5. 참고문헌

Abdul-Fadl, M. M., El-Badry, N., Ammar, M. S. 2011. Nutritional and chemical evaluation for two different varieties of mustard seeds. *World Applied Sciences Journal*. 15: 1225-1233.

Ahn, Y.-H., Hwang, Y., Liu, H., Wang, X. J., Zhang, Y., Stephenson, K. K., Boronina, T. N., Cole, R. N., Dinkova-Kostova, A. T., Talalay, P., Cole, P. A. 2010. Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 9590-9595.

Al-Shehbaz, I. A. 2012. A generic and tribal synopsis of the *Brassicaceae* (Cruciferae). *TAXON*. 61: 931-954.

Andrea, T., Cristina, A., Marco, M., Fabiana, M., Silvana, H., Patrizia, H. 2013. Sulforaphane as a Potential Protective Phytochemical against Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 1-10.

Andréasson, E., Jorgensen, L. B., Hoglund, A.-S., Rask, L., Meijer, J. 2001. Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *PLANT PHYSIOLOGY*. 127: 1750-1763.

Bai, Y., Wang, X., Zhao, S., Ma, C., Cui, J., Zheng, Y. 2015. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.

Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., Koubaa, M. 2016. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*. 3: 24.

Björkman, R., Janson, J.-C. 1972. Studies on myrosinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 276: 508-518.

Bones, A. M., Rossiter, J. T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*. 67: 1053-1067.

Bones, A. M., Rossiter, J. T. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*. 97: 194-208.

Borowki, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E., Zielinski, H. 2008. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology*. 226: 459-465.

Brabban, A. D., Edwards, C. 1994. Isolation of glucosinolate degrading microorganisms and their potential for reducing the glucosinolate content of rapemeal. *FEMS Microbiology Letters*. 119: 83-88.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Bridges, M., Jones, A. M. E., Bones, A. M., Hodgson, C., Cole, R., Bartlet, E., Wallsgrove, R., Karapapa, V. K., Watts, N., Rossiter, J. T. 2002. Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 269: 187-191.

Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E., Park, B. K. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*. 85: 705-717.

Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., Henrissat, B. 2000. High Resolution X-ray Crystallography Shows That Ascorbate Is a Cofactor for Myrosinase and Substitutes for the Function of the Catalytic Base. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 39385-39393.

Burmeister, W. P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S., Henrissat, B. 1997. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*. 5: 663-676.

Cheng, D.-L., Hashimoto, K., Uda, Y. 2004. In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food and Chemical Toxicology*. 42: 351-357.

Chi, X., Zhang, R., Shen, N., Jin, Y., Alina, A., Yang, S., Lin, S. 2015. Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced ischemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway. *Hepatology International*. 9: 321-329.

Chu, M., Seltzer, T. F. 2010. Myxedema Coma Induced by Ingestion of Raw Bok Choy. *New England Journal of Medicine*. 362: 1945-1946.

Clarke, J. D., Hsu, A., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F., Ho, E. 2011. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacological Research*. 64: 456-463.

Clarke, J. D., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F., Ho, E. 2011. Comparison of isothiocyanate metabolite levels and histone deacetylase activity in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 10955-10963.

Cole, R. 1983. Isothiocyanates nitriles and thiocyanates and products of autolysis of glucosinolates in cruciferae. *Phytochemistry*. 15: 759-762.

Cole, T. C. H., Hilger, H. H., Stevens, P. F. 2019. Angiosperm Phylogeny Poster - Flowering plant systematics.

Coles, B. F., Kadlubar, F. F. 2003. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *BioFactors*. 17: 115-130.

Cottaz, S., Rollin, P., Driguez, H. 1997. Synthesis of 2-deoxy-2-fluoroglucotropaeolin, a thioglucosidase inhibitor. *Carbohydrate Research*. 298: 127-130.

Dong, Z., Shang, H., Chen, Y. Q., Pan, L.-L., Bhatia, M., Sun, J. 2016. Sulforaphane Protects Pancreatic Acinar Cell Injury by Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3 Inflammatory Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-12.

Draghici, G. A., Lupu, M. A., Borozan, A. B., Nica, D., Alda, S., Alda, L., Gogoasa, I., Gergen, I., Bordean, D. M. 2013. Red cabbage, millennium's functional food. *Jo*. 17: 52-55.

Durham, P. L., Poulton, J. E. 1989. Effect of Castanospermine and Related Polyhydroxyalkaloids on Purified Myrosinase from *Lepidium sativum* Seedlings. *PLANT PHYSIOLOGY*. 90: 48-52.

Eastwood, M, A. 1999. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease?. *Quarterly Journal of Medicine*. 92: 527-530.

Economopoulos, K., Choussein, S., Vlahos, N. F. Sergentanis, T. N. 2010. GSTM1 polymorphism, GSTT1 polymorphism, and cervical cancer risk: a meta-analysis. *International Journal of Gynecological Cancer*. 20: 1576-1580.

Edger, P. P., Tang, M., Bird, K. A., Mayfield, D. R., Conant, G., Mummenhoff, K., Koch, M. A., Pires, J. C. 2014. Secondary Structure Analyses of the Nuclear rRNA Internal Transcribed Spacers and Assessment of Its Phylogenetic Utility across the Brassicaceae (Mustards). *PLoS ONE*. 9: e101341.

Egner, P. A., Chen, J.-G., Zarth, A. T., Ng, D. K., Wang, J.-B., Kensler, K. H., Jacobson, L. P., Munoz, A., Johnson, J. L., Groopman, J. D., Fahey, J. W., Talalay, P., Zhu, j., Chen, T.-Y., Qian G.-S., Camella, S. G., Hecht, S. S., Kensler, T. W. 2014. Rapid and Sustainable Detoxication of Airborne Pollutants by Broccoli Sprout Beverage: Results of a Randomized Clinical Trial in China. *Cancer Prevention Research*. 7: 813-823.

Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A., Rimbault, A. 2001. Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiology Letters*. 197: 99-103.

El-Sayed, S. T., Jwanny, E. W., Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Abdallah, N. M. 1995. Glycosidases in plant tissues of some brassicaceae screening of different cruciferous plants for glycosidases production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 55: 219-230.

Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7610-7615.

Fahey, J. W., Wehage, S. L., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W., Egner, P. A., Shapiro, T. A., Talalay, P. 2012. Protection of Humans by Plant Glucosinolates: Efficiency of Conversion of Glucosinolates to Isothiocyanates by the Gastrointestinal Microflora. *Cancer Prevention Research*. 5: 603-611.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56: 5-51.

Fahey, J. W., Zhang, Y., Talalay, P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 10367-10372.

Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J., VanEtten, C. H. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 18: 123-201.

Galan, M. V., Kishan, A. A., Silverman, A. L. 2004. Oral Broccoli Sprouts for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Preliminary Report. *Digestive Diseases and Sciences*. 49: 1088-1090.

Ghawi, S. K., Methven, L., Rastall, R. A., Niranjana, K. 2012. Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage: A kinetic study. *Food Chemistry*. 131: 1240-1247.

Gimsing, A. L., Kirkegaard, J. A. 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews*. 8: 299-310.

Guerrero-Beltrán, C. E., Calderón-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J., Chirino, Y. I. 2012. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64: 503-508.

Gupta, P., Kim, B., Kim, S.-H., Srivastava, S. K. 2014. Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58: 1685-1707.

Halkier, B. A., Gershenzon, J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 303-333.

Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A., Lozniewski, A. 2003. Efficacy of Sulforaphane in Eradicating *Helicobacter pylori* in Human Gastric Xenografts Implanted in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3982-3984.

Hayes, J. D., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*. 47: 73-88.

Hecht, S. S. 1995. Chemoprevention by isothiocyanates. *Journal of Cellular Biochemistry*. 59: 195-209.

Henrissat, B., Davies, J. G. 2000. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases: Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology*. 124: 1515-1519.

Higdon, J., Delage, B., Williams, D., Dashwood, R. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*. 55: 224-236.

Houghton, C. A., Fassett, R. G., Coombes, J. S. 2013. Sulforaphane: Translational research from laboratory bench to clinic. *Nutrition Reviews*. 71: 709-726.

Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M. R., Khor, T. O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J. Y., Kong, A.-N. T. 2006. Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Sciences*. 79: 1944-1955.

Husebye, H., Arzt, S., Burmeister, W. P., Härtel, F. V., Brandt, A., Rossiter, J. T., Bones, A. M. 2005. Crystal structure at 1.1Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 1311-1320.

International Agency for Research on Cancer. Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles. *Cruciferous vegetables*. France: IARC; 2004: 1-12.

Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. 2014. Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of Brassicaceae Vegetables. *Breeding Science*. 64: 48-59.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes and Development*. 13: 76-86.

Iversen, T.-H., Baggerud, C. 1980. Myrosinase Activity in Differentiated and Undifferentiated Plants of Brassicaceae. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*. 97: 399-407.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. 2016. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Fourthed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

Kim, M. R., Kim, J. H., Wi, D. S., Na, J. H., Sok, D. E. 1999. Volatile sulfur compounds, proximate components, minerals, vitamin C content and sensory characteristics of the juices of kale and broccoli leaves. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 28: 1201-1207.

Kirsh, V. A., Peters, U., Mayne, S. T., Subar, A. F., Chatterjee, N., Johnson, C. C., Hayes, R. B. 2007. Prospective Study of Fruit and Vegetable Intake and Risk of Prostate Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 99: 1200-1209.

Koroleva, O. A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M. R., Tomos, A. D., Hedrich, R. 2000. Identification of a New Glucosinolate-Rich Cell Type in *Arabidopsis* Flower Stalk. *Plant Physiology*. 124: 599-608.

Kraft, A. D., Johnson, D. A., Johnson, J. A. 2004. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occur preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *Journal of Neuroscience*. 24: 1101-1112.

Kumar, G., Tuli, H. S., Mittal, S., Shandilya, J. K., Tiwari, A., Sandhu, S. S. 2015. Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumor Biology*. 36: 4005-4016.

Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., Wallig, M. A., Juvik, J. A. 1999. Carotene, Tocopherol, and Ascorbate Contents in Subspecies of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1576-1581.

Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., Gershenzon, J. 2001. The *Arabidopsis* Epithiospecifier Protein Promotes the Hydrolysis of Glucosinolates to Nitriles and Influences *Trichoplusia ni* Herbivory. *Plant Cell*. 13: 2793-2808.

Lampe, J. W., Peterson, S. 2002. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *Journal of Nutrition* . 132: 2991-2994.

Le, H. T., Schaldach, C. M., Firestone, G. L., Bjeldanes, L. F. 2003. Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane Is a Strong Androgen Antagonist in Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 21136-21145.

Lenman, M., Rodin, J., Josefsson, L.-G., Rask, L. 1990. Immunological characterization of rapeseed myrosinase. *European Journal of Biochemistry*. 194: 747-753.

Li, F., Hullar, M. A. J., Beresford, S. A. A., Lampe, J. W. 2011. Variation of glucoraphanin metabolism in vivo and ex vivo by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 106: 408-416.

Li, X., Kushad, M. M. 2005. Purification and Characterization of Myrosinase From Horseradish (*Armoracia Rusticana*) Roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 503-511.

Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Yu, Y., Clouthier, S. G., Schwartz, S. J., Wicha, M. S., Sun, D. 2010. Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*. 16: 2580-2590.

Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., Liu, Y. M. 2006. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 473-476.

Lönnerdal, B., Janson, J.-C. 1973. Studies on myrosinases. II. Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 315: 421-429.

Luang-In, V., Albaser, A. A., Nueno-Palop, C., Bennett, M. H., Narbad, A., Rossiter, J. T. 2016. Glucosinolate and Desulfo-glucosinolate Metabolism by a Selection of Human Gut Bacteria. *Current Microbiology*. 73: 442-451.

Ludikhuyze, L., Ooms, V., Weemaes, C., Hendrickx, M. 1999. Kinetic Study of the Irreversible Thermal and Pressure Inactivation of Myrosinase from Broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1794-1800.

Lüthy, B., Matile, P. 1984. The mustard oil bomb: Rectified analysis of the subcellular organisation of the myrosinase system. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*. 179: 5-12.

Maggioni, L., von Bothmer, R., Poulsen, G., Branca, F. 2010. Origin and Domestication of Cole Crops (*Brassica oleracea* L.): Linguistic and Literary Considerations¹. *Economic Botany*. 64: 109-123.

MacLeod, A. J. 1974. Volatile flavour compounds of the cruciferae. In: Vaughan, J. G., MacLeod, A. J., Jones, B. M. G (ed.). *The biology and chemistry of the Cruciferae*. Academic, London. pp. 307-330.

Matusheski, N. V. 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*. 65: 1273-1281.

Matusheski, N. V., Juvik, J. A., Jeffery, E. H. 2003. Sulforaphane content and bioactivity of broccoli sprouts are enhanced by heat processing: A role for epithiospecifier protein. *FASEB Journal*. 17: A377.

McNaughton, S. A., Marks, G. C. 2003. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *British Journal of Nutrition*. 90: 687-697.

Michaud, D. S., Spiegelman, D., Clinton, S. K., Rimm, E. B., Willett, W. C., Giovannucci E. L. 1999. Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 91(7): 605-613.

Minarini, A., Milelli, A., Fimognari, C., Simoni, E., Turrini, E., Tumiatti, V. 2014. Exploring the effects of isothiocyanates on chemotherapeutic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 10: 25-38.

Minich, D. M., Bland, J. S. 2008. A Review of the Clinical Efficacy and Safety of Cruciferous Vegetable Phytochemicals. *Nutrition Reviews*. 65: 259-267.

Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., Das, D. K. 2008. Broccoli: A Unique Vegetable That Protects Mammalian Hearts through the Redox Cycling of the Thioredoxin Superfamily. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 609-617.

Munday, R., Mhaweck-Fauceglia, P., Munday, C. M., Paonessa, J. D., Tang, L., Munday, J. S., Lister, C., Wilson, P., Fahey, J. W., Davis, W., Zhang, Y. 2008. Inhibition of Urinary Bladder Carcinogenesis by Broccoli Sprouts. *Cancer Research*. 68: 1593-1600.

Murillo, G., Mehta, R. G. 2001. Cruciferous Vegetables and Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 41: 17-28.

Nakamura, Y., Yoshimoto, M., Murata, Y., Shimoishi, Y., Asai, Y., Park, E. Y., Kenji, S., Nakamura, Y. 2007. Papaya Seed Represents a Rich Source of Biologically Active Isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4407-4413.

Nonnecke, I. L. 1989. Vegetable Production. Springer-Verlag New York, LLC. pp. 394.

Nugrahed, P. Y., Verkerk, R., Widianarko, B., Dekker, M. 2015. A Mechanistic Perspective on Process-Induced Changes in Glucosinolate Content in Brassica Vegetables: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 55: 823-838.

Ohtsuru, M., Hata, T. 1972. Molecular Properties of Multiple Forms of Plant Myrosinase. Agricultural and Biological Chemistry. 36: 2495-2503.

Ohtsuru, M., Kawatani, H. 1979. Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica*: Purification and some properties of wasabi myrosinase. Agricultural and Biological Chemistry. 43: 2249-2255.

Okazaki, K., Umemura, T., Imazawa, T., Nishikawa, A., Masegi, T., Hirose, M. 2003. Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats after initiation. Cancer Science. 94: 948-952.

Okunade, O. A., Ghawi, S. K., Methven, L., Niranjana, K. 2015. Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds. Food Chemistry. 187: 485-490.

Palmieri, S., Iori, R., Leoni, O. 1986. Myrosinase from *Sinapis alba* L.: a new method of purification for glucosinolate analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 34: 138-140.

Park, N. I., Kim, J. K., Park, W. T., Cho, J. W., Lim, Y. P., Park, S. U. 2010. An efficient protocol for genetic transformation of watercress (*Nasturtium officinale*) using *Agrobacterium rhizogenes*. Molecular Biology Reports. 38: 4947-4953.

Paul, M. H., Scarlett, G., Felix, B., Shantel, A. V., Victoria, N., Steven, A. J., Paul, C. E., Felicity, N. E. G. 2017. Sulforaphane Induces Neurovascular Protection Against a Systemic Inflammatory Challenge via Both Nrf2-Dependent and Independent Pathways. *Vascular Pharmacology*. 85: 29-38.

Pérez, C., Barrientos, H., Román, J., Mahn, A. 2014. Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets. *Food Chemistry*. 145: 264-271.

Pessina, A., Thomas, R. M., Palmieri, S., Luisi, P. L. 1990. An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 280: 383-389.

Qi, T., Xu, F., Yan, X., Li, S., Li, H. 2016. Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 37: 182-188.

Reese, E. T., Clapp, R. C., Mandels, M. 1958. A thioglucosidase in fungi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 75: 228-242.

Schmidt, R., Acarkan, A., Boivin, K. 2001. Comparative structural genomics in the Brassicaceae family. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 253-262.

Rouzaud, G., Young, S. A., Duncan, A. J. 2004. Hydrolysis of Glucosinolates to Isothiocyanates after Ingestion of Raw or Microwaved Cabbage by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 13: 125-131.

Seow, A., Shi, C. Y., Chung, F. L., Jiao, D., Hankin, J. H., Lee, H. P., Coetzee, G. A., Yu, M. C. 1998. Urinary total isothiocyanate (ITC) in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore: relationship with dietary total ITC and glutathione S-transferase M1/T1/P1 genotypes. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 7: 775-856.

Sestili, P., Fimognari, C. 2015. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 2015: 1-9.

Shams, R., Abu-Khudir, R., Ali, E. M. 2017. Sulforaphane, polyphenols and related anti-inflammatory and antioxidant activities changes of Egyptian broccoli during growth. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11: 2061-2068.

Shikita, M., Fahey, J. W., Golden, T. R., Holtzclaw, D., Talalay, P. 2000. An unusual case of “uncompetitive activation” by ascorbic acid: Purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Journal of Biochemistry*. 341: 725-732.

Singh, S. V., Singh, K. 2012. Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*. 33: 1833-1842.

Sok, D. E., Kim, J. H., Kim, M. R. 2003. Isolation and identification of bioactive organosulfur phytochemicals from solvent extract of broccoli. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32: 315-319.

Soltis, P. S., Soltis, D. E., Chase, M. W. 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a research tool for comparative biology. *Nature*. 402: 402-404.

Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Stoin, D., Pirsan, P., Radu, F., Poiana, M.-A., Alexa, E., Dogaru, D. 2009. Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (*Brassica nigra*) seeds. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 7: 44-47.

Sumner, J. B. 1925. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *Journal of Biological Chemistry*. 65: 393-395.

Taipalensuu, J., Falk, A., Rask, L. 1996. A Wound- and Methyl Jasmonate-Inducible Transcript Coding for a Myrosinase-Associated Protein with Similarities to an Early Nodulin. *Plant Physiology*. 110: 483-491.

Talalay, P., de Long, M. J., Prochaska, H. J. 1988. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 8261-8265.

Tang, L., Zhang, Y. 2004. Isothiocyanates in the Chemoprevention of Bladder Cancer. *Current Drug Metabolism*. 5: 193-201.

Tani, N., Ohtsuru, M., Hata, T. 1974. Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 38: 1623-1630.

Van Eylen, D., Indrawati, M., Hendrickx, A., Van Loey, A. 2006. Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba L*) myrosinase. *Food chemistry*. 97: 263-271.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A. 2008. Behavior of mustard seed (*Sinapis alba L*) myrosinase during temperature/pressure treatments: A case study on enzyme activity and stability. *European Food Research and Technology*. 226: 545-553.

van Die, M. D., Bone, K. M., Emery, J., Williams, S. G., Pirodda, M. V., Paller, C. J. 2016. Phytotherapeutic interventions in the management of biochemically recurrent prostate cancer: a systematic review of randomised trials. *BJU International*. 117: 17-34.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R. D., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M. 2009. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53: S219.

Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Dose, J., Schultheiss, G., Rimbach, G. 2012. Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate--role of Nrf2, NF-(kappa) B and microRNA-155. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16: 836-843.

Wanasundara, J. 2008. Mustard as an Ingredient in food processing: Current uses and the potential. In: *Mustard Grower*, Mar 2008 Issue Mar. 2008 ed., Canada: Saskatchewan Mustard Development Commission. pp. 3-5.

Wang, Y., Zhang, Z., Sun, W., Tan, Y., Liu, Y., Zheng, Y., Liu, Q., Cai, L., Sun, J. 2014. Sulforaphane Attenuation of Type 2 Diabetes-Induced Aortic Damage Was Associated with the Upregulation of Nrf2 Expression and Function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-11.

Wise, R. A., Holbrook, J. T., Criner, G., Sethi, S., Rayapudi, S., Sudini, K. R., Sugar, E. A., Burke, A. Thimmulappa, R., Singh, A., Talalay, P., Fahey, J. W., Berenson, S., Jacobs M. R., Biswal, S. 2016. Lack of Effect of Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. *PLOS ONE*. 11: e0163716.

Xuling, S., Xin, J., Lingbin, M., Xiaoming, D., Yanjun, S., Ying, X. 2018. Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 1-10.

Yanaka, A., Fahey, J. W., Fukumoto, A., Nakayama, M., Inoue, S., Zhang, S., Tauchi, M., Suzuki, H., Hyodo, I., Yamamoto, M. 2009. Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in Helicobacter pylori-Infected Mice and Humans. *Cancer Prevention Research*. 2: 353-360.

Yang, B., Xiaolu, W., Song, Z., Chunye, M., Jiuwei, C., Yang, Z. 2015. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.

Yen, G. C., Wei, Q. K. 1993. Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 61: 471-475.

Yuan, J.-M., Stepanov, I., Murphy, S. E., Wang, R., Allen, S., Jensen, J., Strayer, L., Adams-Haduch, J., Upadhyaya, P., Le, C., Kurzer, M. S., Nelson, H. H., Yu, M. C., Hatsukami, D., Hecht, S. S. 2016. Clinical Trial of 2-Phenethyl Isothiocyanate as an Inhibitor of Metabolic Activation of a Tobacco-Specific Lung Carcinogen in Cigarette Smokers. *Cancer Prevention Research*. 9: 396-405.

Zhang, Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 555: 173-190.

Zhao, H., Lin, J., Grossman, H. B., Hernandez, L. M., Dinney, C. P., Wu, X. 2007. Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *International Journal of Cancer*. 120: 2208-2213.

Zhao, Z., Liao, G., Zhou, Q., Lv, D., Holthfer, H., Zou, H. 2016. Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-12.

Zeng, L., Zhang, Q., Sun, R., Kong, H., Zhang, N., Ma, H. 2014. Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. Nature Communications. 5: 4956.

국가표준식품성분. 2013. 농촌진흥청.

김영욱, 장석우, 성기철. 2003. 양채류재배(표준영농교본 48). 농촌진흥청.

박명윤, 이건순, 박선주. 2010. 파워푸드 슈퍼푸드. 푸른행복.

IV. 고품량 sulforaphane 추출을 위한 효소처리 조건 최적화

1. ABSTRACT

This research is concerned with the method of producing a high content sulforaphane (SFN); more specifically, it was conducted on the method of producing a high yield of SFN from a cruciferous plant by preventing SFN from being compounded by treating phenyl isothiocyanate (PITC). In the cruciferous plant such as broccoli, kohlabi, red beet, and cabbage, there is a glucoraphanin (GR) of the glucosinolate group in the form of a glycoside synthesized with sugar. It is hydrolyzed into sugar and non-sugar and is produced with SFN of the group of isothiocyanate, which is reported to have a possibility of possessing functional properties such as antioxidant and anti-cancer. However, when SFN is produced by the myrosinase enzyme, it brings about taking a negative effect in obtaining SFN by the way in which nucleophile (most proteins, peptides or amino acids) in the plant forms the sulforaphane conjugate with SFN. In order to address the problem, and develop a method to obtain sulforaphane from a cruciferous plant with high yield, the results are as follow:

- 1) In order to establish the concentration conditions of the enzyme myrosinase, myrosinases extracted from four mustard seeds (from USA, India, Sri Lank and Canada) on the same condition were mixed by the same ratio and were treated with broccoli crushing solution depending on concentrations. For two hours the treatment of the enzyme was conducted at 60 °C after myrosinase mixed with broccoli grinding solution was added at a sequence of 1 %, 5 %, 10 % and then myrosinase manufactured by Sigma-Aldrich Company was added 5 %. Less SFN content was detected. Despite adding myrosinase from Sigma-Aldrich, the fact that it has less SFN than the negative control group showed the result in which there are a variety

of proteins and as higher the concentration of refined myrosinase is, the more the protein content increased and it decreased by mixing with SFN.

- 2) A broccoli sprout known to have a higher SFN content than broccoli was obtained. It was crushed under the same conditions (broccoli: water=1:4), all of which showed substantial difference from broccoli. The broccoli sprout with the highest content was 3,800 mg/kg, which was 63 times higher than broccoli. When myrosinase extracted from mustard seeds and broccoli was added, the higher result was shown, and when adding mustard seeds, the content of SFN increased by 3.2 times. In addition, it showed that myrosinase derived from mustard seeds and broccoli can be activated and myrosinase derived from mustard seeds in comparison with that from broccoli was more effective. As mentioned earlier, ESP (epithiospecifier protein) prevents the action of myrosinase and converts GR into sulforaphane nitrile. After heat treatment of broccoli sprouts at 100 °C for 20 minutes, in order to remove ESP the treatment of heat was conducted at 60 °C for ten minutes. An experiment was conducted to reduce the action of ESP and maximize the content of SFN. The treatment of heat inactivated ESP, which led to an increase in the size of content but did not show much difference; therefore, PITC treatment was conducted.
- 3) In order to conduct the experiment, after treating PITC of 100 g/ℓ in the pulverized solution obtained by crushing broccoli heat treated at 100 °C for 20 minutes, and after centrifugation was conducted for two hours at a rate of 10,000 rpm, a supernatant was obtained. After treating myrosinase with 5 % of the obtained supernatant, the reaction was induced at 40 °C for two hours, and the amount of sulforaphane present in the reaction solution sample was measured. Meanwhile, in the case of the control group, after myrosinase was treated by 5 % at the broccoli crushed liquid, the sample treated at 40 °C for two hours, after treating PITC at the broccoli crushed liquid, was used. As a result of the experiment to compare the amount of production depending on the treatment of PITC, it was confirmed that the content of SFN improved by 5.7 % compared with that of the control sample, which did not treat PITC.

4) By treating PITC and eliminating unnecessary proteins pure SFN was obtained and experiments were conducted to establish the temperature of enzyme treatment and the pH condition. Enzyme is the main component of protein and the rate of activity and reaction vary depending on the concentration of hydrogen ions. In order to establish the optimal pH condition, pH was adjusted with acetic acid and NaOH. As a result of checking the safety depending on the temperature of SFN and pH, it showed a peak of activity at 40 °C and pH was best at pH 4-5; however, the acidity was too low and in the following experiments, the supernatant treated with PITC was used at pH 5.5.

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용된 미국산 겨자씨는 FRONTIER, 인도산 겨자씨는 ROYAL Organic, 스리랑카산 겨자씨는 Boon Foods, 캐나다산 겨자씨는 솔표식품에서 구입하여 사용하였으며, Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase를 표준품으로 사용하였다. 브로콜리 새싹은 5곳 (초록이슬, 채소파는가게, 희망채, 하늘땅, 천지가약초)에서 구입하여 사용하였다.

2) 브로콜리의 효소처리에 따른 sulforaphane 함량 분석

브로콜리와 증류수를 1:4 비율로 믹서기를 이용하여 3 분간 분쇄하였다. Conical tube에 20 ml씩 나누어 담고 water bath에 60 °C, 10 분간 열처리한 뒤 얼음물에서 10 분간 냉각하였다. 냉각한 브로콜리에 정제 myrosinase 효소 20 % 넣어주었고, shaking incubator에서 250 rpm, 40 °C, 3 시간 열처리하여 0.45 µm syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

3) 브로콜리액에 농도별로 효소처리 후 sulforaphane 함량 분석

브로콜리와 증류수를 1:2 비율로 믹서기를 이용하여 5 분간 분쇄하였다. 50 ml conical tube에 10 g 나누어 담고 Vit C 80 µl (0.1 g/ml)를 첨가하였다. 겨자씨 정제한 myrosinase를 모두 1:1 비율로 섞어 sample마다 1, 5, 10 %씩 넣어 vortex하였다.

4) 가열한 브로콜리에 겨자가루를 넣었을 때 sulforaphane 함량 분석

실험 전 브로콜리를 4 °C에서 24 시간 방치하였다. 브로콜리를 4 cm씩 잘라 200 g을 사용하고 팩에 넣어 밀봉한 뒤 water bath 100 °C에서 20 분간 열처리하였다. 열처리한 브로콜리와 증류수 100 ml를 넣고 믹서기를 이용하여 분쇄하였다. 브로콜리액 65 g과 겨자가루 (30 µm mesh를 사용하여 걸러준 가루 사용) 0.21 g을 넣고 섞어주었다. Shaking incubator에서 250 rpm, 37.5 °C, 2 시간 열처리하여 0.45 µm syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

5) 브로콜리 분쇄액의 pH에 따른 sulforaphane 함량 분석

브로콜리와 증류수를 1:4 비율로 믹서기를 이용하여 3 분간 분쇄하였다. 비커에 200 ml씩 나누어 담고 pH meter를 이용하여 acetic acid, NaOH로 조정하였다. pH 맞춘 브로콜리액을 conical tube에 나누어 담았다. Shaking incubator 250 rpm, 40 °C, 3 시간 열처리한 뒤 얼음물에서 10 분간 냉각하였다. 냉각 후 0.45 µm syringe filter로 여과 후 HPLC 분석하였다.

6) PITC 처리 후 SFN 형성 및 안정성

브로콜리를 진공하여 water bath 100 °C에서 20 분간 열처리한 뒤 얼음물에서 20 분간 냉각하였다. 브로콜리와 증류수를 1:2 비율로 믹서기를 이용하여 3 분간 분쇄하고 10,000 rpm 10 분간 원심분리 후 상등액을 사용하였다. 각 sample 별로 조건에 맞게 myrosinase를 첨가하였다. Shaking incubator 250 rpm, 37 °C, 2 시간 반응하고 10,000 rpm 10 분간 원심분리 후 상등액만 사용하였다. 상등액에 시그마 SFN 20 mg/ℓ 첨가 후 HPLC를 통해 분석하였다.

증류수를 이용하여 브로콜리 농축액을 200배 희석하여 0.45 µm syringe filter로 여과하였다. 여과한 브로콜리 농축액 91.2 ml와 PITC 8.8 ml를 첨가하여 혼합하였다. Shaking incubator 250 rpm, 37 °C, 2 시간 반응하고 10,000 rpm, 10 분간 원심분리 후 상등액을 사용하였다. 브로콜리 농축액 상등액에 Sigma-Aldrich사 SFN 20 mg/ℓ 첨가 후 HPLC를 통해 분석하였다.

7) 통계분석

실험 결과는 통계분석 프로그램 SPSS statistics (SPSS ver. 12.0, SAS Inc.)를 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였고, 유의성 검정은 ANOVA를 이용하였다. Duncan 다중 검정 (Duncan's multiple range test)을 통해 P=0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

고함량 sulforaphane (SFN)이 함유된 브로콜리액을 만들기 위해 겨자씨로부터 산업적으로 이용이 가능한 효소 myrosinase를 추출하는 방법을 구축하였고, SFN의 함량을 극대화하기 위해 온도, myrosinase의 비율, pH 등 다양한 실험을 통해 효소처리 조건을 확립하고자 하였으며, SFN의 함량이 높다고 알려진 브로콜리 새싹을 확보하여 조건 실험을 진행하였다.

브로콜리 효소액으로 생성된 SFN 분석을 검증하기 위해서 HPLC 조건을 확립하였고, SFN 뿐만 아니라 isocyanate 물질은 AITC와 함께 HPLC로 분석한 결과 SFN과 AITC peak가 겹치지 않아 정량이 가능한 신뢰 수준의 크로마토그램을 확보하였으며, 브로콜리 효소액으로부터 생성되는 SFN을 정량할 수 있는 분석법을 구축하였다 (Fig. 3-2).

또한 브로콜리에 들어있는 glucoraphanin (GR)은 myrosinase에 의해 가수분해되어 SFN으로 전환된다 (Cole, 1983; Matusheski 등, 2004). 그러나 브로콜리에 들어있는 단백질인 epithiospectifier protein (ESP)은 GR을 sulforaphane nitrile로 전환 시키는 단백질로서 SFN 형성을 방해한다. 그러므로 ESP의 작용을 저해하고 SFN의 함량을 극대화하고자 하는 실험을 진행하였다.

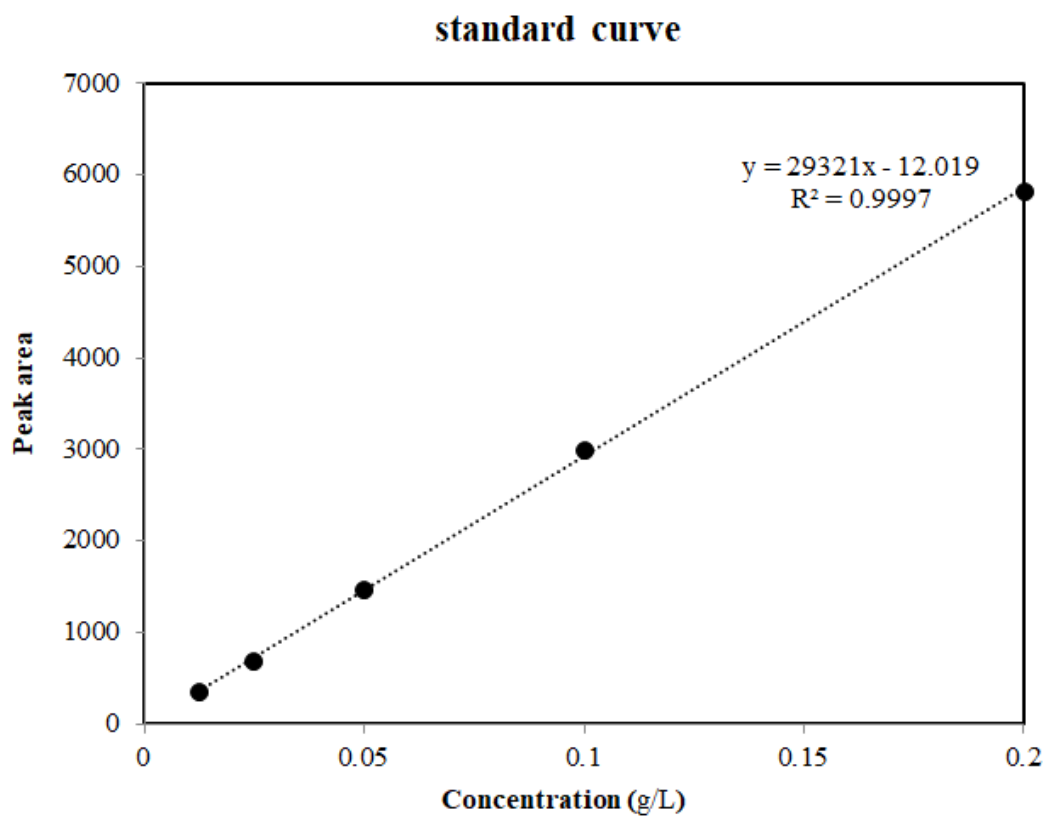


Figure 3-1. Quantitative analysis of sulforaphane.

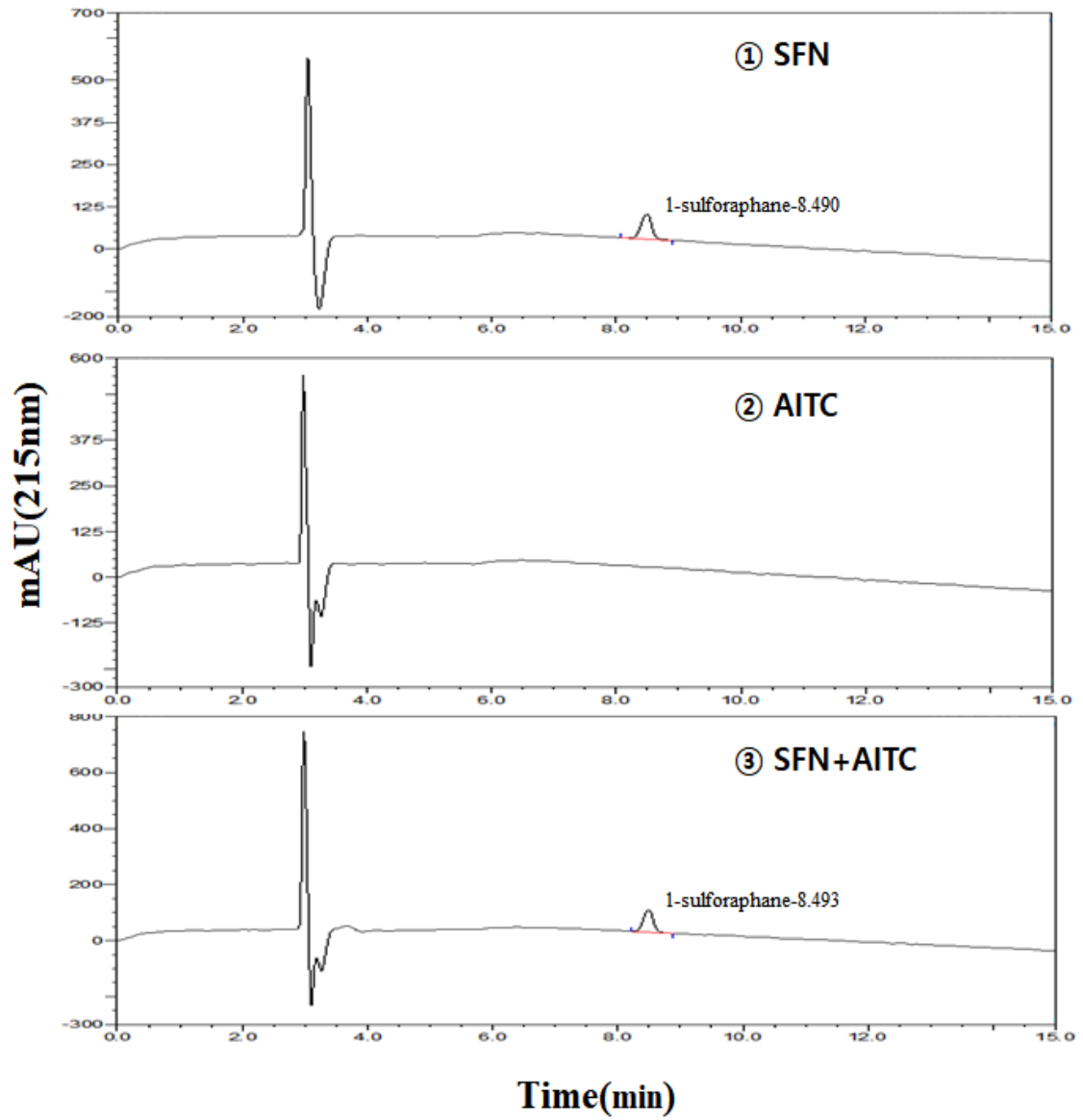


Figure 3-2. Quantitative analysis of SFN and AITC.

1) 구입처별 브로콜리의 효소처리에 따른 sulforaphane 함량

브로콜리의 재배 시기, 온도, 수분과 같은 재배조건에 따라 sulforaphane(SFN) 함량이 다르기 때문에 4곳의 마트(이마트에브리데이, OK mart, (주)곰식자재마트, OK point mart)에서 구입한 브로콜리에 효소 myrosinase를 처리했을 때와 하지 않았을 때 SFN의 함량을 HPLC를 통해 정량분석을 하였다.

4가지의 브로콜리의 분쇄액을 60 °C에서 10 분간 열처리를 한 후 효소처리를 하지 않은 브로콜리는 40 °C에서 3 시간, myrosinase를 20 % 처리한 브로콜리는 40 °C에서 3 시간 동안 효소처리를 진행하였다. 그 결과 OK mart에서 구입한 브로콜리에서 SFN 함량이 가장 높았으며, 같은 조건으로 효소처리를 했음에도 불구하고, 구입처마다 SFN의 생성량이 모두 다르며 적게는 약 1.14배 ((주)곰식자재마트)에서 최대 약 5배 (이마트에브리데이)까지 증가했다.

효소처리 유무에 따른 SFN 함량을 각각 측정한 결과 이마트에브리데이는 효소처리 전 171.11 mg/kg, 효소처리 후 846.85 mg/kg로 5배 정도 증가하였고, OK mart는 효소처리 전 1,060.06 mg/kg, 효소처리 후 867.87 mg/kg로 오히려 감소하였다. (주)곰식자재마트는 효소처리 전 714.71 mg/kg, 효소처리 후 813.81 mg/kg로 다소 증가하였고, OK point mart는 효소처리 전 366.37 mg/kg, 효소처리 후 906.9 mg/kg로 2.5배 정도 증가하였다. 브로콜리의 구입처에 따라 SFN 함량이 다르며, 효소 처리한 후에 OK mart를 제외한 3곳에서 SFN 함량이 증가했으며, 평균적으로는 SFN이 증가했다고 할 수 있다 (Fig. 3-3a, 3-3b). 이와 같이 구입처별로 브로콜리의 sulforaphane 함량에 많은 차이를 보였으며, 효소처리 후 대부분의 SFN 함량이 증가한 것을 확인하였다.

십자화과 채소에서 glucosinolate의 함량은 종과 속에 따라 다르고, 식물 재배 및 수확 후 저장 조건 등에 따라 달라질 수 있다 (Fahey 등, 2012; Verkerk 등, 2009). Glucoraphanin의 전구체인 sulforaphane의 함량도 재배, 저장 조건 등에 따라 달라질 수 있다는 것을 확인하였다.

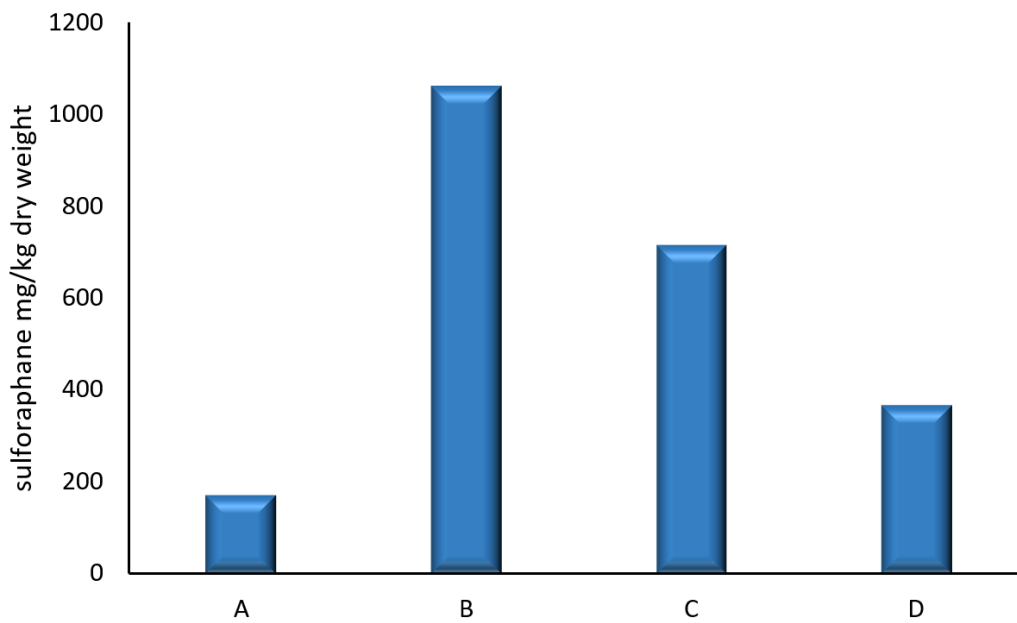


Figure 3-3a. Content of sulforaphane with no enzyme treatment of broccoli by purchase place.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

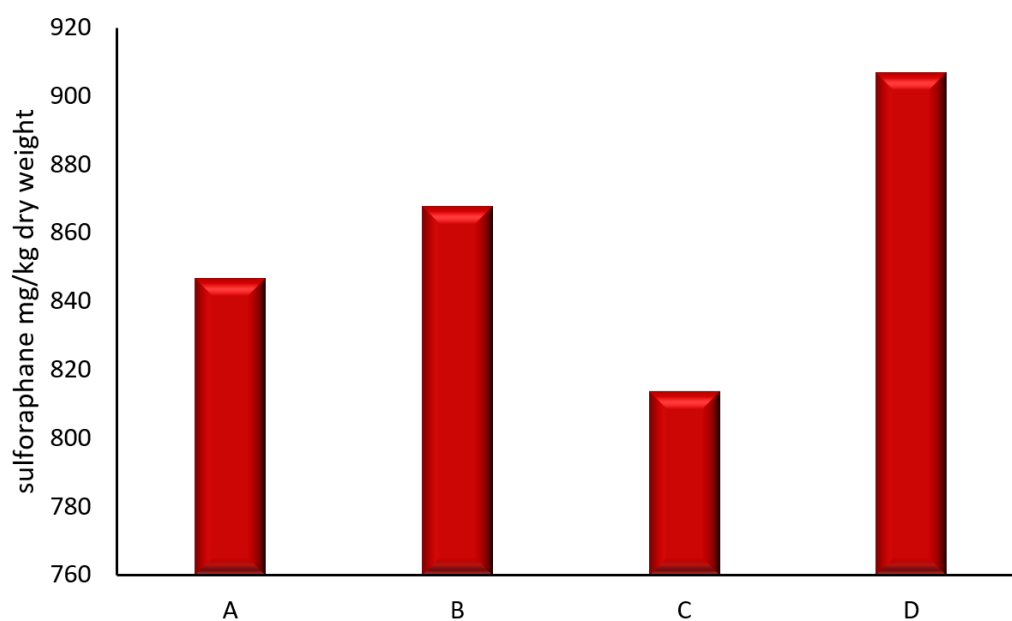


Figure 3-3b. Content of sulforaphane with enzyme treatment of broccoli by purchase place.

(A: E-mart everyday, B: OK mart,
C: GOM food mart, D: OK point mart)

2) Myrosinase 농도에 따른 sulforaphane 형성

효소 myrosinase의 농도 조건을 확립하기 위해 4가지 겨자씨 (미국, 인도, 캐나다, 스리랑카)로부터 동일한 조건으로 추출한 myrosinase를 같은 모두 같은 비율로 혼합했으며, 혼합한 myrosinase를 농도별로 브로콜리 분쇄액에 처리하였다.

브로콜리 분쇄액 (브로콜리:물=1:2)에 혼합한 myrosinase를 1 %, 5 %, 10 %씩, 그리고 Sigma-Aldrich사의 myrosinase를 5 % 첨가 후 60 °C에서 2 시간 동안 효소처리를 진행하였다. 모두 음성대조군 (효소처리를 하지 않은 브로콜리 분쇄액)보다 SFN 함량이 적게 검출되었으며, 오히려 효소의 양이 많을 때 SFN이 감소하였다. Sigma-Aldrich사에서 구입한 myrosinase를 넣어줬음에도 불구하고 음성대조군보다 SFN이 적게 나온 것을 봤을 때 myrosinase를 정제할 때 고순도 정제를 하는 것이 아닌 산업적으로 사용 가능한 ammonium sulfate법을 사용하여 정제하였다. 그러므로 다른 다양한 단백질이 존재하고 정제 myrosinase 농도가 늘어날수록 단백질 함량도 늘어나 sulforaphane과 결합하여 오히려 감소하는 것을 결과를 통해 알 수 있다 (Fig. 3-4).

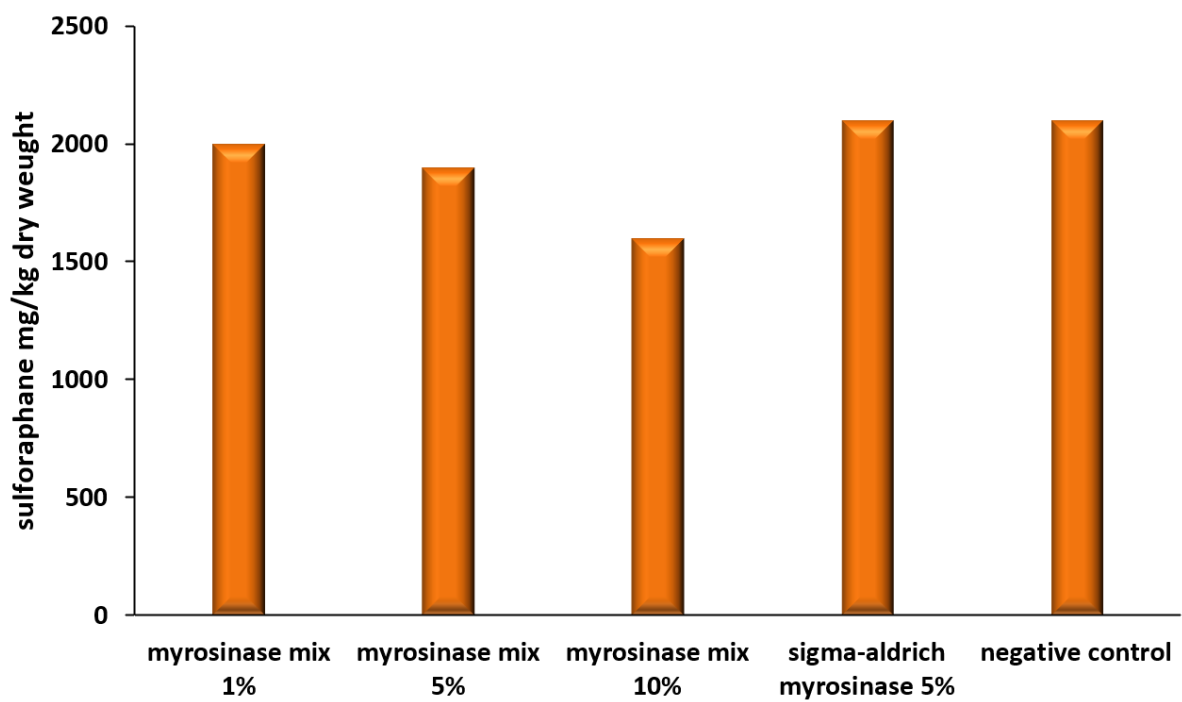


Figure 3-4. Comparison of sulforaphane content for broccoli juice with enzyme treatment by alternative concentrations.

(negative control : broccoli with no enzyme treatment)

3) 겨자가루의 활성화 실험

100 °C에서 가열한 브로콜리와 겨자가루를 함께 먹었을 때 체내 (in vivo)에서 반응하여 sulforaphane 함량이 8배 증가, 체외 (in vitro)에서 2.8배 증가한다는 논문을 토대로 실험을 진행하였다 (Fig. 3-5).

실험 전 브로콜리를 4 °C에서 24 시간 동안 방치 하였으며, 진공상태를 만들어준 후 100 °C에서 가열한 브로콜리에 겨자가루를 넣은 후 체내 온도인 37.5 °C에서 2 시간 동안 처리하였다. 그 결과 1.32배 증가하였고 논문을 참고하여 실험을 진행하였으나 결과가 많은 차이를 보였으며 원인으로서는 브로콜리가 완전한 진공상태가 되지 않은 것으로 인해 열전달이 일정하게 되지 않았을 거라고 생각되었다.

또한 논문에서 65 g의 브로콜리인 경우 0.33 g의 겨자가루, 즉 브로콜리의 약 0.005 %의 겨자가루가 들어가게 되는데 계산을 잘못하여 브로콜리의 약 0.0032 %의 겨자가루를 넣어주었다. 0.12 g의 겨자가루가 덜 들어가서 실험의 오류로 결과를 판단하기 어려웠다 (Fig. 3-6).

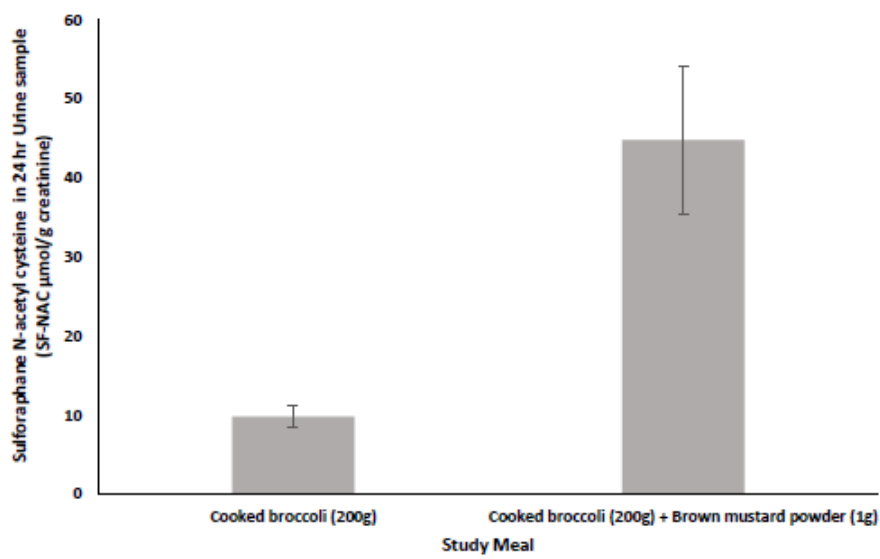


Figure 3-5. SFN content of body for 12 adults when they consumed with cooked broccoli and mustard powder.

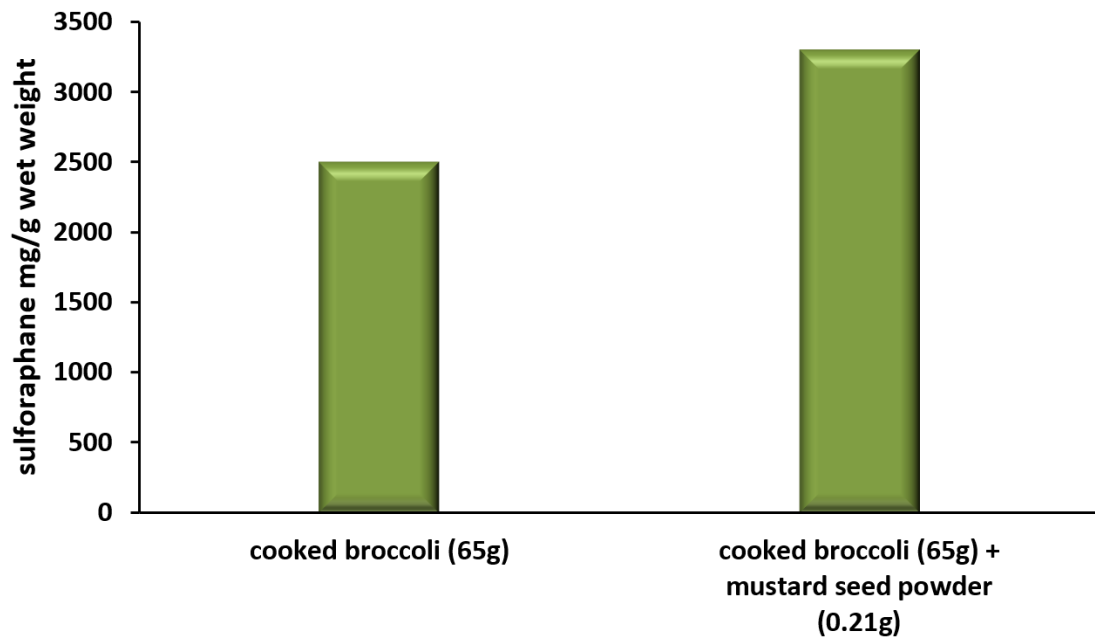


Figure 3-6. SFN content when mustard seed powder is added to cooked broccoli.

4) 브로콜리액 pH에 따른 myrosinase 활성 및 sulforaphane 안정도

효소는 주성분이 단백질로 되어 있어 수소 이온 농도인 pH에 따라 활성이 변하며, 반응 속도가 달라진다.

최적의 pH 조건을 확립하기 위한 실험으로 브로콜리 분쇄액의 pH는 5.8이며, acetic acid (초산)과 NaOH를 사용하여 pH를 조정한 후 흑겨자로부터 추출한 myrosinase 동량 처리하였다.

브로콜리 분쇄액(브로콜리:물=1:4)에 myrosinase를 1 % 첨가 후 40 °C에서 3 시간 동안 효소 처리한 후에 acetic acid와 NaOH를 이용하여 pH를 4, 5, 7, 9로 조정하였다.

pH 4와 5일 때 sulforaphane (SFN)의 양 (130 mg/kg dry weight)이 가장 많았고, 브로콜리 분쇄액인 pH 5.8보다 높아질수록 SFN의 양이 줄어들었으며 pH 9에서는 SFN이 검출되지 않았다.

따라서 pH 4, 5 (산성)에서 myrosinase의 활성과 SFN이 안정하였고, pH 7이상 (알칼리)일수록 myrosinase의 활성이 낮아짐을 알 수 있다 (Fig. 3-7).

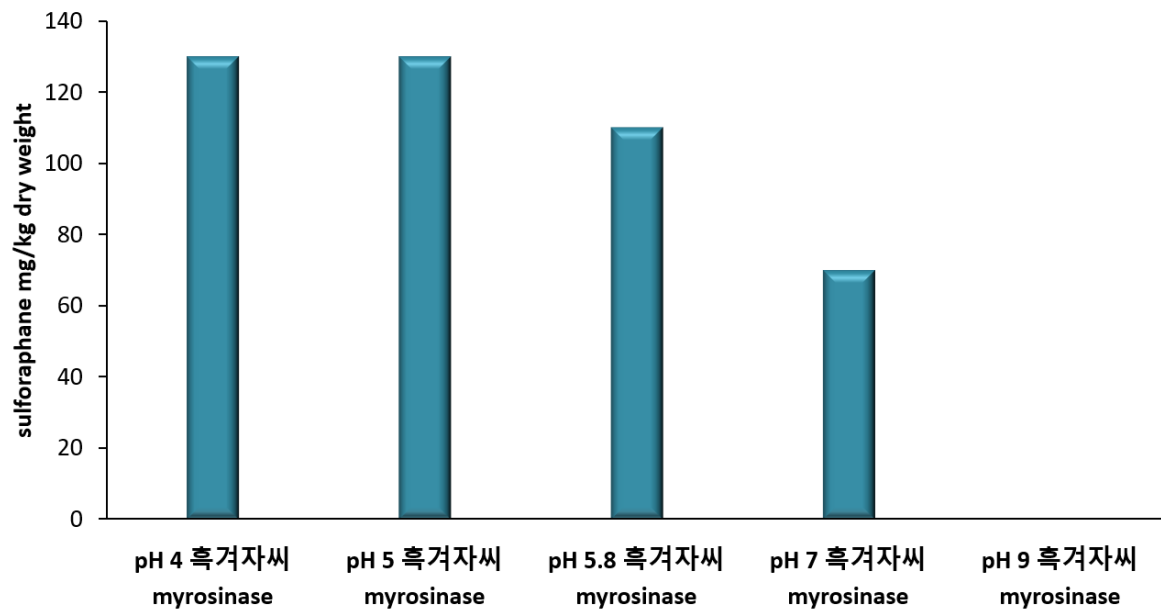


Figure 3-7. The analysis of SFN content by different pH of broccoli grinding liquid.

5) Sulforaphane 함량이 높은 브로콜리 새싹 실험

브로콜리보다 sulforaphane (SFN) 함량이 높다고 알려진 브로콜리 새싹을 5곳 (초록이슬, 채소파는가게, 희망채, 하늘땅, 천지가약초)에서 확보했으며, 구입처를 결정하기 위해 각각의 SFN 함량과 브로콜리 새싹에 겨자씨와 브로콜리로부터 추출한 myrosinase와 겨자가루를 넣어줬을 때 SFN 함량을 HPLC로 분석하였다.

5곳에서 확보한 브로콜리 새싹을 동일한 조건 (브로콜리:물=1:4)으로 분쇄하였으며, 모두 브로콜리와 확연하게 차이를 보였으며 가장 높은 함량을 보인 채소파는가게의 브로콜리 새싹은 3,800 mg/kg으로 브로콜리의 63배가량 높은 수치를 보였다 (Fig. 3-8). Fahey 등 (1997)은 3일 된 브로콜리 새싹이 완전히 자란 브로콜리보다 10배에서 100배 더 많은 glucoraphanin을 함유하고 있다고 보고했다.

겨자씨와 브로콜리로부터 추출한 myrosinase와 겨자가루를 넣었을 때 무처리 브로콜리 새싹에 비해 높은 결과가 나왔으며, 겨자가루를 넣어준 경우 약 3.2배 증가하였다. 또한 우리가 겨자씨와 브로콜리로 추출한 myrosinase가 활성이 있다는 것을 알 수 있고, 브로콜리보다 겨자씨 유래의 myrosinase가 더 효과적임을 알 수 있다 (Fig. 3-9).

앞서 언급했듯이 ESP (epithiospecifier protein)는 myrosinase의 작용을 방해하고 glucoraphanin을 sulforaphane nitrile로 전환 시킨다. 이런 ESP의 작용을 저해하고 SFN의 함량을 극대화하기 위한 실험을 진행하였다. 무는 브로콜리와 달리 isothiocyanate의 glucosinolate의 전환을 억제하는 ESP 단백질을 갖고 있지 않다. Glucoraphanin의 농도는 seed에서 가장 높았고, 새싹 발육과 함께 기하급수적으로 감소하였다 (Foo 등, 2000).

브로콜리 새싹을 100 °C에서 20 분간 열처리를 한 후 ESP를 제거하기 위해 60 °C에서 10 분간 열처리를 진행하였다. 열처리를 함으로써 ESP가 불활성화되어 sulforaphane의 함량은 다소 증가하였으나 많은 차이를 보이지 않아 (Fig. 3-10) PITC 처리를 진행하였다.

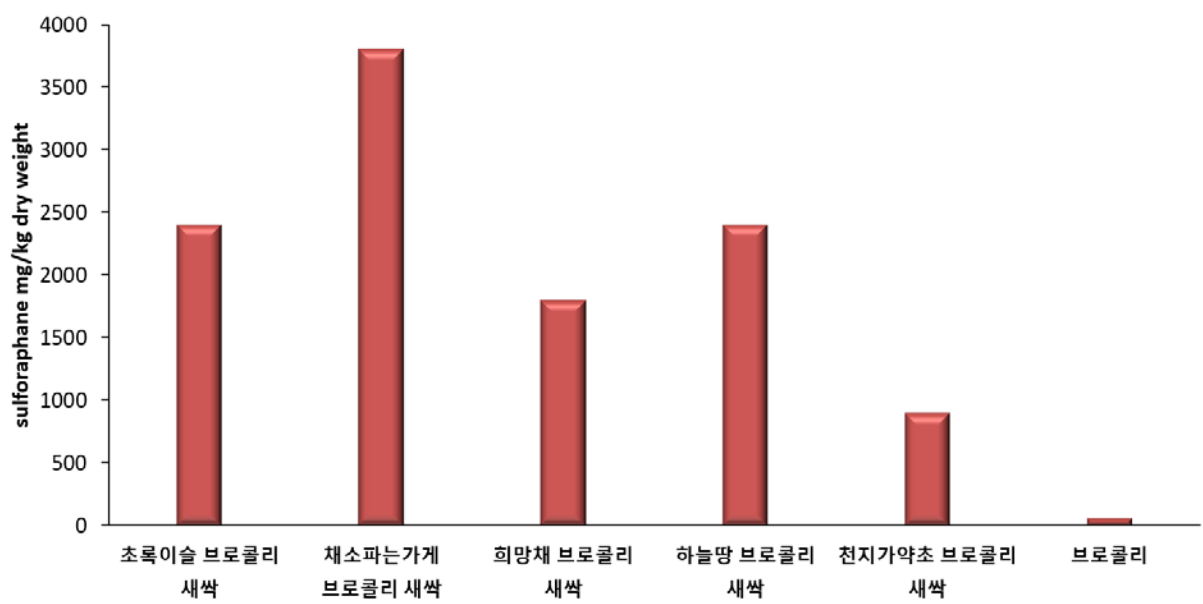


Figure 3-8. SFN content of broccoli sprouts on different purchasing places.

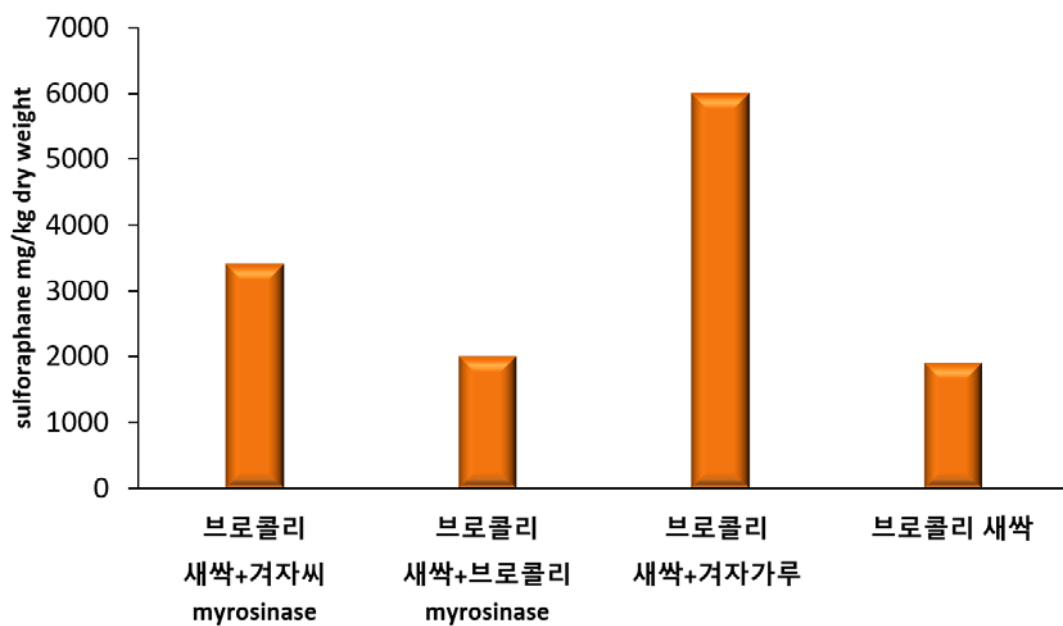


Figure 3-9. SFN content when enzyme and mustard seed powder are added to broccoli sprouts.

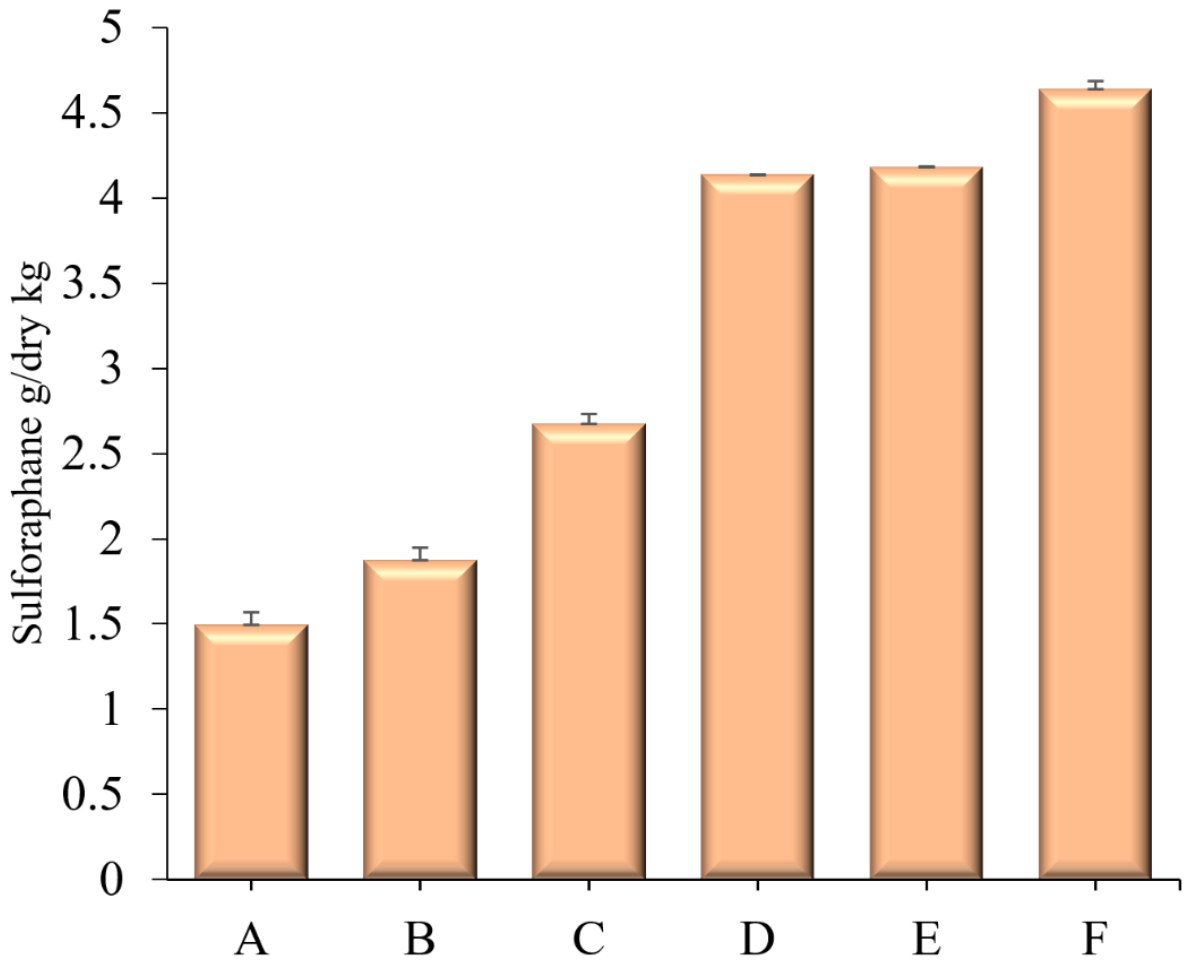


Figure 3-10. Sulforaphane content with or without heat treatment.

(A: boon food, B: royal, C: broccoli solution without heat treatment, D: boon food with heat treatment, E: royal with heat treatment, F: broccoli solution without enzyme treatment after heat treatment)

6) Sulforaphane과 amine 결합 저해를 위한 PITC 처리

브로콜리에 있는 아민 역시 효소 처리하는 과정에서 sulforaphane (SFN)과 결합하여 SFN의 수치를 감소시킬 수 있다고 판단하여 아민과 결합을 잘하는 PITC를 효소 처리하기 이전에 넣어 SFN의 생성을 극대화시키기 위해 실험하였으며 sulforaphane (SFN)과 Glucoraphanin (GR)의 영향을 받지 않기 위해 열과 압력에 의해 SFN과 GR이 파괴되었으나 다른 단백질이 많이 존재하는 브로콜리 농축액을 사용하였다.

브로콜리 자체내의 GR이 myrosinase에 의해 SFN이 생성되면 브로콜리 내의 단백질, 펩타이드 또는 아미노산들이 SFN과 화합물을 이루어 SFN 형성에 방해된다. 따라서 PITC (Phenyl isothiocyanate)를 처리하여 브로콜리 내의 단백질 등을 침전시켜 다른 화합물로 전환되는 것을 저해하고 순수한 설포라판을 수득할 수 있다 (Fig. 3-14). PITC 처리한 브로콜리의 원심분리 후 모습을 살펴보면 가운데 PITC 화합물이 보이고 GR 포함 브로콜리 상등액과 PITC 포함 불용성 부분은 가라앉아 구분되는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 3-15).

37℃에서 2시간 동안 PITC 처리하고, 40℃에서 2시간 동안 효소 처리하였다. PITC를 처리한 브로콜리의 SFN 함량을 측정된 결과 PITC를 처리하지 않은 A (음성대조군)는 215 mg/kg으로 나타났고, A에 비해 모두 SFN 함량이 증가하였으며 B와 C는 각각 3.7배, 7배 많은 SFN 함량을 보여주었다. PITC 처리 후 GR 400 μ l와 myrosinase 100 μ l 투입했을 때 SFN이 3,115 mg/dry kg으로 가장 높게 나타났고, 14.7배나 많은 SFN 함량을 확인하였다 (Fig. 3-16). PITC를 처리함으로써 불필요한 단백질을 제거하여 순수한 SFN을 얻을 수 있었고, 효소처리 온도와 pH 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하였다.

효소는 주성분이 단백질로 수소이온농도에 따라 활성과 반응속도가 달라진다. 최적의 pH 조건을 확립하기 위해 초산 (acetic acid)과 수산화나트륨 (NaOH)로 pH를 조정하였다. SFN의 온도와 pH에 따른 안전성을 확인한 결과 40℃에서 가장 좋은 활성을 보였다 (Fig. 3-17). 이러한 결과와 유사하게, Mahn 등 (2014)은 브로콜리에서 추출한 myrosinase의 최적 반응 온도는 40 ℃라고 보고하였고, 이 (2020)는 분리된 myrosinase의 최적 반응온도는 반응시간 30분 기준으로 약 43 ℃라고 추정하였으며, 50℃ 이상에서는 효소 활성이 급격히 감소한다고 보고하였다. Li 등 (2005)은 고추냉이 (horseradish)에서 추출한 myrosinase의 최적 반응온도는 37~45 ℃이고, 50 ℃ 이상에서는 촉매 활성이 급격하게 감소하였다. 그러나 Prakash 등 (2013)은 꽃양배추 myrosinase의 최적 반응온도는 50 ℃, Bhat 등 (2015)은 큰키다닥냉이 (*Lepidium latifolium*) myrosinase의 최적 반응온도는 50 ℃라고 각각 보고하였다. 하지만

Van Eylen 등 (2008)은 백겨자 myrosinase의 최적 반응온도가 대기압 하에서 60 °C, 20 MPa의 고압에서는 40 °C로 효소가 처한 환경에 따라서 다르다고 보고하였다. 또한 Albaser 등 (2016)은 *Citrobacter* 균주의 myrosinase는 25 °C, Hamed 등 (2016)은 *Bacillus thuringiensis*의 myrosinase는 50 °C에서 각각 최적 반응온도를 나타냈다고 밝혔다. 온도는 효소의 반응속도뿐만 아니라 안정성에도 영향을 미치며, 효소 단백질은 고온에서 변성되어 촉매 활성을 잃게 된다.

브로콜리 분쇄액의 pH는 pH 4~5에서 가장 많은 SFN이 생성되었으나 (Fig. 3-18) 산도가 너무 낮다고 판단하여 추후 실험에서 PITC 처리한 상등액의 pH 5.5에서 사용하였다. 이와 유사하게 Lv 등 (2020)은 브로콜리 씨앗에서 최적의 pH는 4.08이라고 보고 하였고, pH 값은 기본적으로 일관성이 있었다.

Table 3-1a. Sulforaphane content of enzyme-treated solution purified with 55-80 % ammonium sulfate.

Sample	Concentration mg/mg dry weight
A mart	846.85
B mart	867.87
C mart	813.81
D mart	906.9

Table 3-1b. Sulforaphane content of enzyme-treated solution purified with
80 % Ammonium sulfate.

Sample	Concentration mg/kg dry weight
A	366.37
B	321.32
C	363.36
D	369.37

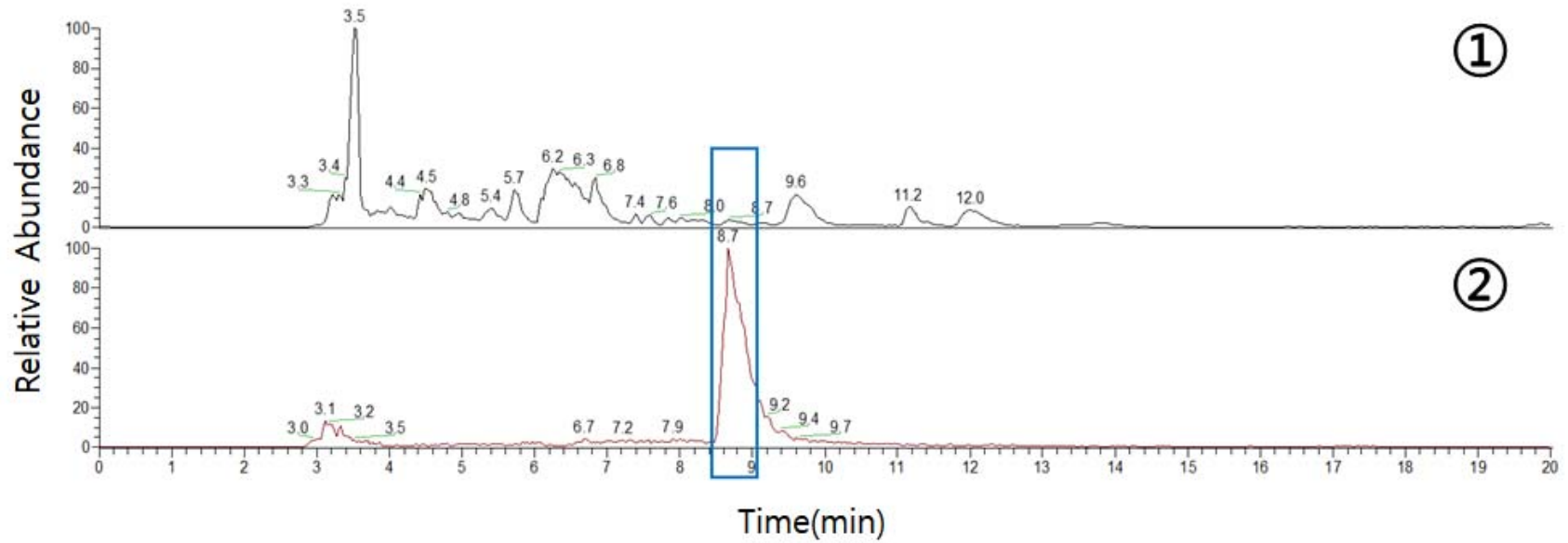


Figure 3-11. Comparison of LC/MS for broccoli concentrate and GR standard form.

Table 3-2. SFN stability of broccoli concentrate by treating PITC.

(A: the supernatant of broccoli concentrate treated PITC(100 g/L) + sulforaphane 20 mg/L

B: the supernatant of broccoli concentrate treated PITC(100 g/L)+ sulforaphane 20 mg/L,
40 °C, 2 hr)

Sample	Sulforaphane mg/L
A	18.8
B	19.3

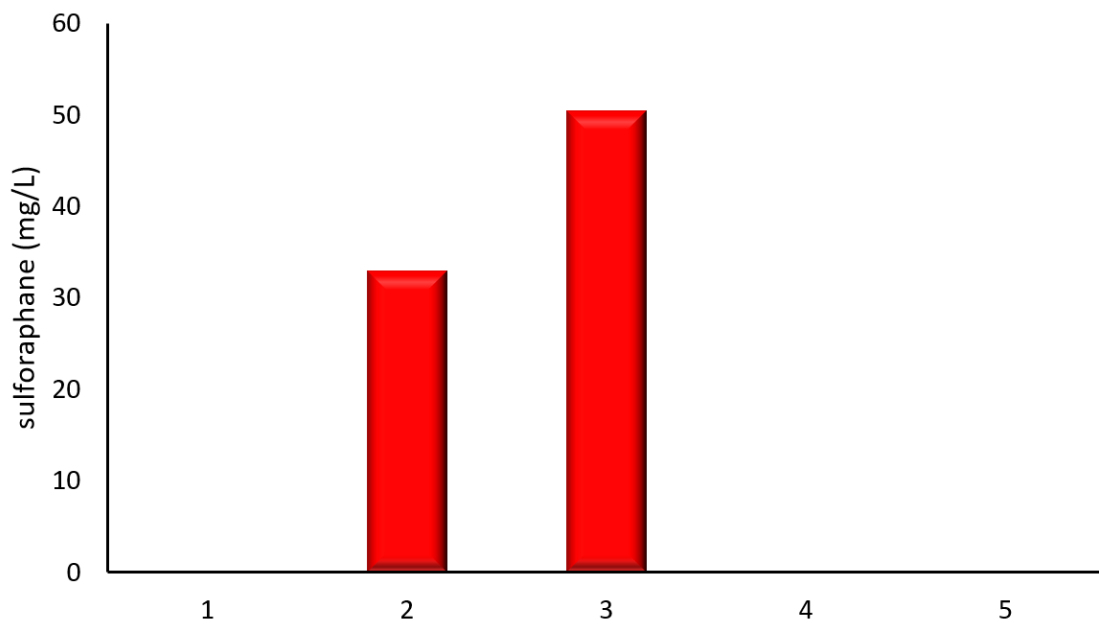


Figure 3-12. SFN formation in PITC-treated broccoli concentrate.

A: PITC treatment to the supernatant of broccoli concentrate

Sample 1: A + glucoraphanin 100 mg/L → 40 °C, 2 hr

Sample 2: A + glucoraphanin 100 mg/L + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

Sample 3: A + glucoraphanin 200 mg/L + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

Sample 4: A → 40 °C, 2 hr

Sample 5: A → No heat treatment

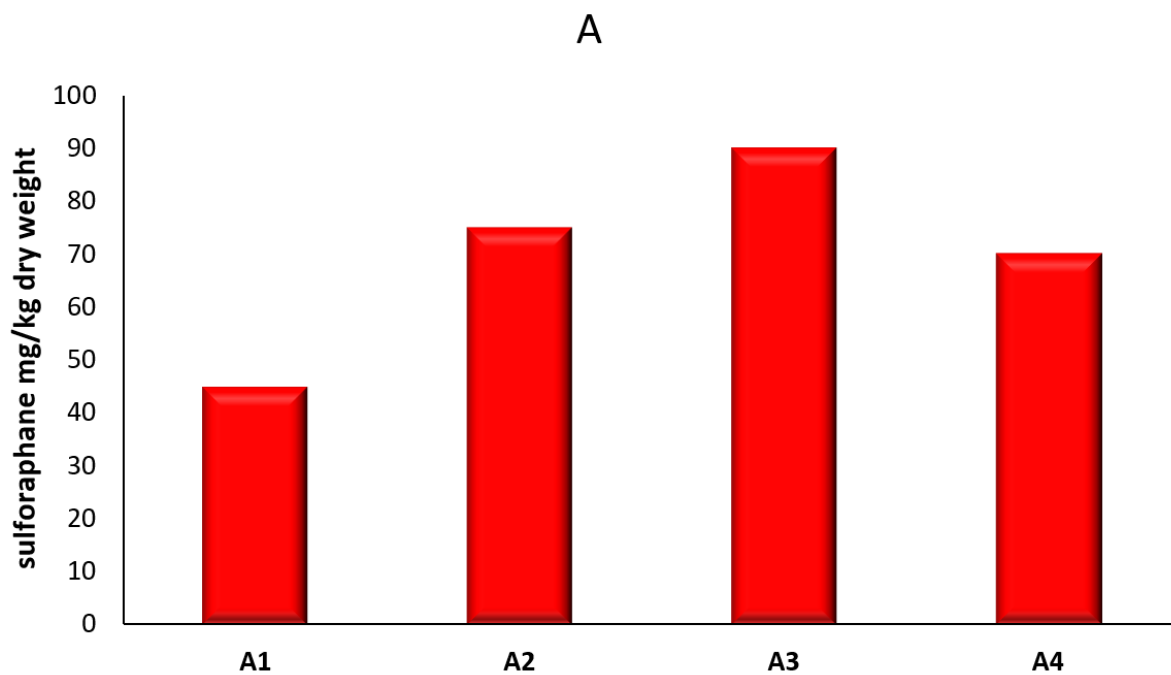


Figure 3-13a. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from E-mart everyday.

A: broccoli from E-mart everyday → 100 °C, 20 min

A1: broccoli → 40 °C, 2hr

A2: broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

A3: PITC-treated broccoli → 40 °C, 2 hr

A4: PITC-treated broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

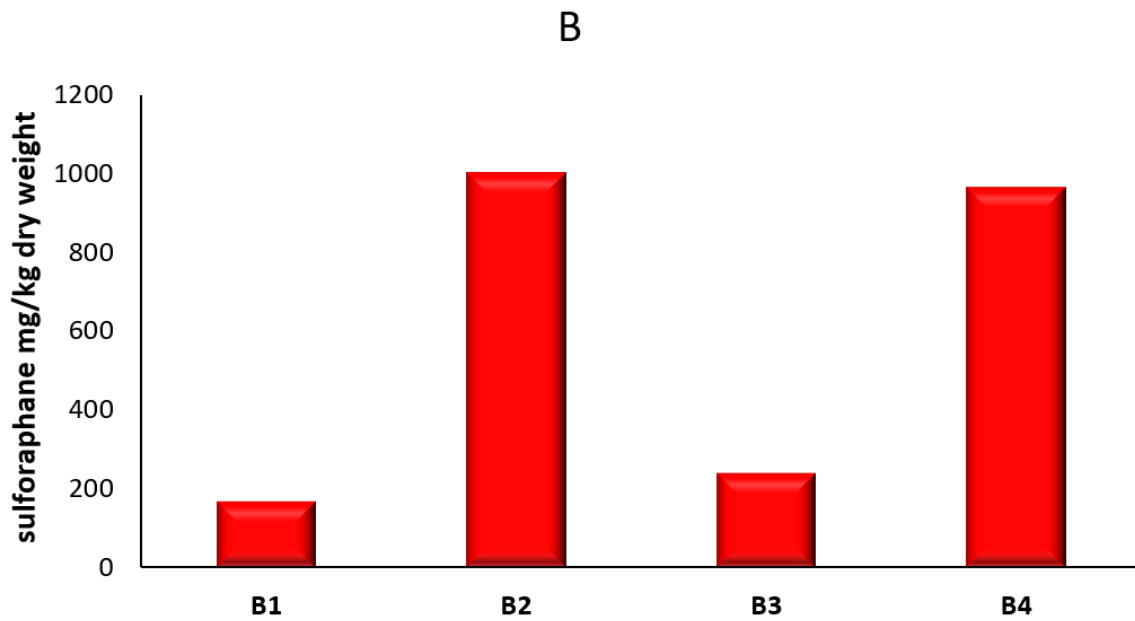


Figure 3-13b. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from OK mart.

B: OK mart → 100 °C, 20 min

B1: broccoli → 40 °C, 2 hr

B2: broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

B3: PITC-treated broccoli → 40 °C, 2 hr

B4: PITC-treated broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

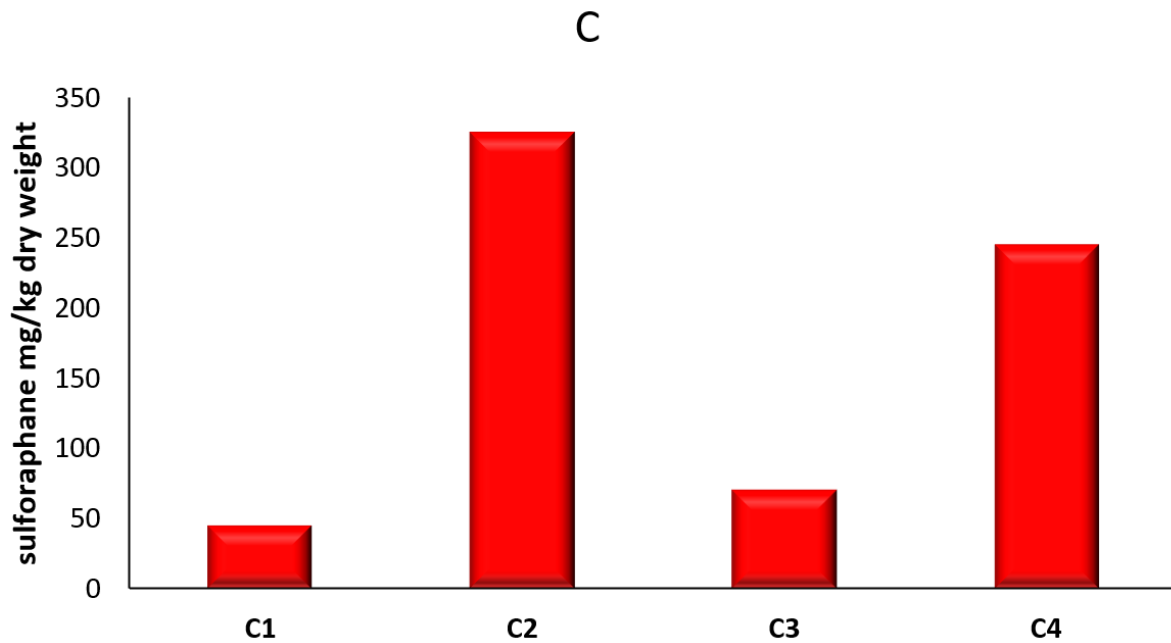


Figure 3-13c. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from GOM food mart.

C: GOM food mart → 100 °C, 20 min

C1: broccoli → 40 °C, 2 hr

C2: broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

C3: PITC-treated broccoli → 40 °C, 2 hr

C4: PITC-treated broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

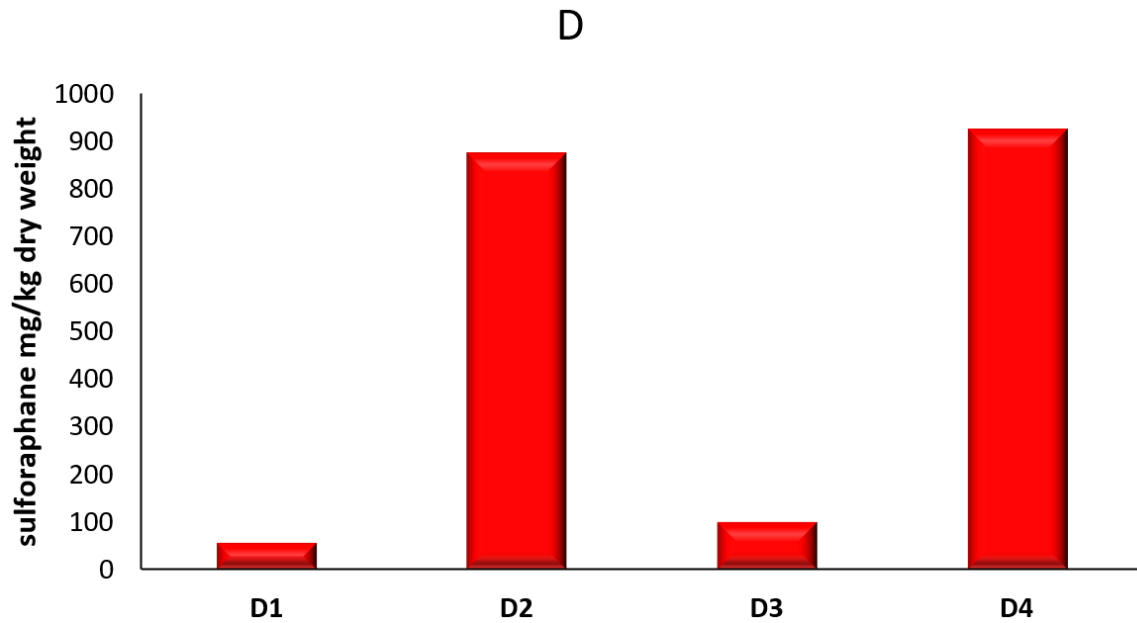


Figure 3-13d. SFN formation of broccoli with no treatment and PITC-treated from OK point mart.

D: OK point mart → 100 °C, 20 min

D1: broccoli → 40 °C, 2 hr

D2: broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

D3: PITC-treated broccoli → 40 °C, 2 hr

D4: PITC-treated broccoli + myrosinase 5 % → 40 °C, 2 hr

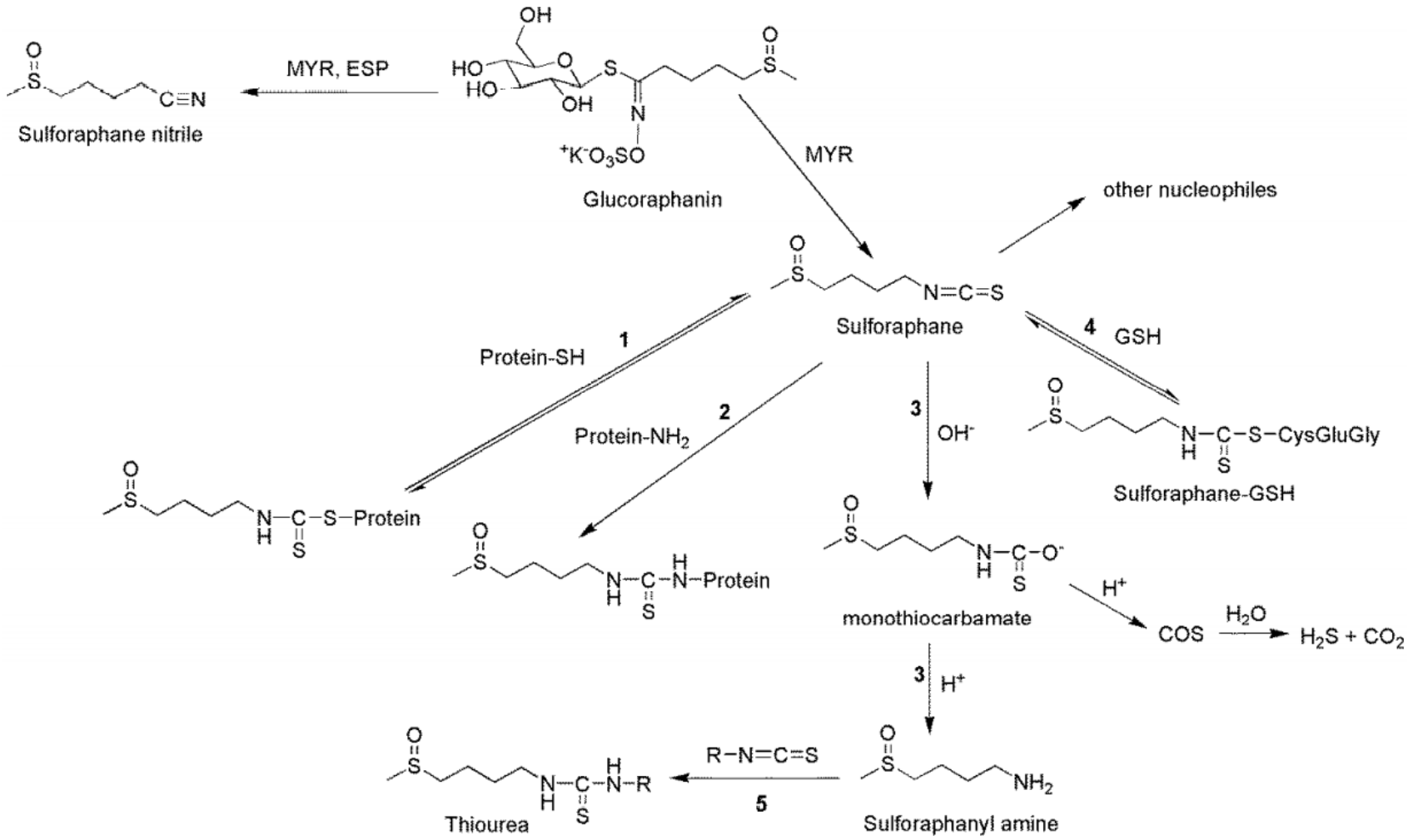


Figure 3-14. Bonding mechanism of sulforaphane and amine (Bello et al., 2018).



Figure 3-15. Broccoli heat-treated at 100 °C for 20 minutes + PITC 37 °C, 2 hours centrifugation (10,000 rpm, 10 minutes).

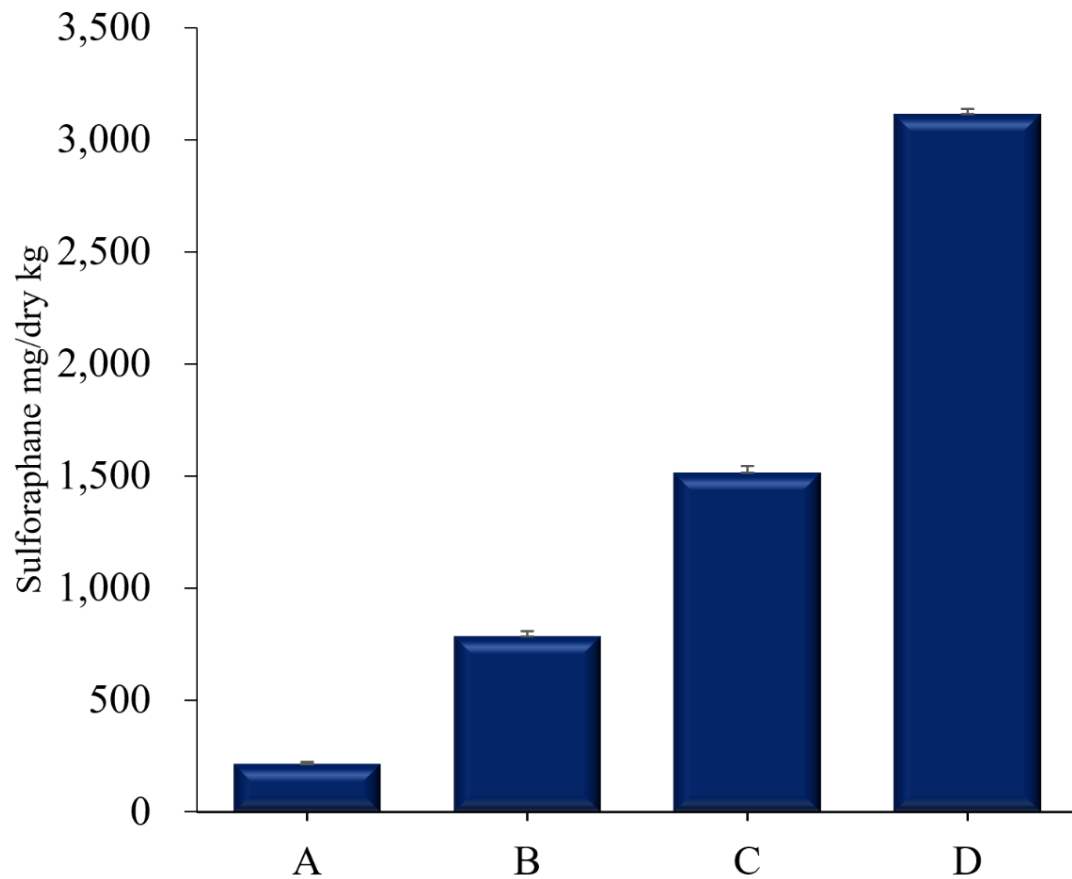


Figure 3-16. Sulforaphane content of PITC-treated broccoli.

A: broccoli + myrosinase 100 μl (negative control)

B: supernatant of PITC-treated broccoli concentrate + GR (1 mg/ml) 400 μl
+ myrosinase 200 μl

C: supernatant of PITC-treated broccoli concentrate + GR (1 mg/ml) 200 μl
+ myrosinase 100 μl

D: supernatant of PITC-treated broccoli concentrate + GR (1 mg/ml) 400 μl
+ myrosinase 100 μl

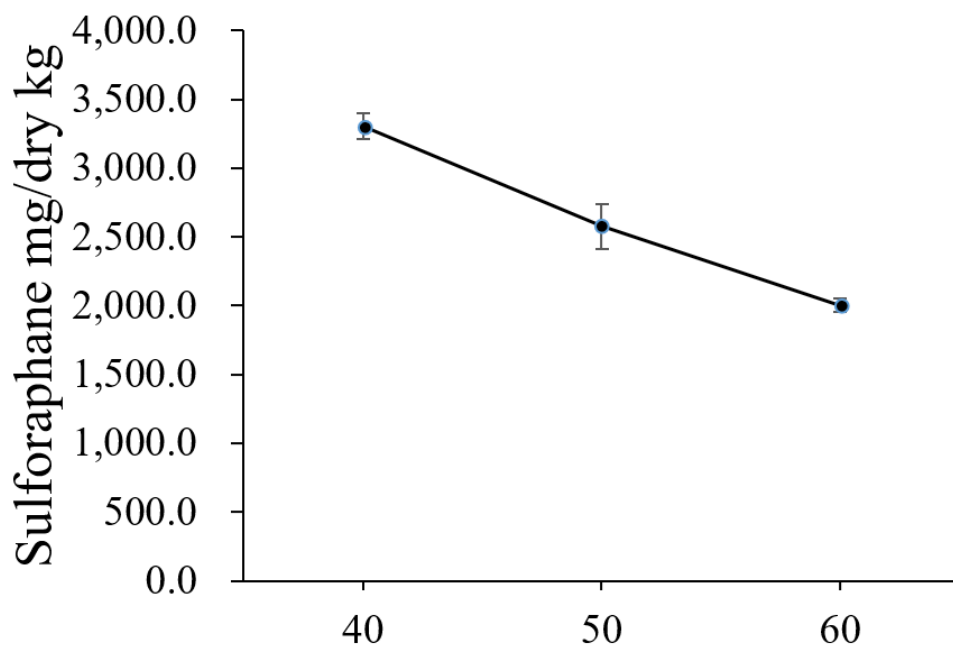


Figure 3-17. Sulforaphane content assay according to temperature.

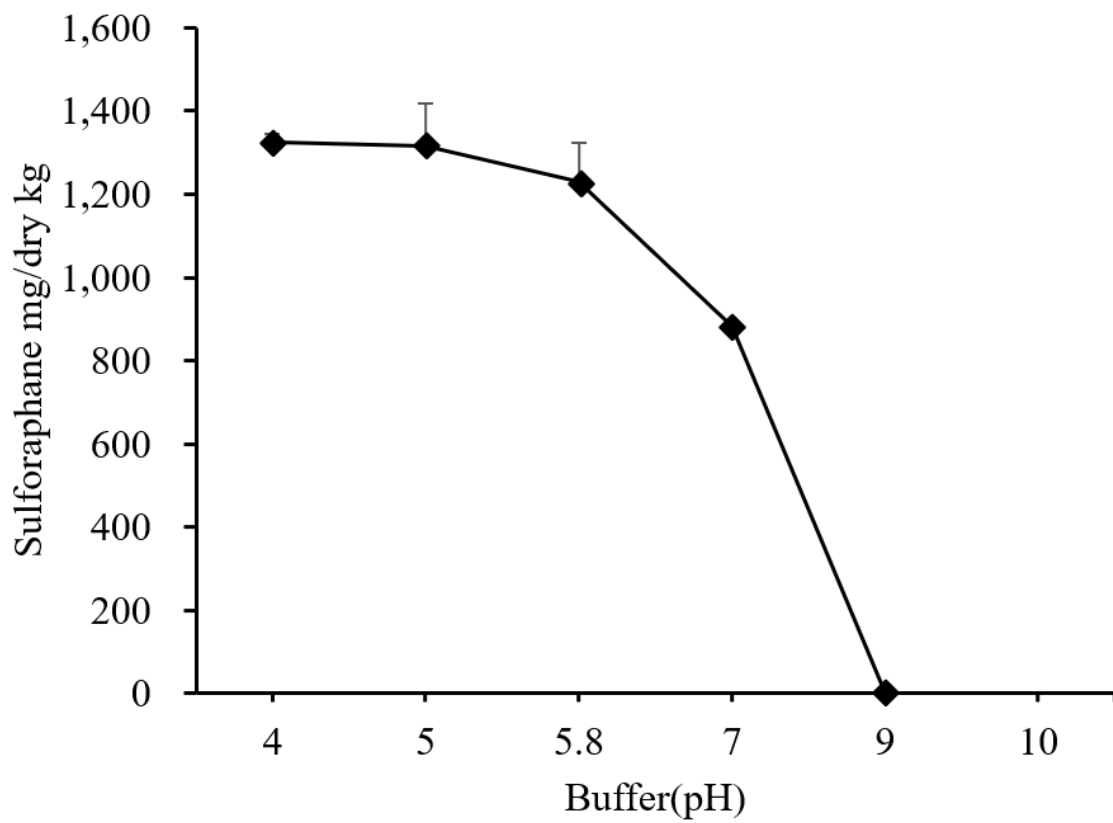


Figure 3-18. Sulforaphane content assay according to pH.

4. 요약

본 연구는 십자화과 식물로부터 고품량의 sulforaphane (SFN)을 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 phenyl isothiocyanate (PITC)를 처리함으로써 SFN이 화합물화되는 것을 방지하여 십자화과 식물로부터 SFN을 고수율로 생산할 수 있는 방법에 관해 수행하였다. 브로콜리, 콜라비, 레드비트, 양배추와 같은 십자화과 식물에는 당과 합성된 배당체 형태의 glucosinolate 계의 glucoraphanin (GR)이 존재한다. GR은 myrosinase라는 효소에 의해 당과 비당으로 가수분해되어 항산화, 항암 등의 기능성이 있는 것으로 보고된 isothiocyanate 계의 SFN으로 생성된다. 그런데, myrosinase 효소에 의해 SFN이 생성되면 십자화과 식물 내의 nucleophile (대부분의 단백질, 펩타이드 또는 아미노산들)들이 SFN과 화합물 (sulforaphane conjugate)을 이루어 SFN의 수득에 부정적인 영향을 주는 문제가 있다. 이와 같은 문제를 해결하여 십자화과 식물로부터 설포라판을 고수율로 수득할 수 있는 방법을 개발하고자 하였는데, 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 효소 myrosinase의 농도 조건을 확립하기 위해 4가지 겨자씨(미국, 인도, 스리랑카, 캐나다)로부터 동일한 조건으로 추출한 myrosinase를 모두 같은 비율로 혼합했으며, 혼합한 myrosinase를 농도별로 브로콜리 분쇄액에 처리하였다. 브로콜리 분쇄액 (브로콜리:물=1:2)에 혼합한 myrosinase를 1 %, 5 %, 10 %씩, 그리고 Sigma-Aldrich사의 myrosinase를 5 % 첨가 후 60 °C에서 2시간 동안 효소처리를 진행하였다. 모두 효소처리를 하지 않은 음성 대조군보다 SFN 함량이 적게 검출되었으며, 오히려 효소의 양이 많을 때 SFN이 감소하였다. Sigma-Aldrich사의 myrosinase를 넣어줬음에도 불구하고 음성대조군보다 SFN이 적게 나온 것을 봤을 때 다른 다양한 단백질이 존재하고 정제 myrosinase 농도가 늘어날수록 단백질 함량도 늘어나 SFN과 결합하여 오히려 감소하는 것을 결과를 통해 알 수 있었다.
- 2) 브로콜리보다 SFN 함량이 높다고 알려진 브로콜리 새싹을 확보하였다. 브로콜리 새싹을 동일한 조건 (브로콜리:물=1:4)으로 분쇄하였으며, 모두 브로콜리와 확연하게 차이를 보였고, 가장 높은 함량을 보인 브로콜리 새싹은 3,800 mg/kg으로 브로콜리의 63배가량 높은 수치를 보였다. 겨자씨와 브로콜리로부터 추출한 myrosinase와 겨자가루를 넣었을 때 무처리

브로콜리 새싹에 비해 높은 결과가 나왔으며, 겨자가루를 넣어준 경우 SFN 함량이 약 3.2배 증가하였다. 또한 겨자씨와 브로콜리로 추출한 myrosinase가 활성이 있다는 것을 알 수 있고, 브로콜리보다 겨자씨 유래의 myrosinase가 더 효과적임을 알 수 있다. 앞서 언급했듯이 ESP (epithiospecifier protein)는 myrosinase의 작용을 방해하고 GR을 sulforaphane nitrile로 전환시킨다. 브로콜리 새싹을 100 °C에서 20 분간 열처리를 한 후 ESP를 제거하기 위해 60°C에서 10분간 열처리를 진행하였다. ESP의 작용을 저해하고 SFN의 함량을 극대화하고자 하는 실험을 진행하였다. 열처리를 함으로써 ESP가 불활성되어 sulforaphane의 함량은 증가하였으나 많은 차이를 보이지 않아 PITC 처리를 진행하였다.

3) 실험을 위해 100 °C에서 20 분간 열처리한 브로콜리를 분쇄하여 얻은 분쇄액에 PITC를 100 g/l 처리한 후 37 °C에서 10,000 rpm으로 2 시간 동안 원심분리하고 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액에 myrosinase를 5 % 처리한 후, 40 °C에서 2 시간 동안 반응을 유도하여 반응액 샘플 내에 존재하는 설포라판의 함량을 정량하였다. 한편, 대조군으로는 브로콜리 분쇄액을 40 °C에서 2 시간 동안 처리한 샘플, 브로콜리 분쇄액에 myrosinase를 5 % 처리한 후 40 °C에서 2 시간 동안 처리한 샘플, 브로콜리 분쇄액에 PITC를 처리한 후 40 °C에서 2 시간 동안 처리한 샘플을 사용하였다. PITC 처리 여부에 따른 SFN 생성량의 비교 실험 결과, PITC를 처리하지 않은 대조군 샘플에 비해 SFN의 함량이 5.7 % 향상됨을 확인하였다.

4) PITC를 처리함으로써 불필요한 단백질을 제거하여 순수한 SFN을 얻을 수 있었고, 효소 처리 온도와 pH 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하였다. 효소는 주성분이 단백질로 수소이온농도에 따라 활성과 반응속도가 달라진다. 최적의 pH 조건을 확립하기 위해 초산과 NaOH로 pH를 조정하였다. SFN의 온도와 pH에 따른 안전성을 확인한 결과 40 °C에서 가장 좋은 활성을 보였고, pH는 pH4~5에서 가장 좋았으나 산도가 너무 낮아 추후 실험에서 PITC 처리한 상등액의 pH5.5에서 사용하였다.

5. 참고문헌

Albaser, A., Kazana, E., Bennett, M. H., Cebeci, F., Luang-In, V., Spanu, P. D., Rossiter, J. T. 2016. Discovery of a bacterial glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase with myrosinase activity from a *Citrobacter* strain isolated from soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64: 1520-1527.

Andrea, T., Cristina, A., Marco, M., Fabiana, M., Silvana, H., Patrizia, H. 2013. Sulforaphane as a Potential Protective Phytochemical against Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 1-10.

Bai, Y., Wang, X., Zhao, S., Ma, C., Cui, J., Zheng, Y. 2015. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.

Bello, C., Maldini, M., Baima, S., Scaccini, C., & Natella, F. 2018. Glucoraphanin and sulforaphane evolution during juice preparation from broccoli sprouts. *Food Chemistry*. 268: 249-256.

Bhat, R., Kaur, T., Khajuria, M., Vyas, R., Vyas, D. 2015. Purification and Characterization of a Novel Redox-Regulated Isoform of Myrosinase (β -Thioglucoside Glucohydrolase) from *Lepidium latifolium* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 10218-10226.

Clarke, J. D., Hsu, A., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F., Ho, E. 2011. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacological Research*. 64: 456-463.

Cole, R., 1983. Isothiocyanates nitriles and thiocyanates and products of autolysis of glucosinolates in cruciferae. *Phytochemistry*. 15: 759-762.

Dong, Z., Shang, H., Chen, Y. Q., Pan, L.-L., Bhatia, M., Sun, J. 2016. Sulforaphane Protects Pancreatic Acinar Cell Injury by Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3 Inflammatory Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-12.

Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7610-7615.

Fahey, J. W., Wehage, S. L., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W., Egner, P. A., Shapiro, T. A., Talalay, P. 2012. Protection of Humans by Plant Glucosinolates: Efficiency of Conversion of Glucosinolates to Isothiocyanates by the Gastrointestinal Microflora. *Cancer Prevention Research*. 5: 603-611.

Fahey, J. W., Zhang, Y., Talalay, P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 10367-10372.

Foo, H. L., Grønning, L. M., Goodenough, L., Bones, A. M., Danielsen, B.-E., Whiting, D. A., Rossiter, J. T. 2000. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Letters*. 468: 243-246.

Ghawi, S. K., Methven, L., Rastall, R. A., Niranjana, K. 2012. Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage: A kinetic study. *Food Chemistry*. 131: 1240-1247.

Hamed, M. El-Shora., Ahmed, M. El-Shobaky., Maissa, M. El-Atrozy. 2018. Activity of Purified Bacterial Myrosinase and its Essential Residues. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5: 567-578.

Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A., Lozniewski, A. 2003. Efficacy of Sulforaphane in Eradicating *Helicobacter pylori* in Human Gastric Xenografts Implanted in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3982-3984.

Houghton, C. A., Fassett, R. G., Coombes, J. S. 2013. Sulforaphane: Translational research from laboratory bench to clinic. *Nutrition Reviews*. 71: 709-726.

Li, X., Kushad, M. M. 2005. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 503-511.

Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Yu, Y., Clouthier, S. G., Schwartz, S. J., Wicha, M. S., Sun, D. 2010. Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*. 16: 2580-2590.

Lv, X., Meng, G., Li, W., Fan, D., Wang, X., Espinoza-Pinochet, C. A., Cespedes-Acuña, C. L. 2020. Sulforaphane and its Antioxidative Effects in Broccoli Seeds and Sprouts of Different Cultivars. *Food Chemistry*. 316: 126216.

Mahn, A., Angulo, A., Cabañas, F. 2014. Purification and Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Myrosinase (β -Thioglucosidase Glucohydrolase). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 11666-11671.

Matusheski, N. V. 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*. 65: 1273-1281.

Matusheski, N. V., Juvik, J. A., Jeffery, E. H. 2003. Sulforaphane content and bioactivity of broccoli sprouts are enhanced by heat processing: A role for epithiospecifier protein. *FASEB Journal*. 17: A377.

Paul, M. H., Scarlett, G., Felix, B., Shantel, A. V., Victoria, N., Steven, A. J., Paul, C. E., Felicity, N. E. G. 2017. Sulforaphane Induces Neurovascular Protection Against a Systemic Inflammatory Challenge via Both Nrf2-Dependent and Independent Pathways. *Vascular Pharmacology*. 85: 29-38.

Pérez, C., Barrientos, H., Román, J., Mahn, A. 2014. Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets. *Food Chemistry*. 145: 264-271.

Prakash, O., Rai, A. K., Singh, J., Singh, P. M. 2013. Partial purification and kinetic properties of myrosinase from cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*. 26: 190-194.

Qi, T., Xu, F., Yan, X., Li, S., Li, H. 2016. Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 37: 182-188.

Sestili, P., Fimognari, C. 2015. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 2015: 1-9.

Shams, R., Abu-Khudir, R., Ali, E. M. 2017. Sulforaphane, polyphenols and related anti-inflammatory and antioxidant activities changes of Egyptian broccoli during growth. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11: 2061-2068.

Van Eylen, D., Indrawati, M., Hendrickx, A., Van Loey, A. 2006. Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba* L) myrosinase. *Food chemistry*. 97: 263-271.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A. 2008. Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea* cv. *Italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 2163-2170.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A. 2008. Behavior of mustard seed (*Sinapis alba* L) myrosinase during temperature/pressure treatments: A case study on enzyme activity and stability. *European Food Research and Technology*. 226: 545-553.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R. D., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M. 2009. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53: S219.

Wise, R. A., Holbrook, J. T., Criner, G., Sethi, S., Rayapudi, S., Sudini, K. R., Sugar, E. A., Burke, A., Thimmulappa, R., Singh, A., Talalay, P., Fahey, J. W., Berenson, S., Jacobs M. R., Biswal, S. 2016. Lack of Effect of Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. *PLOS ONE*. 11: e0163716.

Xuling, S., Xin, J., Lingbin, M., Xiaoming, D., Yanjun, S., Ying, X. 2018. Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018: 1-10.

Yanaka, A., Fahey, J. W., Fukumoto, A., Nakayama, M., Inoue, S., Zhang, S., Tauchi, M., Suzuki, H., Hyodo, I., Yamamoto, M. 2009. Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in *Helicobacter pylori*-Infected Mice and Humans. *Cancer Prevention Research*. 2: 353-360.

Yang, B., Xiaolu, W., Song, Z., Chunye, M., Jiuwei, C., Yang, Z. 2015. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.

Zhao, Z., Liao, G., Zhou, Q., Lv, D., Holthfer, H., Zou, H. 2016. Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-12.

이란. 2020. 백겨자(*Sinapis alba*)의 종자로부터 효소 myrosinase의 분리 및 특성. 제주대학교 대학원 학위논문.

V. 브로콜리 효소처리액과 발효액의 기능성 실험 및 평가

1. ABSTRACT

This study crushed traditional fermented foods of Jeju Province, smeared them on MRS solid medium in which lactic acid bacteria and gram positive bacteria were selectively cultivated, and cultivated separated 1000 individuals; then, each was fermented individually and DPPH analysis, a test method for antioxidant and MTT analysis, and a test method for cancer cell death were conducted. Microorganisms which exhibited a radical scavenging activity (antioxidant capacity) with an absorbance rate of 0.19 or less were selected based on the criteria for native fermentation microorganisms and among them, the fermentation of broccoli pulverized liquid was conducted to the top 25 microorganisms. In order to prove the function of sulforaphane extracted at a high rate of efficiency, DPPH assay was conducted to evaluate the antioxidant activity which eliminates free radicals that cause aging. In addition, by evaluating live cells, the MTT assay, a test for evaluating changes in cell proliferation or apoptosis was conducted and oral health tests, which aim to inhibit the growth of oral microbes causing bad breath, were conducted and effects on anti-cancer, antioxidant and anti tooth decay were validated.

- 1) As a result of measuring the antioxidant capacity, it was shown that the antioxidant capacity was about 3 times higher than negative control group, which indicated that a large number and a large amount of antioxidant active substance exist in fermented broccoli solution. The measurement of the antioxidant capacity of the enzyme solution and the fermented broth showed the negative control group showed an antioxidant capacity of 4.4 %, when diluted with untreated broccoli solution. The enzyme solution. compared with negative control group, showed 17.6 %, four times more, and the fermentation broth was 20.5 %, which amounted to 4.7 times higher antioxidant capacity.

- 2) The test was conducted by using macrophage RAW 264.7 cells, and in the case of the macrophage cells, which are related to immunity, the test was conducted to select strains toxic to the cells through the macrophage cells. It was confirmed that when MTT assay was conducted by diluting unfermented broccoli four times, other microorganisms were shown to increase more than 3 times other than *Weissella cibaria*, and in the case of enzyme treated solution, it was shown that after diluted four times, it showed more than potent toxicity against more than 95 % of macrophages. In addition, all broccoli treated with enzymes showed the inhibition of the growth of the macrophage cells more than 10 times more. The results of liver toxicity test of broccoli enzyme solution showed 27.6 % of cell growth inhibition when diluted 4 times with broccoli solution. Compared with the negative control group, the enzyme solution was 63.9 %, which amounted to 2.3 times higher and the fermentation broth was 70.7 %, which amounted to 2.6 times higher.
- 3) Based on the judgment that adding 1/20, 1/50, 1/100 of fermentation broth in order to check oral health was thought too low in its concentration, the rate of concentration increased to 1/2, 1/4. Though positive results were obtained about the dilution of bacteria, more tests were conducted to dilute it further based on the result of 10^8 . Cavity bacteria are *Streptococcus mutans* and the results of the inhibition capacity of cavity bacteria by broccoli fermentation broth showed that the negative control group showed 1.3×10^8 number of the bacteria with untreated broccoli solution and when they were dispensed into the medium of broccoli fermentation broth, the number decreased by 100%. It was confirmed that adding fermentation solution has a much higher inhibition capacity than the unfermented broccoli solution of the negative control group.

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용된 *Lactobacillus paracasei* JSKIU 12-9 (KCTC18805P)와 *Weissella cibaria* JSKIU 18-18 (KCTC18806P)는 제주 토속 발효식품인 멸치액젓으로부터 분리된 균주이다. 충치 발생 균주는 *Streptococcus mutans*을 사용하였다.

2) 발효

브로콜리를 세절한 후 믹서기에 넣고, 브로콜리의 약 2배의 증류수를 믹서기에 넣어 1 분 30 초 동안 분쇄하였다. 믹서한 브로콜리를 50 ml conical tube에 30 ml 넣은 후 유산균 1/50 접종하였다. Shaking incubator에서 37 °C, 250 rpm으로 12 시간, 36 시간 동안 발효하였다.

3) DPPH assay

Sample을 12,000 rpm, 5 분간 원심분리 후 상등액을 사용하였다. 상등액을 0.45 μm syringe filter로 여과 후 희석하지 않은 sample과 증류수로 5배, 10배, 50배, 100배 희석 후 sample을 준비하였다. 암실에서 sample 500 μl 와 0.2 mM DPPH 500 μl 를 혼합 후 5 초동안 vortex 하였다. 정치배양기에서 25 °C, 30 분간 방치한 뒤 sample 1 ml를 큐벳에 넣고 spectrophotometer로 517 nm에서 측정하였다.

파장: 517 nm

Blank: D.W 1 ml

Control: D.W 500 μl + 0.2 mM DPPH 500 μl

Sample: sample 500 μl + 0.2 mM DPPH 500 μl

라디칼 소거 활성능 = $\{(\text{control} - \text{sample}) / \text{control}\} \times 100$

4) MTT assay

① DMEM FBS 대식세포 배지 제조 (1 ℓ 기준)

1 ℓ 비커에 3차 증류수 약 300 ml를 준비하고, magnetic bar를 넣고 섞어 주면서 DMEM powder 12.25 g을 넣었다. Sodium bicarbonate (Na_2CO_3)를 3.7 g/ℓ를 첨가하여 20~30 분 mixing한 후 pH를 7.4로 조정하였다. 증류수로 1 ℓ 될 때까지 fill up하고 mixing한 DMEM 배지를 450 ml, FBS 50 ml 순으로 filtration을 반복하였다.

② Cell Thawing

액체질소탱크에서 동결보존 중인 cell을 꺼내서 cell이 있는 cryotube에 배지를 조금 넣어 pipetting한 후 완전히 녹여 conical tube에 담았다. Conical tube를 원심분리기에 넣고 1,200 rpm에서 3 분동안 원심분리한 뒤 conical tube의 배지를 suction으로 제거하였다. 배지를 제거한 conical tube에 새로운 배지를 넣고 pipette을 이용하여 조심스럽게 pellete를 풀어주었다. F-flask에 배지 10 ml를 넣고 conical tube에 동물세포 1 ml를 접종한 후 flask를 살살 흔들어서 동물 세포가 골고루 퍼지게 해주고 동물 세포 전용 배양기인 CO_2 배양기에서 배양하였다.

③ Cell subculture

세포가 충분히 자란 cell culture dish의 배지를 완전히 제거하고 PBS 세척한 후 scraper를 이용하여 세포를 떼어냈고, 떼어낸 세포를 conical tube에 옮겨 담았다. Conical tube를 원심분리기에 넣고 1,200 rpm에서 3 분 동안 원심분리한 뒤 conical tube의 배지를 suction으로 제거하였다. 배지를 제거한 conical tube에 새로운 배지를 넣고 pipette을 이용하여 조심스럽게 pellete을 풀어주었다. F-flask에 배지 10 ml를 넣고 conical tube에 동물 세포 1 ml를 접종한 후 flask를 살살 흔들어서 동물 세포가 골고루 퍼지게 해주고 동물 세포 전용 배양기인 CO_2 배양기에서 배양하였다.

④ Cell seeding

동물세포 현탁액 중 10 μ l를 hemacytometer에 넣고 현미경을 이용하여 동물세포를 계수하였다. RAW 267.4 세포의 수를 1×10^6 만큼 배양하였고, 1×10^6 만큼 키운 세포를 96 well plate에 200 μ l씩 seeding하였다.

⑤ MTT assay

Seeding한 well plate의 상등액을 suction으로 제거해 다음과 같은 비율로 96 well plate에 배지와 sample을 넣어주었다 (total volume: 200 μ l).

24 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂에서 CO₂ 배양기에서 배양하여 배양한 96 well plate에 MTT 시약을 20 μ l 첨가한 후 CO₂ 배양기에서 2~3 시간 반응하였다. 96 well plate의 상등액을 suction한 후 DMSO 100 μ l를 넣고 실온에서 30 분 정도 shake 한 후 OD 570 nm에서 측정하였다. 결과값이 2를 넘을 경우 DMSO를 이용하여 희석해서 1대의 결과값을 만들었다.

Table 4-1. Composition of sample and medium for MTT assay.

Macrophage	Control	Raw material	Double dilution	4-fold dilution	8-fold dilution	20-fold dilution
Sample (μl)	0	0	100	50	25	10
Medium (μl)	200	200	100	150	175	190

4) 구강건강

브로콜리 발효액 제조를 위해 브로콜리를 세절하고 세절한 브로콜리를 진공 팩에 넣은 후 water bath에서 100 °C, 20 분간 열처리하였다. 얼음물에 20 분간 냉각하고 냉각이 끝난 브로콜리를 믹서기에 넣어주는데, 브로콜리의 약 2배의 증류수를 믹서기에 넣고 1 분 30 초 동안 분쇄하였다. 분쇄한 브로콜리를 삼각플라스크에 넣고, 유산균 1/50 접종하였다. Shaking incubator에서 37 °C, 250 rpm으로 24 시간 발효하였다. 4 °C, 10,000 rpm, 10 분간 원심분리 후 상등액만 Hydrophile 0.45 μ m filter로 여과하였다.

구강균 배지 제조를 위해 TSA (*Streptococcus mutans*) 배지, Columbia (*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*) 배지, Blood medium (*Porphyromonas gingivalis*) 배지와 브로콜리 발효액과 5 % Horse Blood mix하여 1 day 상온 건조 진행하였다. 구강균 (*Streptococcus mutans*)은 TSB 5 ml과 *Streptococcus mutans* 50 μ l을 37 °C에서 250 rpm으로 12 시간 전배양 진행하였다.

5) 통계분석

실험 결과는 통계분석 프로그램 SPSS statistics(SPSS ver. 12.0, SAS Inc.)를 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였고, 유의성 검정은 ANOVA를 이용하였다. Duncan 다중 검정 (Duncan's multiple range test)을 통해 P=0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

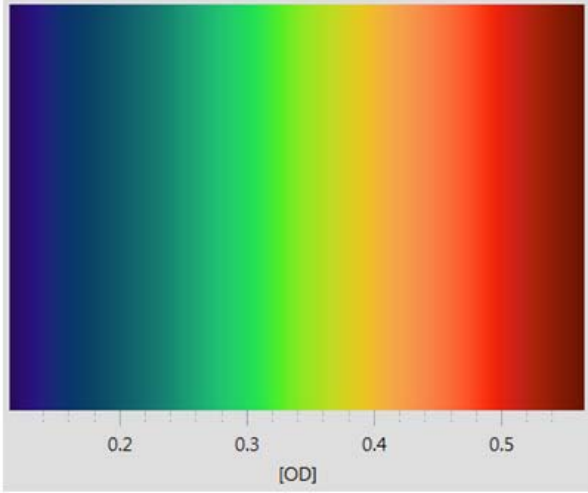
제주도 전통 발효식품들을 분쇄하여 유산균 및 그람 양성균이 선택적으로 배양되는 MRS 고체배지에 도말하여 분리한 단일 콜로니 1,000개를 단독 배양한 후 각각 순수 발효하여 항산화능 시험법인 DPPH 분석과 암세포사멸 시험법인 MTT 분석을 실시하였다. Hwang과 Lim (2015)은 브로콜리의 항산화, 항암능 등을 측정하기 위해 Total phenolics assay, Sulforaphane content assay, DPPH radical scavenging activity assay, Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) assay, Anticancer activity assay를 실시하였다.

토종 발효 미생물 선별 기준을 흡광도 0.15 이하로 라디칼 소거 활성능 (항산화능)을 보인 미생물을 선별하였고 (Fig. 4-1), 그 중 상위 25종 미생물들로 브로콜리 분쇄액의 발효를 진행하였다.

브로콜리는 자연적으로 glucosinolate, 페놀화합물, 비타민 C 미네랄 영양소 등 생체 활성 식물 화학물질 함량이 높아 건강증진 식품으로 판매되고 있다. 따라서 브로콜리는 심혈관계나 발암성 질병, 유방 및 전립선 질환과 같은 만성 질환을 예방하는 역할을 한다 (Jeffery 등, 2003; Moreno 등, 2006; Kaur 등, 2007; Ares 등, 2013).

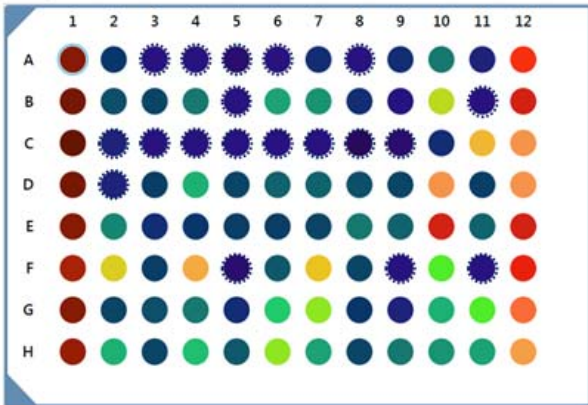
항암, 항산화, 구강 건강 효과 등 기능이 있다고 알려진 sulforaphane에 PITC (phenyl isothiocyanate) 처리를 하여 순수하고 안정된 sulforaphane을 제조하였으며 겨자씨로부터 추출한 myrosinase와 제주도 전통발효 식품들로부터 분리한 균주로 발효를 실시함으로 sulforaphane 함량을 극대화시켰다.

고효율로 추출된 sulforaphane의 기능성을 입증하기 위하여 노화의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화 활성도를 측정하고자 DPPH assay를 실행하였다. 또한 살아 있는 세포를 측정하여 세포의 증식 또는 사멸도 변화를 평가하는 실험인 MTT assay를 실행하였으며, 구취를 유발하는 구강 미생물의 성장을 저해하기 위한 실험인 구강건강도 실험을 진행하여 항산화, 항암, 항충치 효과를 모두 검증하였다.



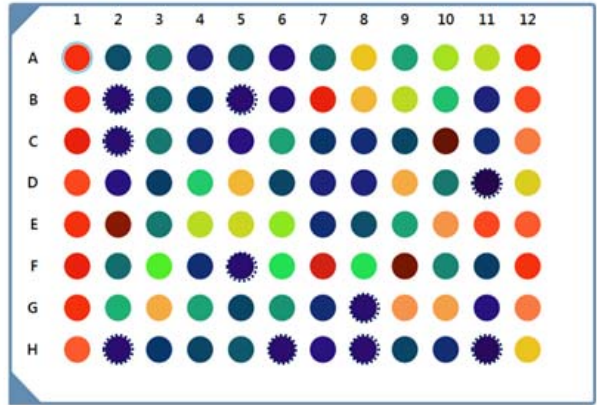
①

OPH_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5417	0.1792	0.1405	0.1479	0.1353	0.1454	0.1619	0.1474	0.1649	0.2417	0.1572	0.4904
B	0.5484	0.198	0.1915	0.2329	0.1482	0.2068	0.2564	0.1635	0.1407	0.3702	0.1642	0.5096
C	0.5567	0.1496	0.1453	0.1481	0.1493	0.1492	0.1426	0.1217	0.1314	0.1588	0.401	0.4279
D	0.5484	0.1499	0.1808	0.2727	0.1905	0.2169	0.2201	0.1993	0.1956	0.4342	0.1819	0.432
E	0.5441	0.2509	0.163	0.1749	0.1817	0.1833	0.1894	0.2385	0.2205	0.5082	0.2165	0.5042
F	0.5268	0.3827	0.1787	0.4101	0.1399	0.212	0.3962	0.1956	0.1432	0.3316	0.1448	0.4963
G	0.5472	0.1934	0.1961	0.2336	0.167	0.2913	0.3488	0.1766	0.1523	0.2781	0.3257	0.4622
H	0.5339	0.2729	0.1871	0.2813	0.2067	0.3508	0.2647	0.1943	0.2386	0.2593	0.2633	0.4259



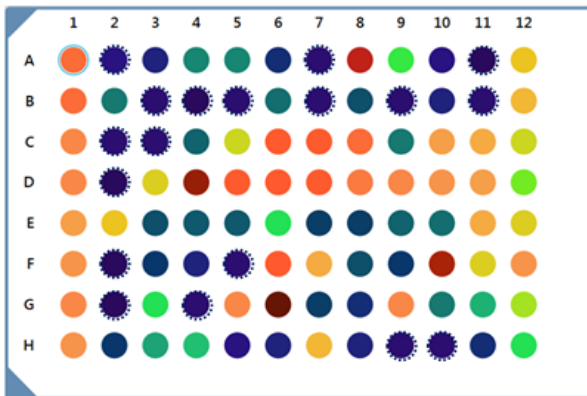
②

OPH_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5531	0.2237	0.2696	0.164	0.2358	0.1532	0.2472	0.443	0.2987	0.3993	0.4136	0.5559
B	0.5587	0.1497	0.2389	0.1829	0.1439	0.1537	0.568	0.4559	0.4111	0.3217	0.1621	0.5457
C	0.5587	0.1999	0.2666	0.1807	0.1589	0.2909	0.1908	0.1725	0.2073	0.6335	0.1773	0.5109
D	0.5467	0.1599	0.1979	0.3312	0.455	0.2084	0.1706	0.1668	0.4636	0.2636	0.1291	0.4388
E	0.5562	0.6212	0.2633	0.4131	0.6294	0.3927	0.1734	0.2152	0.2987	0.4887	0.5469	0.5358
F	0.5567	0.2473	0.3717	0.1783	0.1475	0.3472	0.5703	0.3532	0.6231	0.2766	0.2029	0.5496
G	0.5524	0.3017	0.4703	0.2908	0.2083	0.2825	0.1728	0.1444	0.4849	0.4739	0.1601	0.5106
H	0.531	0.1436	0.1865	0.2117	0.2319	0.1458	0.1557	0.1439	0.2147	0.1786	0.1355	0.4456



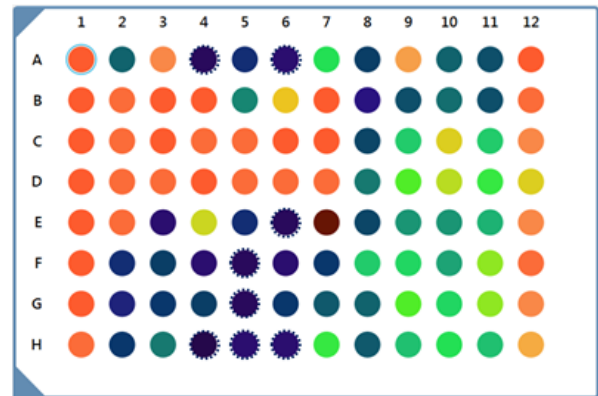
3

DPPH_3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5536	0.1489	0.1706	0.2775	0.2786	0.1804	0.1462	0.6159	0.3799	0.1552	0.1318	0.4712
B	0.5515	0.2709	0.1468	0.1335	0.1476	0.257	0.1392	0.2244	0.1455	0.1638	0.1393	0.4741
C	0.5293	0.1386	0.1476	0.2502	0.4443	0.5562	0.5581	0.5461	0.2748	0.5012	0.4919	0.4492
D	0.5281	0.1307	0.4606	0.6375	0.5558	0.558	0.5561	0.5389	0.5278	0.5168	0.4992	0.3948
E	0.4986	0.4619	0.2258	0.2296	0.2359	0.363	0.1961	0.1964	0.2435	0.2604	0.4907	0.4606
F	0.5165	0.1325	0.19	0.1683	0.1411	0.5619	0.4848	0.2239	0.19	0.631	0.4575	0.5082
G	0.5201	0.1252	0.3655	0.1444	0.5289	0.6702	0.1951	0.179	0.5253	0.2706	0.3114	0.4227
H	0.5095	0.192	0.3073	0.3293	0.1551	0.1672	0.4835	0.1631	0.1462	0.1432	0.1728	0.3585



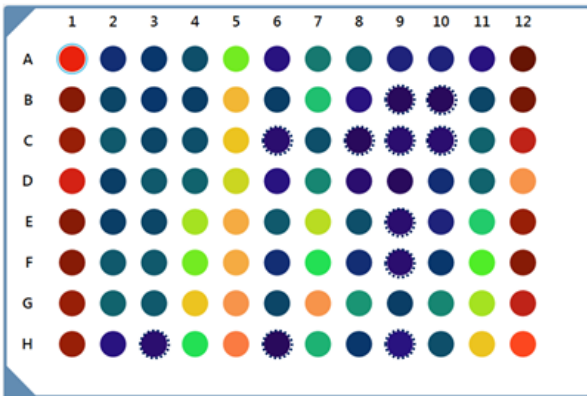
4

DPPH_4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5609	0.2496	0.5254	0.9412	0.1849	0.1457	0.3677	0.2041	0.5108	0.2566	0.2343	0.5614
B	0.5691	0.5573	0.5611	0.56	0.288	0.4767	0.5619	0.1655	0.228	0.2611	0.2339	0.5576
C	0.5608	0.5562	0.5595	0.5586	0.5584	0.5597	0.5601	0.2151	0.3505	0.4609	0.3425	0.5254
D	0.5597	0.5587	0.556	0.5595	0.5575	0.5586	0.5572	0.2719	0.3868	0.4412	0.3823	0.4596
E	0.5597	0.5583	0.153	0.447	0.1778	0.1392	0.6743	0.2171	0.3008	0.2987	0.3191	0.5299
F	0.5701	0.1789	0.2022	0.1543	0.1422	0.1529	0.1923	0.3508	0.3616	0.3068	0.4199	0.5503
G	0.561	0.1674	0.1946	0.2042	0.1338	0.1935	0.2383	0.2511	0.3901	0.3522	0.4143	0.5258
H	0.5556	0.2004	0.2803	0.1111	0.1466	0.1462	0.3747	0.2375	0.3367	0.3719	0.3369	0.4917



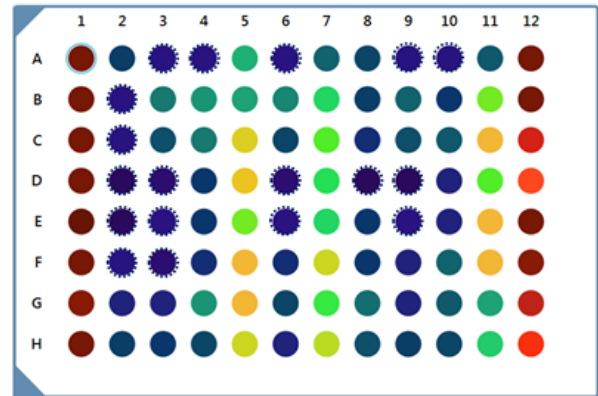
5

DPPH_5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5027	0.172	0.1782	0.211	0.346	0.1537	0.2444	0.2253	0.1598	0.1616	0.1526	0.5648
B	0.5476	0.2036	0.1841	0.1883	0.4136	0.1919	0.2933	0.1501	0.1304	0.1311	0.2028	0.5607
C	0.542	0.2181	0.1973	0.2111	0.4012	0.1427	0.21	0.1379	0.1406	0.146	0.2269	0.525
D	0.5102	0.1899	0.2211	0.2249	0.3804	0.1553	0.2548	0.1451	0.1299	0.1706	0.2285	0.4379
E	0.5511	0.1876	0.1963	0.3634	0.4169	0.214	0.3781	0.2106	0.1452	0.1611	0.3049	0.5449
F	0.5515	0.2155	0.2173	0.3484	0.4232	0.179	0.3165	0.1752	0.1465	0.1843	0.3365	0.552
G	0.5404	0.223	0.2209	0.4071	0.4396	0.2007	0.4398	0.2606	0.1892	0.2576	0.363	0.5275
H	0.5383	0.1576	0.1397	0.3223	0.4584	0.1299	0.2815	0.1834	0.1494	0.205	0.3995	0.4861



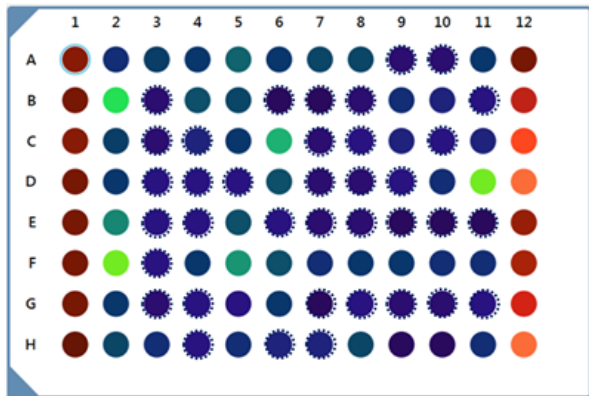
6

DPPH_6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5624	0.185	0.1422	0.1401	0.2794	0.1411	0.2263	0.194	0.1413	0.1442	0.2159	0.566
B	0.589	0.1407	0.2378	0.255	0.2684	0.2528	0.309	0.1867	0.2254	0.1698	0.3454	0.5644
C	0.5671	0.141	0.2067	0.2413	0.3929	0.1945	0.3388	0.1685	0.2066	0.2152	0.4138	0.5222
D	0.5676	0.1286	0.1338	0.1761	0.3992	0.1373	0.3213	0.1273	0.1213	0.1567	0.3328	0.4847
E	0.5701	0.1264	0.1459	0.171	0.3413	0.1451	0.3053	0.1706	0.1427	0.1585	0.4159	0.5652
F	0.5659	0.1409	0.1342	0.1666	0.4121	0.1663	0.3844	0.1791	0.1548	0.2178	0.4108	0.5549
G	0.5603	0.1536	0.156	0.263	0.4149	0.1926	0.3305	0.2355	0.1584	0.2103	0.2672	0.5264
H	0.5681	0.1787	0.1722	0.1966	0.3797	0.1577	0.37	0.1997	0.1838	0.1961	0.2939	0.4958



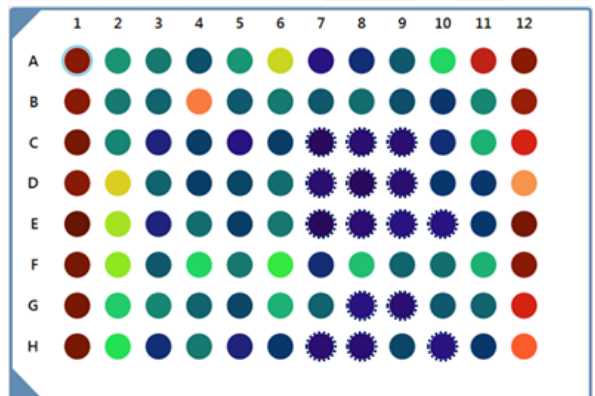
7

DPPH_7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5315	0.1567	0.178	0.1653	0.2139	0.1654	0.1883	0.1827	0.1117	0.1277	0.1654	0.532
B	0.5324	0.3011	0.1302	0.195	0.1833	0.1245	0.1246	0.1341	0.1566	0.1524	0.137	0.4981
C	0.5231	0.1799	0.1354	0.1466	0.1704	0.2668	0.1325	0.1449	0.1529	0.1399	0.1501	0.4671
D	0.5372	0.1636	0.1405	0.1443	0.1437	0.1915	0.1306	0.1273	0.1440	0.1564	0.3297	0.4429
E	0.5407	0.2408	0.1441	0.1398	0.1931	0.1402	0.1308	0.1294	0.118	0.1241	0.1264	0.5172
F	0.5329	0.3318	0.1392	0.1698	0.2471	0.1907	0.1588	0.1672	0.1655	0.1581	0.1612	0.5071
G	0.539	0.1636	0.1325	0.1431	0.1368	0.171	0.1243	0.1395	0.1331	0.1335	0.1443	0.4919
H	0.5408	0.1884	0.1595	0.1447	0.1599	0.1488	0.1472	0.1831	0.1213	0.1229	0.158	0.4451



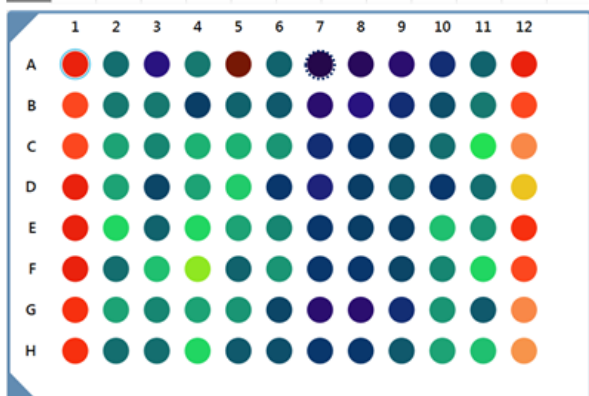
8

DPPH_8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.528	0.2566	0.2352	0.2034	0.2512	0.3726	0.1505	0.168	0.2137	0.3004	0.4994	0.5311
B	0.5292	0.2414	0.219	0.4421	0.2124	0.2341	0.2147	0.2322	0.2025	0.1774	0.2464	0.5215
C	0.5363	0.2423	0.1579	0.1804	0.1508	0.1824	0.1328	0.1366	0.1404	0.1639	0.2763	0.4922
D	0.5291	0.3807	0.2161	0.1835	0.1933	0.2271	0.1381	0.1352	0.1386	0.176	0.1751	0.4242
E	0.5435	0.352	0.1587	0.2286	0.1804	0.2372	0.127	0.1402	0.1452	0.1478	0.1724	0.541
F	0.5375	0.3421	0.2144	0.2972	0.242	0.315	0.1631	0.2847	0.2158	0.2323	0.2688	0.5301
G	0.5406	0.2878	0.2485	0.2196	0.1948	0.2752	0.2175	0.1467	0.1371	0.2124	0.2205	0.4926
H	0.5412	0.3054	0.164	0.2379	0.1609	0.18	0.1374	0.1447	0.1911	0.149	0.174	0.4555



9

DPPH_9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5486	0.2632	0.1689	0.27	0.6108	0.2541	0.1464	0.1553	0.1642	0.1867	0.2499	0.5466
B	0.5304	0.2707	0.2721	0.2138	0.2519	0.2432	0.1563	0.1744	0.1917	0.2281	0.2688	0.5224
C	0.5247	0.3015	0.283	0.3128	0.3087	0.2865	0.1958	0.1968	0.2226	0.2557	0.3528	0.4914
D	0.5433	0.2982	0.216	0.2982	0.3248	0.2023	0.1847	0.215	0.2413	0.2055	0.2564	0.4418
E	0.5466	0.3421	0.2456	0.3364	0.2967	0.2764	0.1981	0.2096	0.2105	0.3215	0.2887	0.5389
F	0.5476	0.2994	0.3186	0.3847	0.2476	0.2885	0.1966	0.2047	0.2248	0.2768	0.3361	0.53
G	0.5373	0.2949	0.2785	0.2958	0.2946	0.2192	0.1586	0.1654	0.1861	0.2854	0.2423	0.4803
H	0.5365	0.2628	0.2552	0.3362	0.2399	0.2303	0.1996	0.1983	0.2426	0.2998	0.3191	0.4804



10

DPPH_10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.4954	0.2319	0.2407	0.2846	0.2726	0.2696	0.2267	0.2567	0.3311	0.2544	0.3483	0.5334
B	0.5146	0.2243	0.1881	0.2654	0.2765	0.2373	0.1717	0.2094	0.263	0.2336	0.1862	0.5067
C	0.5053	0.2603	0.2199	0.2735	0.3089	0.2814	0.1959	0.3033	0.3001	0.304	0.3209	0.4856
D	0.5265	0.2705	0.2069	0.2558	0.233	0.2865	0.1671	0.2338	0.2651	0.3075	0.3073	0.4229
E	0.5015	0.3416	0.2276	0.3198	0.4143	0.2927	0.1889	0.2688	0.2587	0.2892	0.2993	0.5154
F	0.5101	0.327	0.3219	0.3185	0.3053	0.3137	0.2568	0.2773	0.3196	0.2796	0.2778	0.5004
G	0.4917	0.2602	0.2301	0.2684	0.2741	0.2357	0.2063	0.2753	0.3092	0.2522	0.2222	0.4398
H	0.5235	0.2368	0.147	0.203	0.1852	0.1742	0.1979	0.1725	0.2696	0.2413	0.2532	0.4152

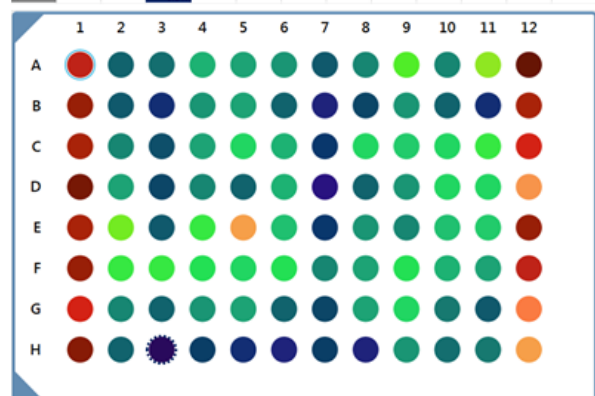


Figure 4-1. DPPH assay.

Figure 4-1을 통계적인 관점에서 살펴보면 OD 구간에서의 빈도수로 나타낼 수 있다 (Fig. 4-2). 맨위 좌측은 517 nm의 흡광도를 시각화한 reference 컬러로 well plate들의 1번 컬럼은 음성대조군, 12번 컬럼은 양성대조군을 나타낸다. 라디칼 항산화능을 보유한 토종 발효 미생물의 기준 흡광도를 0.15 이하로 설정 후 선별된 미생물의 발효 시료는 도트로 표시하였다. 대표성이 있는 1번부터 5번까지의 발효 시료들의 라디칼 소거 항산화능을 보면 양성대조군과 음성대조군의 차이가 확연하게 차이가 나지 않았다. 이는 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 농도를 낮게 처리한 결과라고 판단된다. 3번과 4번 plate의 경우에는 발효 시료의 항산화능이 음성대조군과 유의적으로 차이가 나지 않는 경우도 빈번하게 발생하는 것으로 확인하였다. 그럼에도 불구하고 음성대조군과 상대적으로 차이가 많이 나는 발효 시료들을 선택하여 보다 세밀한 DPPH 분석을 한다면 충분히 의미 있는 발효 시료가 될 수 있을 것이라 사료된다.

브로콜리 성분의 항산화 작용과 항암 작용에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다 (Kaur 등, 2007; Ares 등, 2013; Borowski 등, 2008; Farag와 Motaal, 2010). 제주 전통 발효식품으로부터 총 1,000종의 토종균들을 분리하여 강한 항산화 및 항암성을 보유한 균주들 43종을 동정하여 16S rRNA 서열 분석하였다 (Figure 4-4). 특히 *Weissella cibaria*의 보고된 기능성으로 항암, 항산화, 구취 제거, 면역조절, 염증 저하 등이 있다. 본 연구를 통해 균주 2종 *Lactobacillus paracasei* JSKIU 12-9, *Weissella cibaria* JSKIU 18-18 특허를 출원하였다.

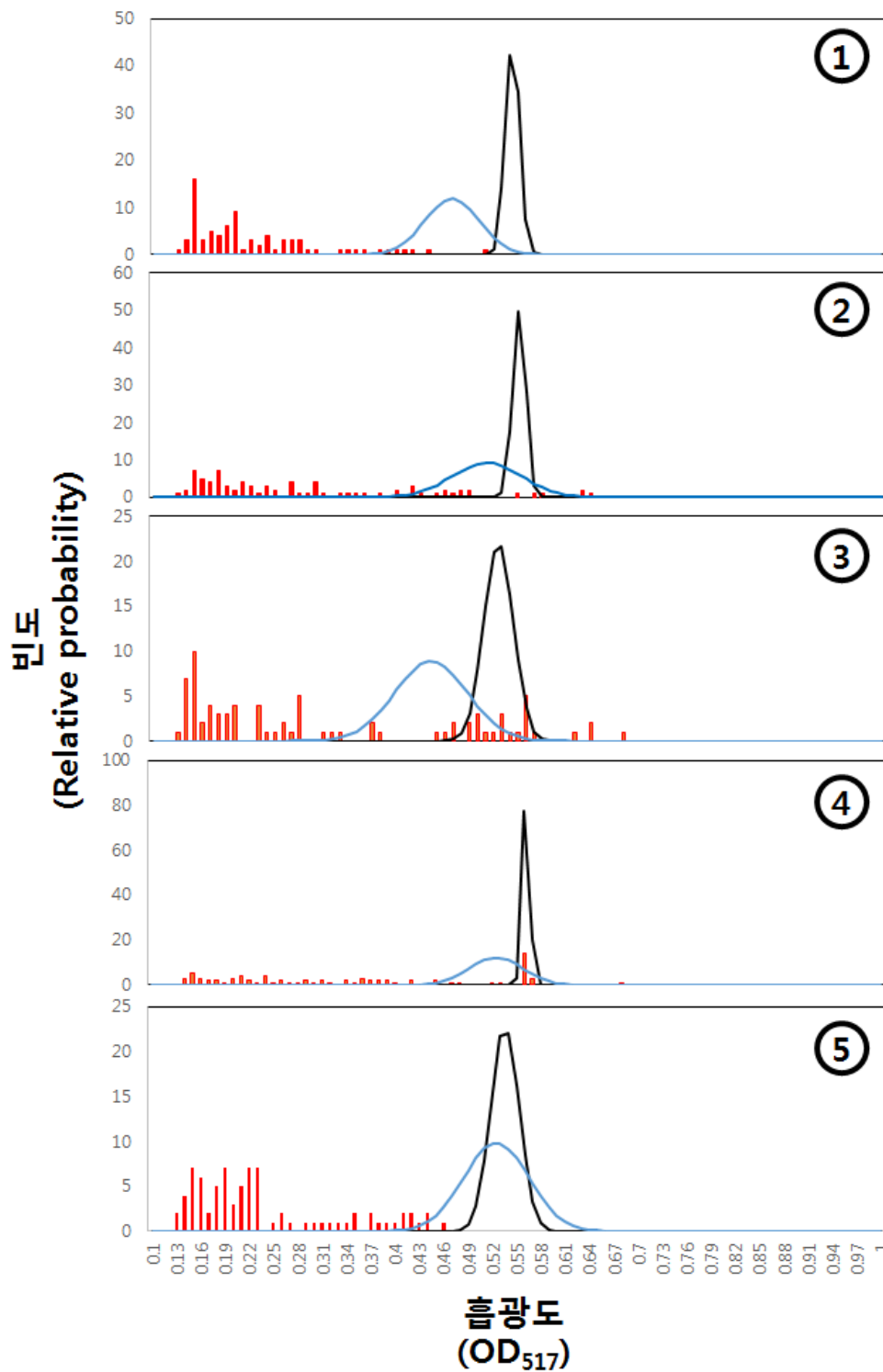
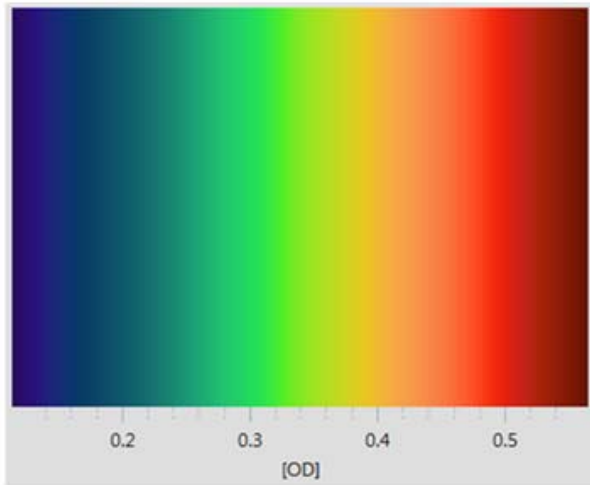


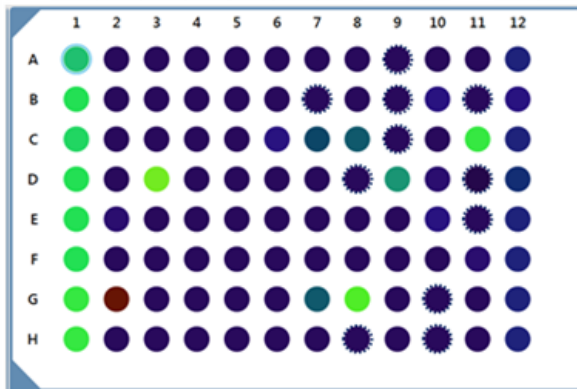
Figure 4-2. Probability analysis of DPPH assay

(black full line: the frequency of negative control, blue full line: the frequency of positive control, red stick: the frequency of fermented solution)



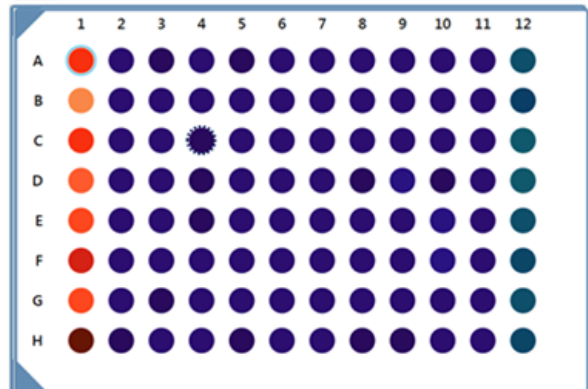
①

MTT_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6387	0.0794	0.0799	0.0792	0.0774	0.08	0.077	0.0744	0.0602	0.0745	0.0783	0.1825
B	0.757	0.0798	0.0817	0.0828	0.0803	0.0811	0.0611	0.0691	0.0912	0.1345	0.0591	0.116
C	0.7327	0.0815	0.0812	0.0866	0.0798	0.1295	0.3103	0.3911	0.6636	0.0848	0.7917	0.1718
D	0.7714	0.0811	0.8553	0.081	0.0793	0.0805	0.0795	0.0603	0.5458	0.0979	0.0517	0.199
E	0.7417	0.0948	0.0835	0.0818	0.0775	0.0861	0.08	0.0845	0.0699	0.1213	0.054	0.1616
F	0.7636	0.0766	0.0815	0.0809	0.0801	0.0854	0.0777	0.0835	0.0742	0.0863	0.1068	0.1703
G	0.7922	1.6668	0.0805	0.082	0.0766	0.0789	0.3772	0.8192	0.0814	0.0616	0.0717	0.1632
H	0.775	0.0664	0.0796	0.08	0.0848	0.0843	0.0841	0.0628	0.0619	0.0636	0.0755	0.1638



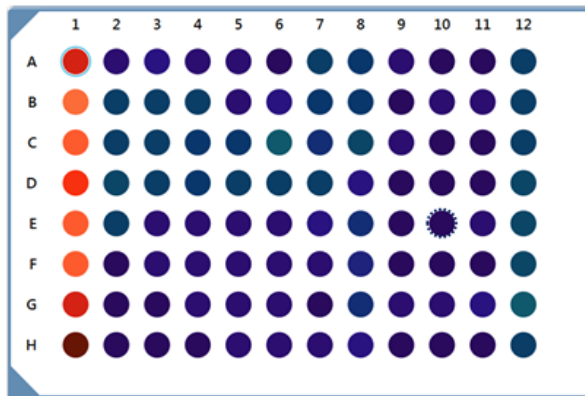
②

MTT_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6453	0.0805	0.0779	0.0844	0.0782	0.0822	0.0796	0.0792	0.0851	0.0801	0.0921	0.1908
B	0.5641	0.0835	0.0799	0.0871	0.083	0.0849	0.0914	0.0908	0.0868	0.0893	0.0852	0.1654
C	0.649	0.0874	0.0911	0.0641	0.0906	0.0879	0.0873	0.0862	0.0818	0.0896	0.0819	0.2023
D	0.6112	0.0815	0.0834	0.0785	0.0904	0.0843	0.0841	0.0773	0.0938	0.0699	0.0894	0.202
E	0.6258	0.0922	0.0885	0.0773	0.09	0.0914	0.0911	0.0825	0.089	0.0973	0.0928	0.1852
F	0.6782	0.0832	0.0841	0.083	0.0848	0.0863	0.0905	0.0891	0.092	0.0941	0.0895	0.1736
G	0.6327	0.0816	0.0771	0.0864	0.0803	0.0856	0.0857	0.0879	0.0929	0.0877	0.0854	0.195
H	0.7544	0.0781	0.0797	0.0931	0.076	0.0793	0.0816	0.0772	0.0783	0.0794	0.08	0.1706



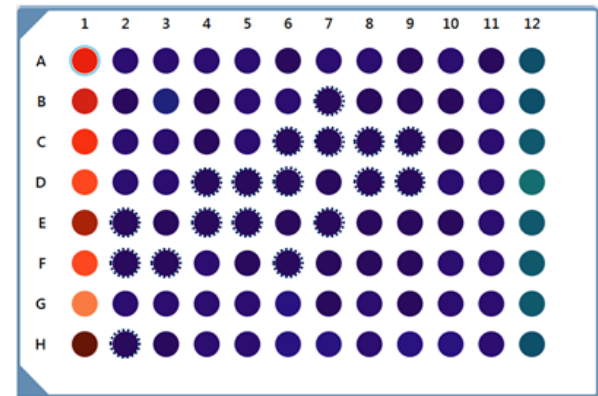
4

MTT_4-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6869	0.0895	0.0977	0.084	0.087	0.0753	0.1564	0.1464	0.084	0.078	0.0732	0.1553
B	0.6218	0.1668	0.1592	0.1668	0.0919	0.0991	0.155	0.1496	0.0684	0.0818	0.0822	0.1671
C	0.6265	0.1611	0.167	0.154	0.1504	0.2099	0.1379	0.1728	0.087	0.0689	0.0781	0.1611
D	0.6534	0.1706	0.1654	0.1508	0.1587	0.1573	0.1563	0.0996	0.0657	0.067	0.0742	0.1841
E	0.6354	0.159	0.0933	0.0936	0.0905	0.0823	0.0955	0.127	0.0681	0.0647	0.0895	0.1853
F	0.6353	0.067	0.0885	0.0923	0.0901	0.0849	0.0846	0.11	0.0669	0.0664	0.0786	0.1811
G	0.6831	0.0796	0.0776	0.0816	0.0805	0.0808	0.0731	0.134	0.0847	0.0891	0.0997	0.2034
H	0.7733	0.0748	0.0773	0.0724	0.0809	0.0809	0.0925	0.0957	0.0705	0.069	0.0772	0.1638



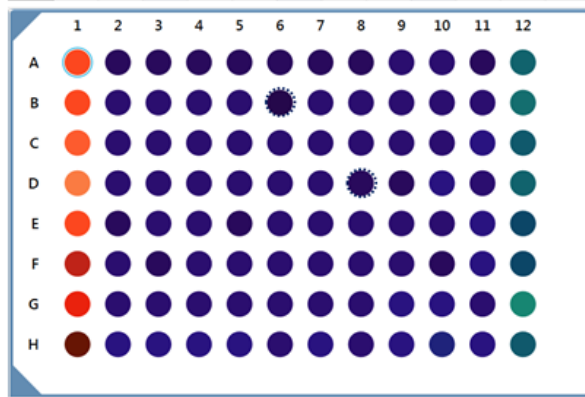
5

MTT_5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6383	0.0756	0.0797	0.0761	0.0793	0.075	0.0759	0.0759	0.0739	0.0857	0.0654	0.1818
B	0.6515	0.0657	0.1121	0.0669	0.0806	0.0784	0.0622	0.0712	0.0683	0.0739	0.0793	0.1863
C	0.6223	0.0846	0.0824	0.066	0.0757	0.0624	0.065	0.0641	0.0648	0.0744	0.0816	0.1925
D	0.6117	0.0839	0.0851	0.0628	0.0624	0.0632	0.0688	0.0624	0.0611	0.0776	0.0795	0.2177
E	0.6804	0.0638	0.0661	0.0648	0.0621	0.0744	0.0642	0.0718	0.0736	0.0737	0.0794	0.1949
F	0.5991	0.0617	0.0628	0.0757	0.0669	0.0645	0.0666	0.0696	0.0673	0.0845	0.0781	0.1927
G	0.5672	0.0759	0.0822	0.0787	0.0791	0.093	0.0706	0.0824	0.0719	0.0762	0.0829	0.1926
H	0.7247	0.0644	0.0694	0.0771	0.0771	0.0984	0.0964	0.0851	0.0919	0.0966	0.079	0.1798



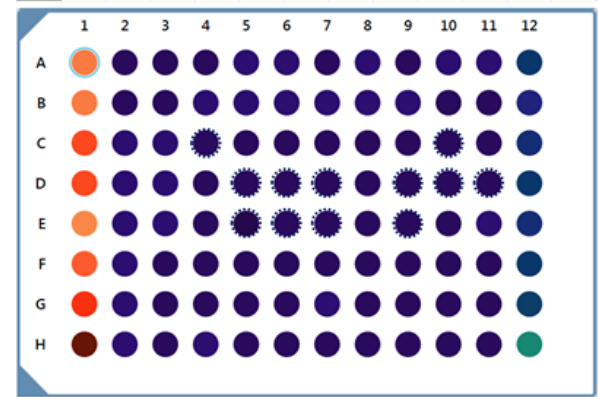
6

MTT_6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7036	0.0718	0.069	0.067	0.0697	0.0701	0.0742	0.0747	0.077	0.0765	0.0717	0.2328
B	0.6965	0.0864	0.0867	0.0865	0.0787	0.0582	0.0877	0.0843	0.0914	0.0815	0.0911	0.252
C	0.6921	0.0797	0.0819	0.0807	0.0778	0.0784	0.08	0.0809	0.0878	0.0848	0.0896	0.2158
D	0.6575	0.078	0.0779	0.0776	0.0762	0.0792	0.0802	0.0639	0.0738	0.058	0.0794	0.2338
E	0.7049	0.0665	0.0811	0.0771	0.0736	0.0802	0.0782	0.0766	0.0854	0.0783	0.1038	0.1907
F	0.7747	0.0782	0.0693	0.079	0.0795	0.0821	0.0788	0.0802	0.0903	0.0753	0.0959	0.1865
G	0.7367	0.084	0.0881	0.0774	0.0822	0.0864	0.0809	0.0909	0.0981	0.1064	0.0834	0.2874
H	0.8467	0.0959	0.0978	0.094	0.1075	0.0869	0.0962	0.0888	0.1035	0.1095	0.0925	0.2181



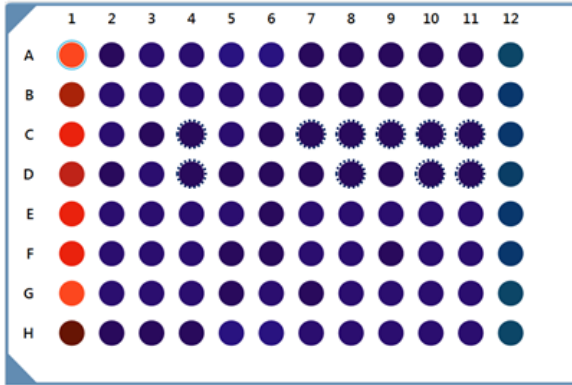
8

MTT_8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7133	0.0769	0.0756	0.0742	0.089	0.0819	0.072	0.0852	0.0703	0.0879	0.0853	0.1713
B	0.7077	0.0767	0.0784	0.0978	0.0834	0.0813	0.0908	0.0869	0.0832	0.0746	0.0794	0.1298
C	0.7704	0.0836	0.0821	0.0645	0.0664	0.0651	0.0656	0.0656	0.0657	0.0645	0.0675	0.1427
D	0.7963	0.0807	0.0828	0.0632	0.0647	0.0637	0.0646	0.0669	0.0646	0.0646	0.0634	0.1611
E	0.6951	0.0809	0.0804	0.079	0.0618	0.0624	0.0622	0.0665	0.0605	0.0789	0.0829	0.1528
F	0.7593	0.0803	0.0782	0.0789	0.0793	0.0768	0.0795	0.0753	0.0774	0.0742	0.0777	0.1579
G	0.7805	0.0804	0.0798	0.0796	0.0777	0.0763	0.0824	0.0797	0.0775	0.0768	0.0724	0.1834
H	0.9247	0.0806	0.079	0.0897	0.0748	0.0745	0.0755	0.0761	0.0737	0.0726	0.0731	0.3054



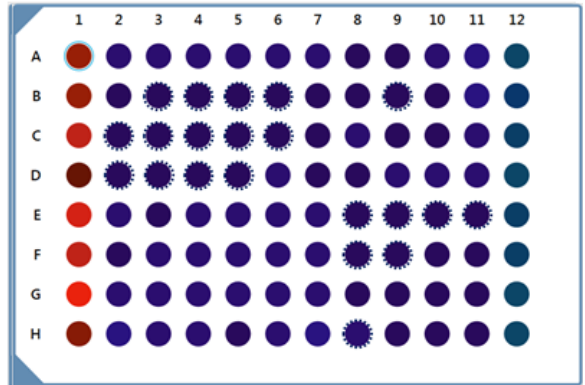
9

MTT_9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.6704	0.0732	0.079	0.0781	0.0925	0.0929	0.0745	0.0744	0.0722	0.0735	0.0707	0.1765
B	0.743	0.0837	0.0802	0.084	0.0764	0.0761	0.0742	0.073	0.0749	0.0733	0.0738	0.1501
C	0.6952	0.0791	0.07	0.0636	0.0752	0.0722	0.06	0.0602	0.0592	0.0616	0.0634	0.1411
D	0.7239	0.0665	0.0803	0.0643	0.0696	0.0697	0.0659	0.0646	0.0666	0.0646	0.0623	0.1631
E	0.6916	0.0806	0.0797	0.0786	0.0765	0.0741	0.0815	0.0795	0.0827	0.0774	0.0754	0.1489
F	0.6907	0.0802	0.0807	0.0818	0.0724	0.0746	0.0791	0.0805	0.0704	0.0795	0.0777	0.1538
G	0.6659	0.0803	0.0811	0.0812	0.0736	0.0799	0.0744	0.0793	0.0763	0.0808	0.0799	0.1757
H	0.8007	0.0726	0.0738	0.0741	0.0958	0.0959	0.0874	0.0893	0.0777	0.0788	0.0831	0.172



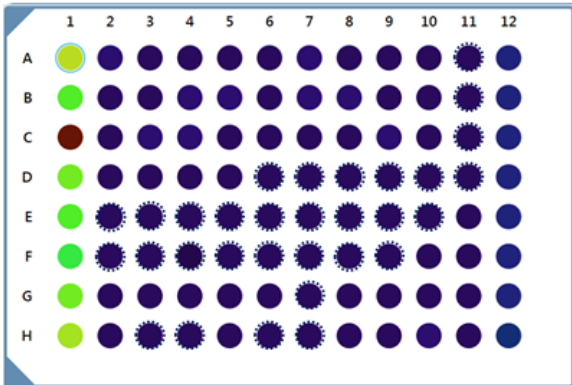
10

MTT_10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7117	0.0747	0.0736	0.0737	0.0773	0.0736	0.0764	0.0724	0.0728	0.0773	0.0921	0.164
B	0.7066	0.0685	0.0638	0.0618	0.0608	0.0626	0.0686	0.0726	0.065	0.068	0.0903	0.1386
C	0.6695	0.0632	0.064	0.0647	0.0637	0.0608	0.0676	0.0803	0.0697	0.0725	0.0818	0.1463
D	0.7415	0.0636	0.0644	0.0626	0.0641	0.0751	0.0675	0.0715	0.0739	0.0789	0.0809	0.1638
E	0.6588	0.0752	0.0722	0.0738	0.0803	0.0737	0.0744	0.0616	0.0595	0.0588	0.0592	0.1568
F	0.6745	0.0725	0.0746	0.0788	0.0762	0.0736	0.0738	0.0618	0.0588	0.0656	0.0691	0.1555
G	0.6543	0.0842	0.0809	0.0819	0.0776	0.0794	0.0765	0.0651	0.0587	0.0673	0.0665	0.1636
H	0.7153	0.0892	0.0838	0.0871	0.0675	0.0738	0.0934	0.0855	0.0648	0.0687	0.0673	0.1631



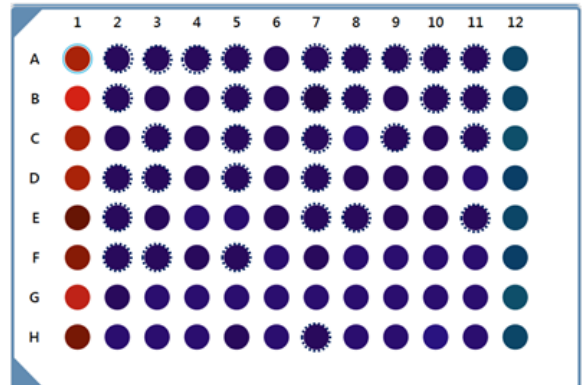
11

MTT_11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.8268	0.0966	0.0862	0.0881	0.0672	0.066	0.0911	0.0836	0.0756	0.0709	0.0626	0.1718
B	0.7169	0.0859	0.0881	0.096	0.089	0.069	0.0912	0.0909	0.0834	0.0656	0.0642	0.1592
C	1.4222	0.0812	0.0927	0.0928	0.0847	0.0836	0.0868	0.0874	0.0895	0.0733	0.0633	0.1629
D	0.744	0.0846	0.0886	0.0871	0.066	0.0624	0.0598	0.0611	0.0647	0.0618	0.0623	0.172
E	0.7104	0.064	0.0649	0.0613	0.0599	0.0624	0.062	0.0643	0.0636	0.065	0.0687	0.1485
F	0.6801	0.0614	0.0638	0.0597	0.0616	0.0626	0.0599	0.0634	0.0623	0.0804	0.0695	0.1624
G	0.7445	0.0688	0.0748	0.0747	0.0709	0.0684	0.0649	0.0676	0.067	0.0793	0.0839	0.16
H	0.8021	0.0781	0.0631	0.064	0.064	0.0644	0.0633	0.0807	0.067	0.0928	0.0805	0.186



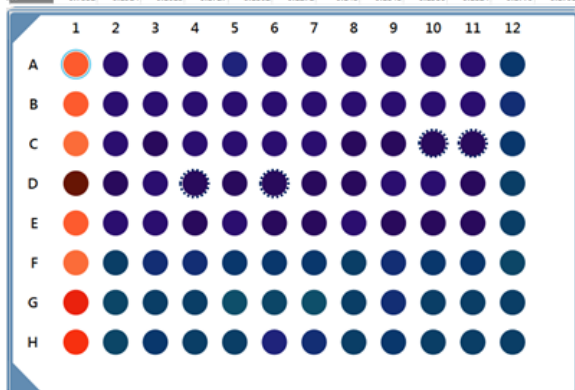
12

MTT_12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7259	0.0625	0.0621	0.0645	0.0634	0.066	0.0614	0.0606	0.0602	0.0614	0.0608	0.179
B	0.6987	0.063	0.0653	0.0665	0.0624	0.0675	0.0579	0.0649	0.0651	0.0632	0.0621	0.1689
C	0.7331	0.066	0.0625	0.0681	0.0599	0.0662	0.0588	0.0788	0.0628	0.0658	0.0619	0.1914
D	0.7902	0.0601	0.0625	0.0657	0.0627	0.0668	0.065	0.0676	0.0688	0.0667	0.0854	0.1577
E	0.7592	0.0648	0.066	0.0776	0.0793	0.0661	0.0643	0.0589	0.0687	0.072	0.0615	0.1806
F	0.7571	0.0649	0.0631	0.0659	0.0628	0.0777	0.0668	0.0765	0.0754	0.0812	0.0768	0.1631
G	0.7095	0.0688	0.0843	0.0774	0.0767	0.0815	0.0757	0.0805	0.0782	0.0797	0.0775	0.1875
H	0.7718	0.0798	0.0786	0.0787	0.0692	0.0763	0.0648	0.0851	0.0791	0.0943	0.0779	0.1731



13

MTT_13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7401	0.0885	0.084	0.0876	0.1193	0.087	0.0898	0.0889	0.0862	0.0922	0.0891	0.161
B	0.7438	0.0907	0.0779	0.0817	0.0816	0.0899	0.0855	0.0812	0.0861	0.0864	0.0822	0.1384
C	0.7252	0.0816	0.0763	0.0791	0.0785	0.0804	0.0791	0.0753	0.0757	0.0601	0.0506	0.1598
D	0.916	0.0666	0.0784	0.0614	0.0765	0.0633	0.0767	0.0727	0.079	0.0774	0.0664	0.1781
E	0.7407	0.077	0.0776	0.0659	0.0774	0.0707	0.0756	0.0795	0.0682	0.0684	0.068	0.1717
F	0.7333	0.1761	0.1384	0.1395	0.1613	0.1598	0.1669	0.1729	0.1409	0.1632	0.1618	0.192
G	0.799	0.2005	0.1823	0.1721	0.2207	0.1953	0.2157	0.1748	0.1443	0.1692	0.1854	0.1774
H	0.7881	0.1914	0.1618	0.1727	0.1802	0.1271	0.148	0.1848	0.1586	0.1824	0.1779	0.1792



14

MTT-14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.815	0.0829	0.085	0.1536	0.1658	0.1626	0.1631	0.1728	0.1587	0.1796	0.17	0.2746
B	0.825	0.0731	0.0834	0.1657	0.1487	0.1462	0.157	0.1772	0.1697	0.1776	0.1871	0.241
C	0.8386	0.0584	0.0786	0.1621	0.1646	0.1629	0.1462	0.1762	0.1764	0.1953	0.1224	0.2576
D	0.8015	0.0828	0.0659	0.1547	0.1909	0.1564	0.1877	0.1294	0.1838	0.1948	0.1669	0.2579
E	0.7969	0.0817	0.0802	0.1888	0.1595	0.1637	0.1626	0.1803	0.1814	0.1747	0.1816	0.2119
F	0.7572	0.1834	0.1467	0.1691	0.1659	0.167	0.1705	0.1712	0.205	0.1964	0.1621	0.2528
G	0.7186	0.1739	0.1495	0.1583	0.1203	0.1039	0.1763	0.1879	0.1753	0.1473	0.1941	0.2461
H	0.8129	0.1719	0.1482	0.1615	0.1644	0.1706	0.1507	0.1915	0.1853	0.1726	0.1852	0.1973

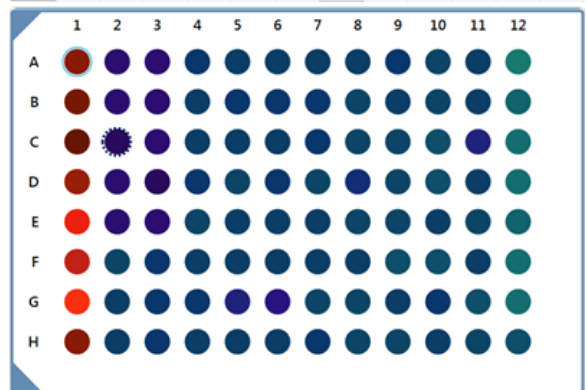


Figure 4-3. MTT assay.

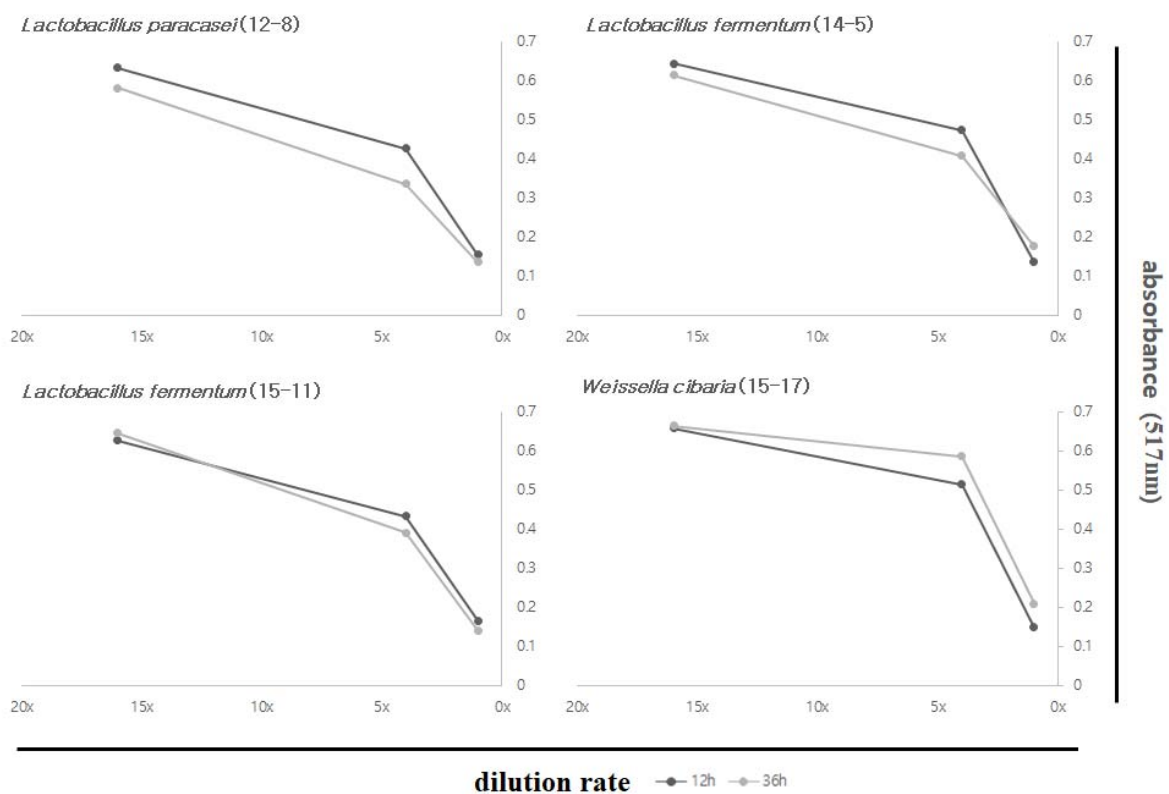
토종 미생물 sample 번호	동정 결과	토종 미생물 sample 번호	동정 결과	토종 미생물 sample 번호	동정 결과
1-27	<i>Weissella cibaria</i>	15-12	<i>Lactobacillus fermentum</i>	18-19	<i>Weissella cibaria</i>
1-28	<i>Weissella cibaria</i>	15-15	Unknown	18-20	<i>Weissella cibaria</i>
4-11	<i>Weissella cibaria</i>	15-17	<i>Lactobacillus brevis</i>	18-22	<i>Weissella cibaria</i>
71	<i>Weissella cibaria</i>	15-18	<i>Lactobacillus fermentum</i>	20-2	<i>Lactobacillus brevis</i>
7-11	<i>Weissella cibaria</i>	15-21	<i>Lactobacillus fermentum</i>	20-4	<i>Lactobacillus brevis</i>
10-15	<i>Lactobacillus sakei</i>	17-8	<i>Weissella cibaria</i>	20-6	<i>Lactobacillus brevis</i>
11-4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	7-15	<i>Weissella cibaria</i>	20-7	<i>Lactobacillus brevis</i>
11-13	<i>Lactobacillus fermentum</i>	17-16	<i>Weissella cibaria</i>	20-8	<i>Lactobacillus brevis</i>
12-8	<i>Lactobacillus paracasei</i>	17-26	<i>Weissella cibaria</i>	20-9	<i>Lactobacillus brevis</i>
12-9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	18-6	<i>Weissella cibaria</i>	20-18	<i>Lactobacillus brevis</i>
12-17	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	18-7	<i>Weissella cibaria</i>	20-19	<i>Lactobacillus brevis</i>
14-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	18-16	<i>Weissella cibaria</i>	22-17	<i>Weissella cibaria</i>
14-5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	18-17	<i>Weissella cibaria</i>	22-28	<i>Weissella cibaria</i>
15-11	<i>Lactobacillus brevis</i>	18-18	<i>Weissella cibaria</i>	23-6	<i>Lactobacillus sp. safa1</i>
				23-28	<i>Lactobacillus plantarum</i>

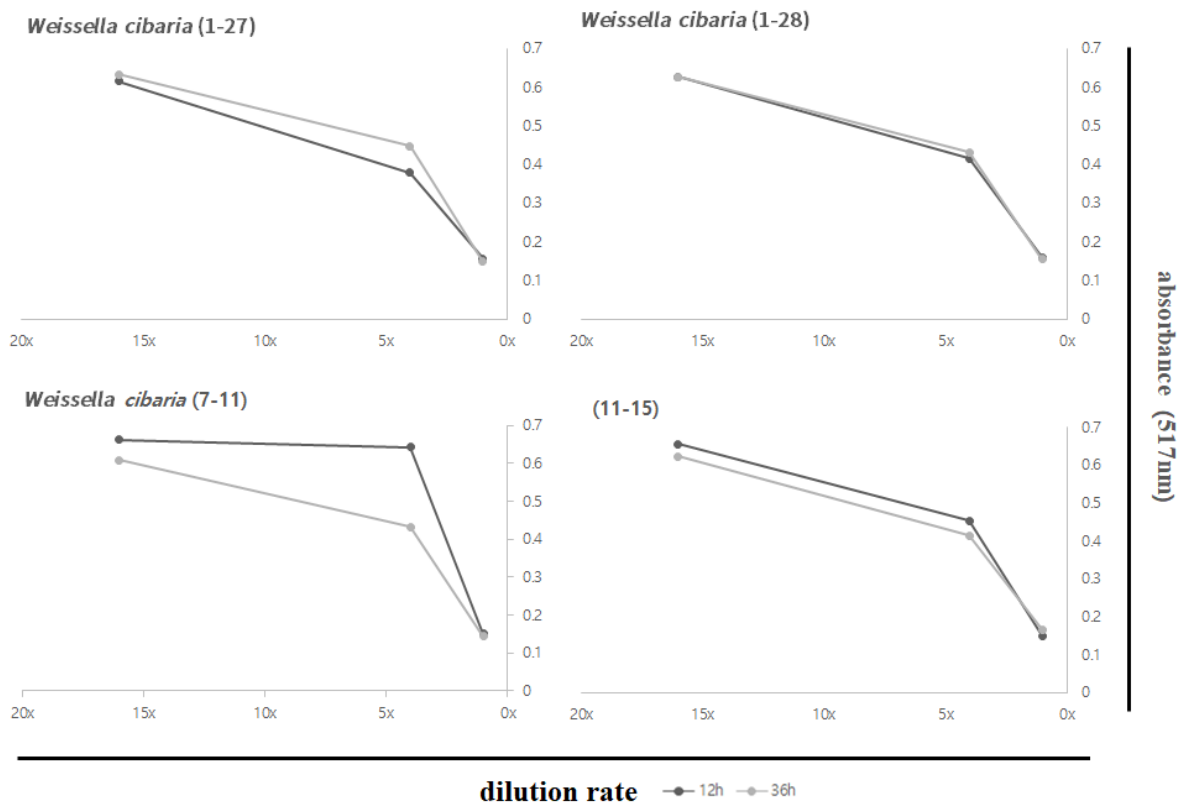
Figure 4-4. 16S rRNA sequence analysis of antioxidant and anti-cancer related strains.

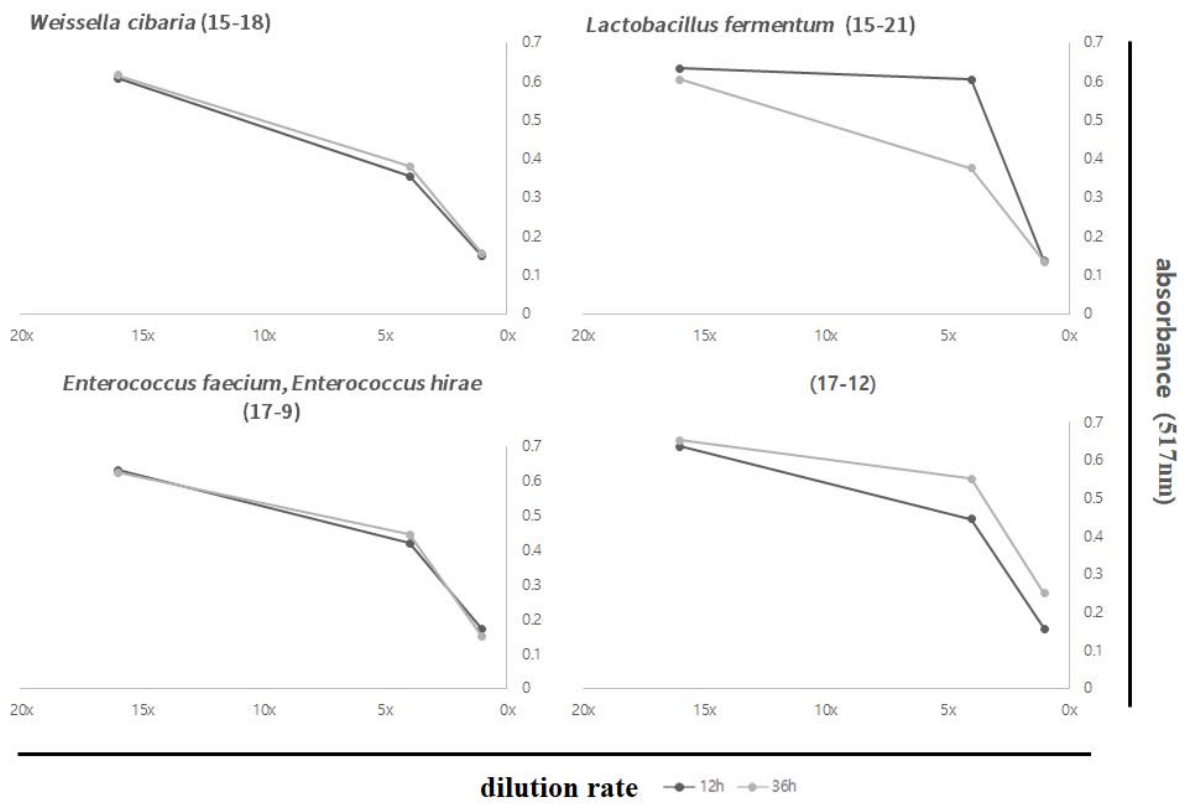
1) 항산화능 (DPPH assay)

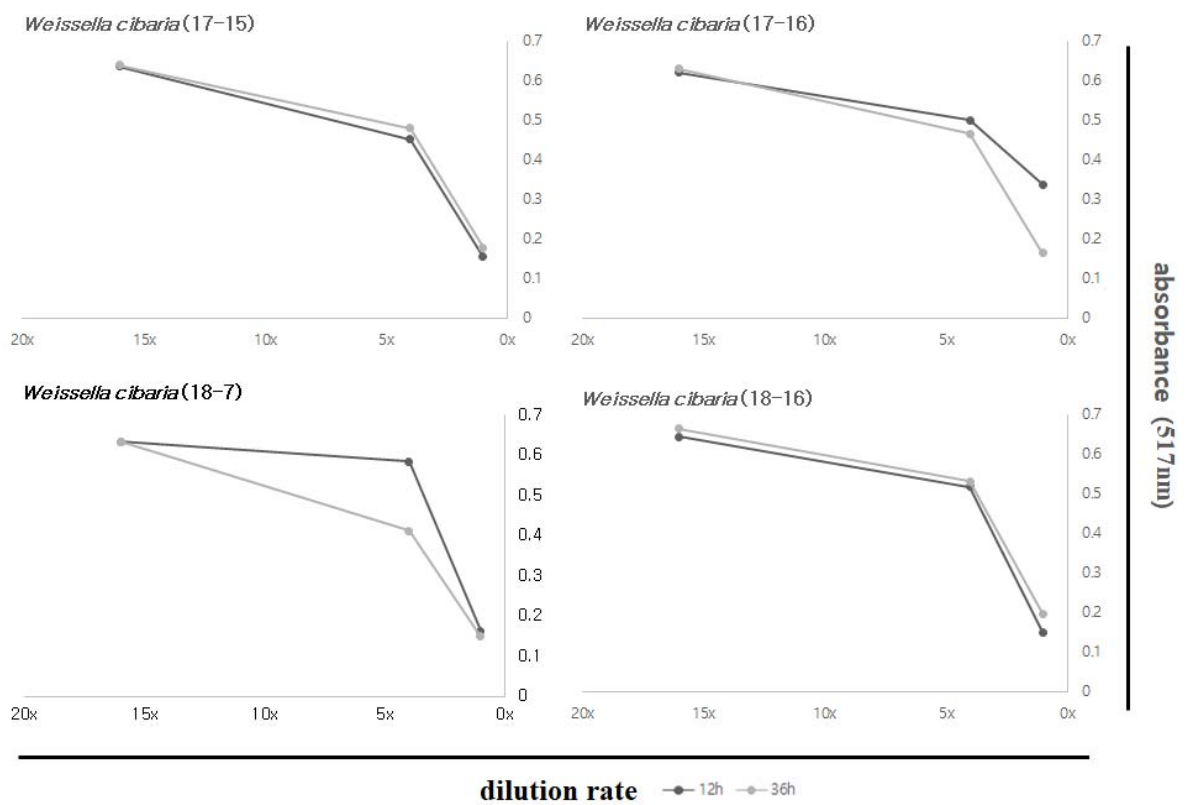
브로콜리는 많은 질병과 관련된 산화적 스트레스를 예방하는 항산화 작용을 보이는 것으로 밝혀졌다 (Borowski 등, 2008). 항산화능은 Liu 등 (2008)의 실험법을 참조하여 측정하였다. 음성대조군에 비해 A, B, C, D, E의 항산화능이 약 3배 높게 나온 것으로 보아 발효한 브로콜리액에서 다수, 다량의 항산화 활성 물질이 존재함을 알 수 있다. A와 E는 같은 균이지만 브로콜리 분쇄액에서 각각 활성이 다름을 알 수 있다. 음성대조군에 대해 A의 DPPH 결과는 약 6배로 가장 우수한 항산화 활성을 나타냄을 알 수 있고, 나머지 B, C, D, E의 결과도 음성대조군에 비해 약 4배 높다. 이를 통해 브로콜리 발효액에서 다수, 다량의 항산화 활성 물질이 존재함을 확인할 수 있다 (Fig. 4-5a~4-5c).

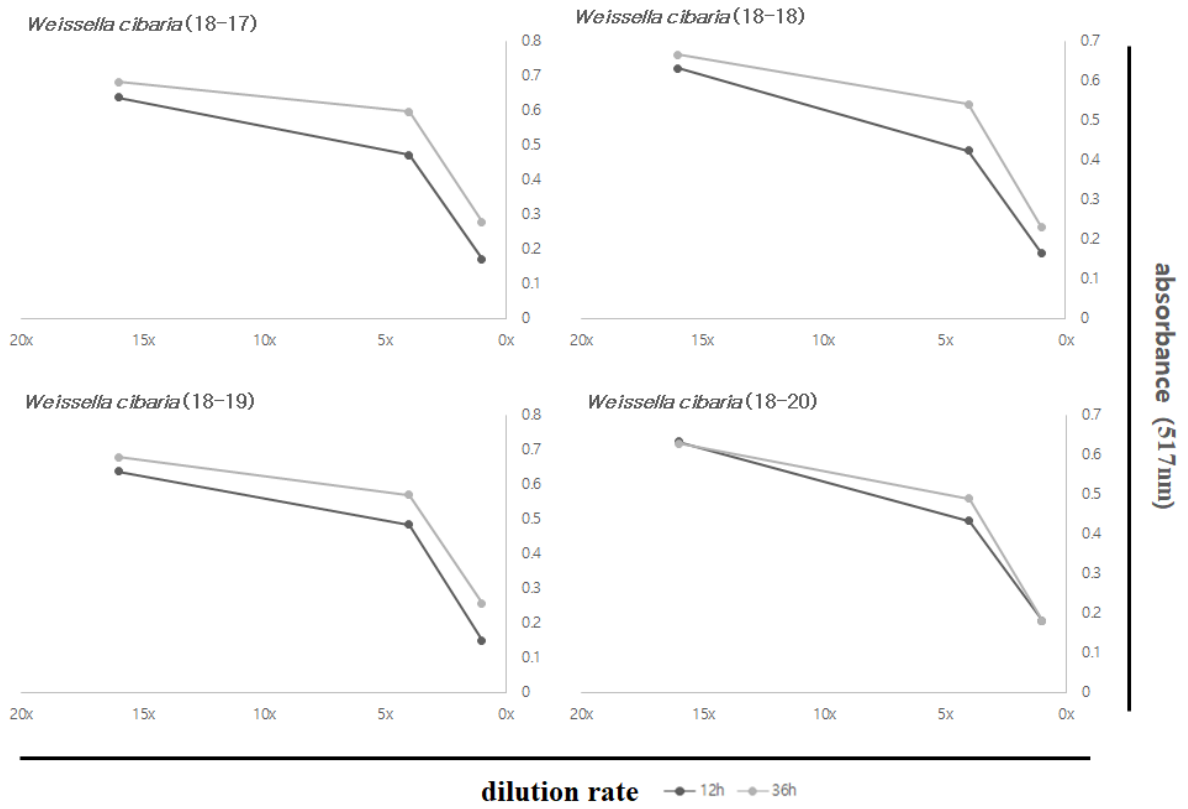
브로콜리 효소액과 발효액의 항산화능 측정한 결과 음성대조군은 무처리 브로콜리액으로 50배 희석했을 때 4.4 %의 항산화능을 나타냈다(Fig. 4-6a). 음성대조군에 비해 효소액은 17.6 %로 4배, 발효액은 20.5 %로 약 4.7배 높은 항산화능을 나타냈다 (Fig. 4-7a, 4-8b). Domínguez-Perles 등 (2010)은 브로콜리의 총 페놀량은 항산화능과 강한 상관관계가 있다고 보고했다. 또한 Im 등 (2010)도 무에서 총 페놀량과 항산화능이 강한 정의 상관관계가 있다는 것을 보여주었다. 이와는 대조적으로 Domínguez-Perles 등 (2010)은 브로콜리에서 sulforaphane 함량과 항산화능의 상관관계는 낮다고 보고했고, Farag와 Motaal (2010)도 역시 sulforaphane 함량은 브로콜리와 다른 십자화과 채소의 항산화능 작용에 기여하지 않는다고 밝혔다.

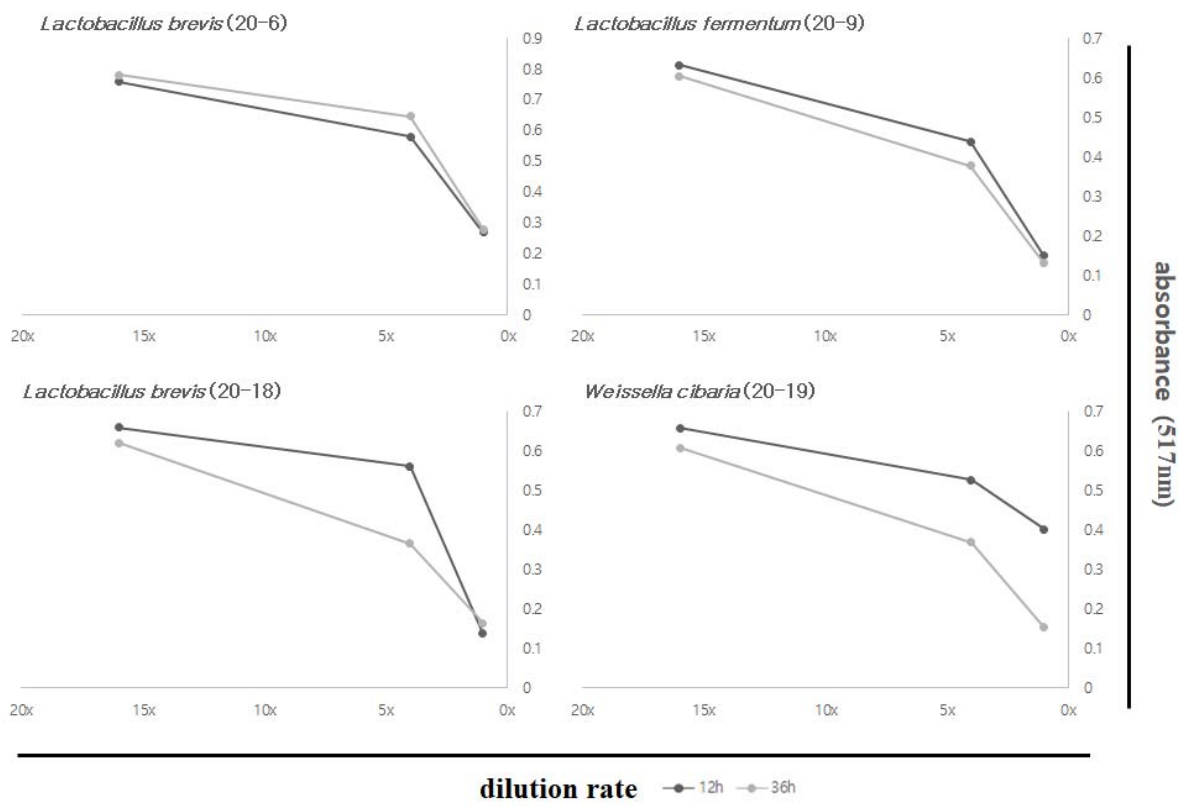












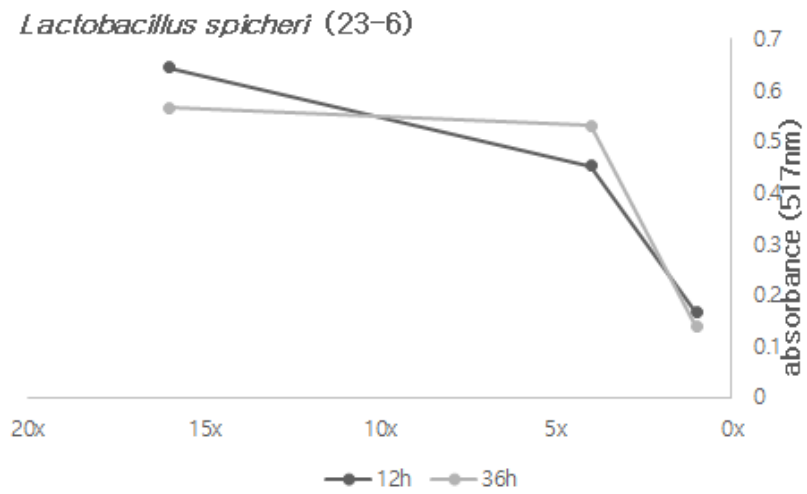
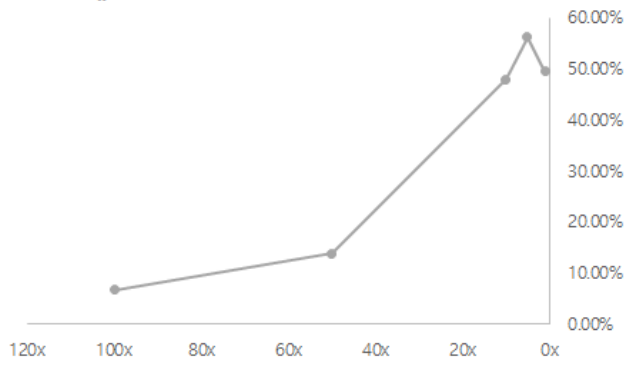
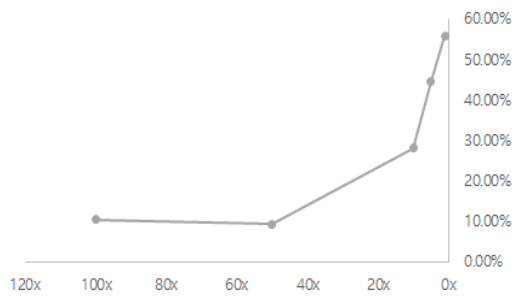


Figure 4-5a. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 12 and 36 hours.

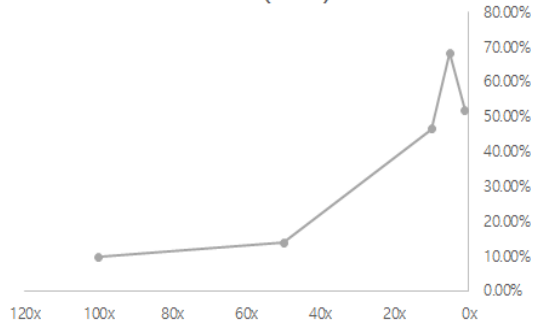
음성대조군



Enterococcus faecium, Enterococcus hirae
(17-9)



Lactobacillus fermentum (20-9B)



radical scavenging activity (%)

dilution rate

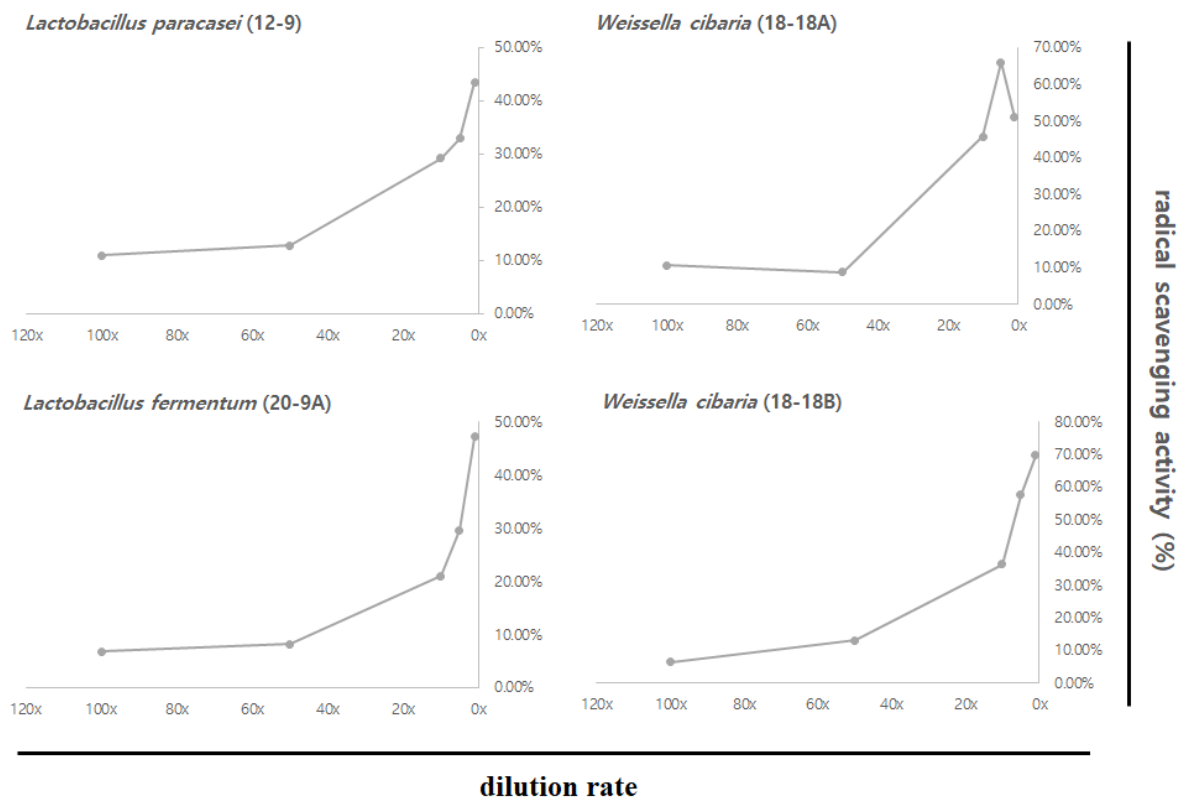
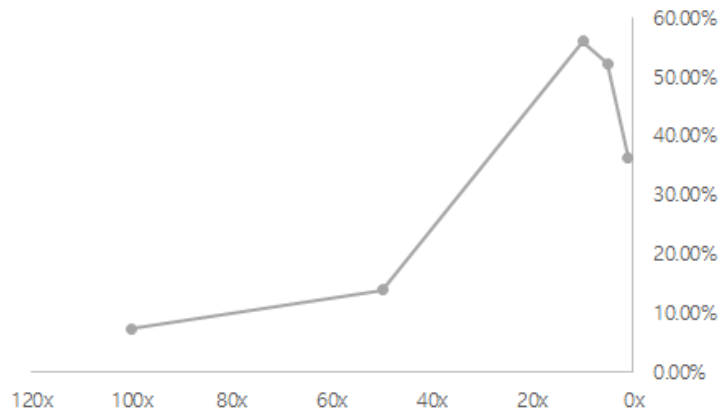
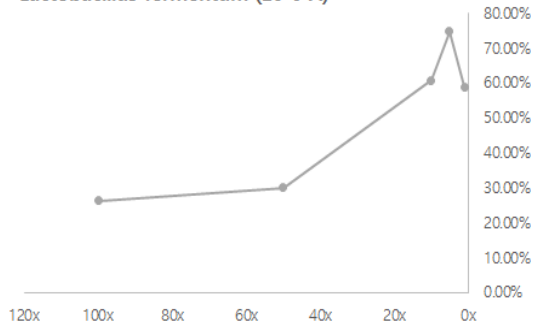


Figure 4-5b. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 24 hours.

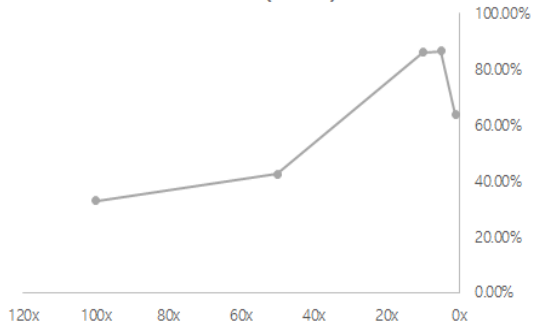
음성대조군



Lactobacillus fermentum (20-9 A)

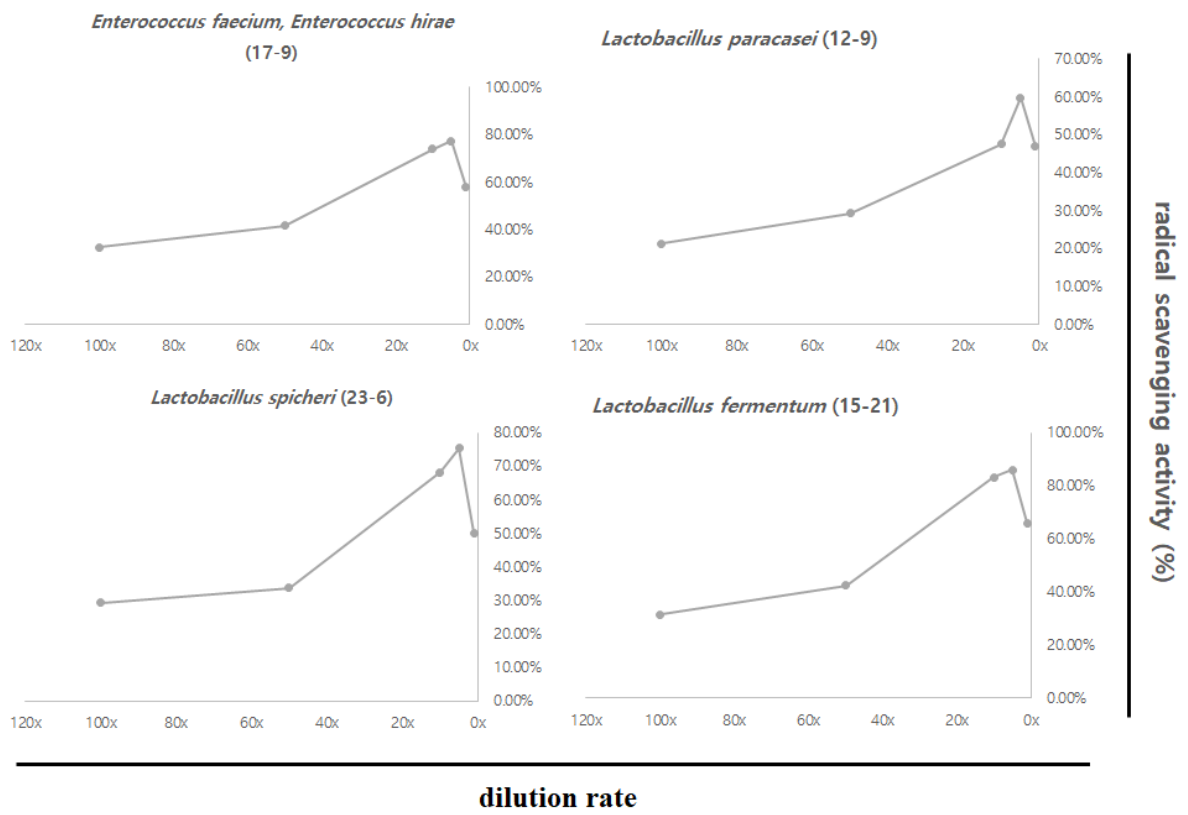


Lactobacillus fermentum (20-9 B)



radical scavenging activity (%)

dilution rate



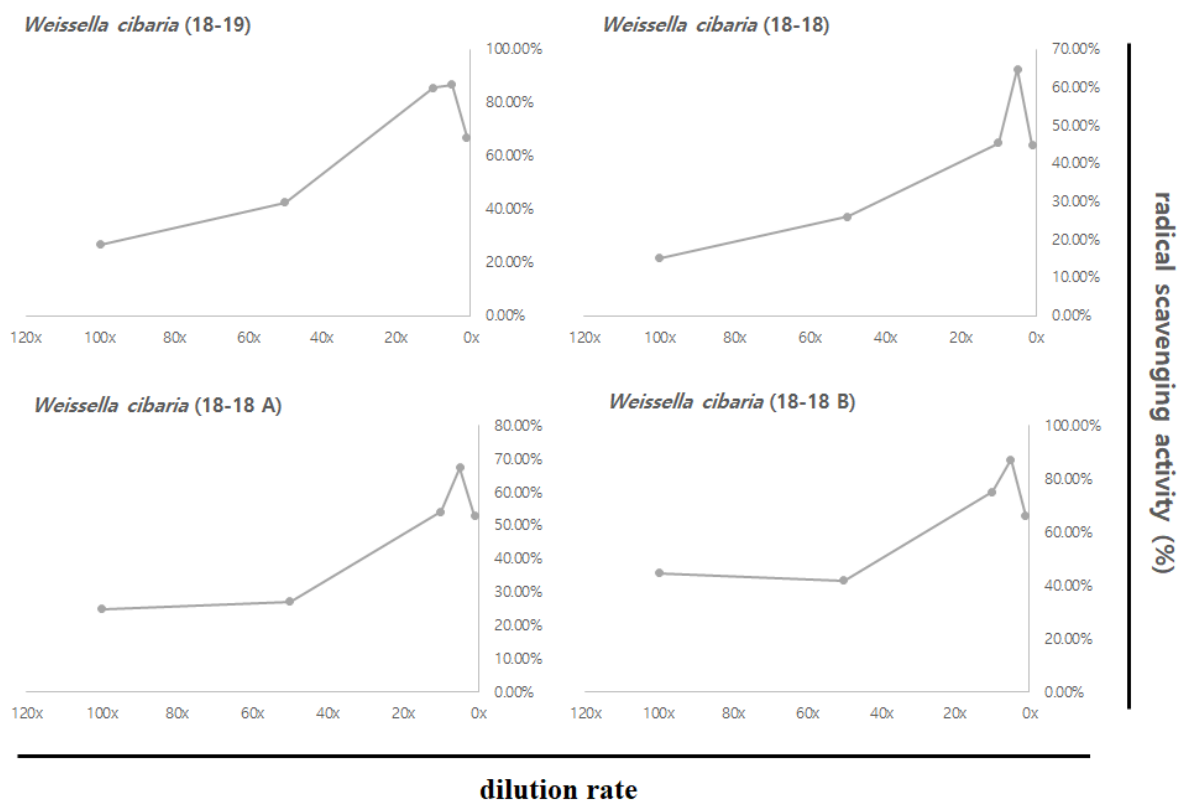


Figure 4-5c. Antioxidant capacity of the fermented broth from broccoli fermented at 37 °C for 12 hours after adding 0.3 % glucose.

Antioxidant capacity (%)	negative control	A	B	C	D	E
	13.92	41.76	41.76	42.49	42.49	42.49

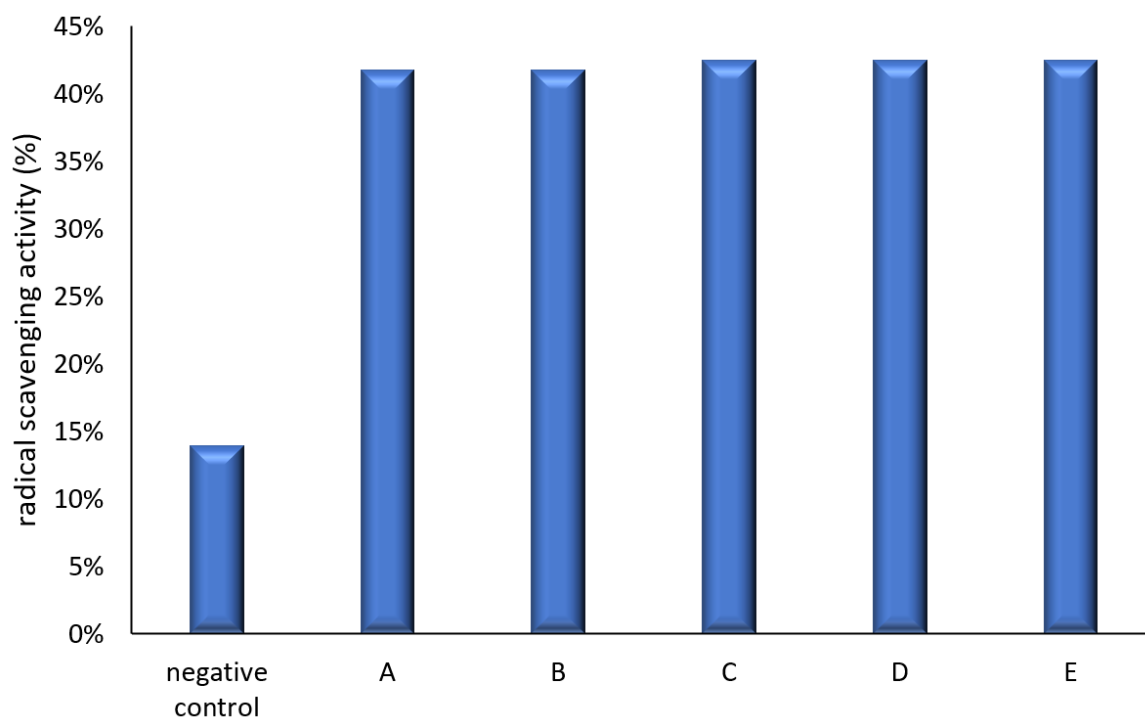


Figure 4-6a. DPPH analysis of broccoli fermentation broth (50-fold dilution)

(negative control : unfermented broccoli juice, A: *Weissella cibaria*,

B: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, C: *Lactobacillus fermentum*,

D: *Lactobacillus fermentum*, E: *Weissella cibaria*)

Antioxidant capacity (%)	negative control	A	B	C	D	E
	7.33	44.69	32.60	31.50	32.97	26.74

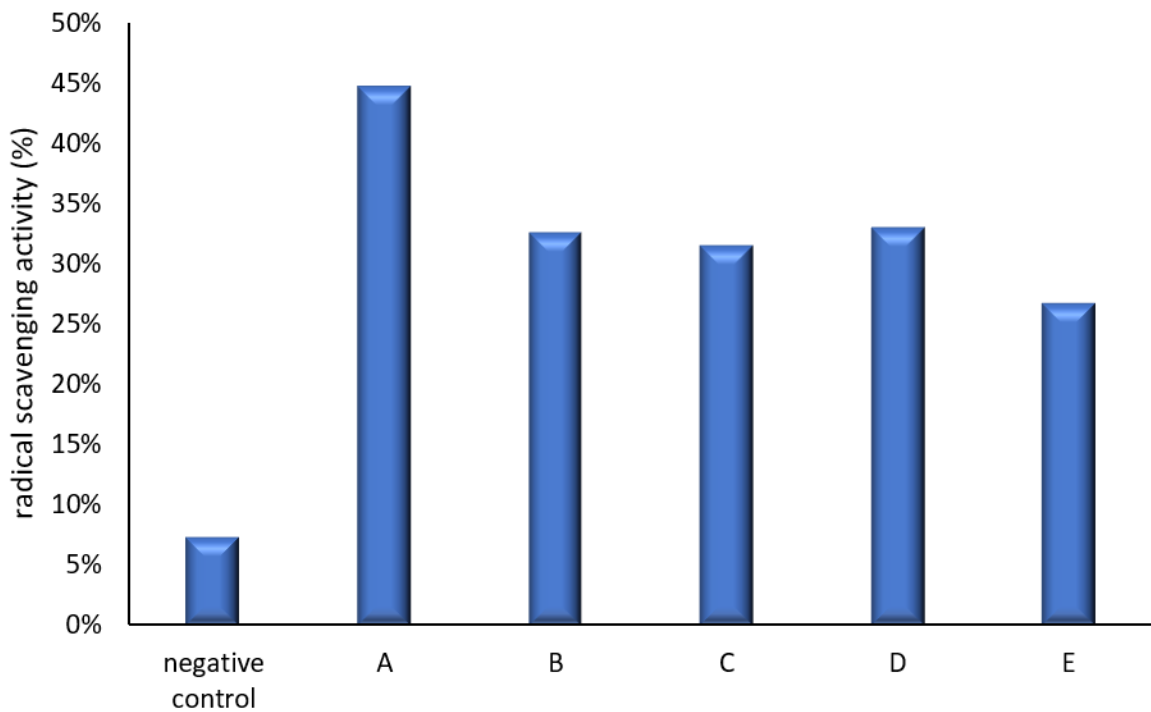


Figure 4-6b. DPPH analysis of broccoli fermentation broth (100-fold dilution).

(negative control : unfermented broccoli juice, A: *Weissella cibaria*,

B: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, C: *Lactobacillus fermentum*,

D: *Lactobacillus fermentum*, E: *Weissella cibaria*)

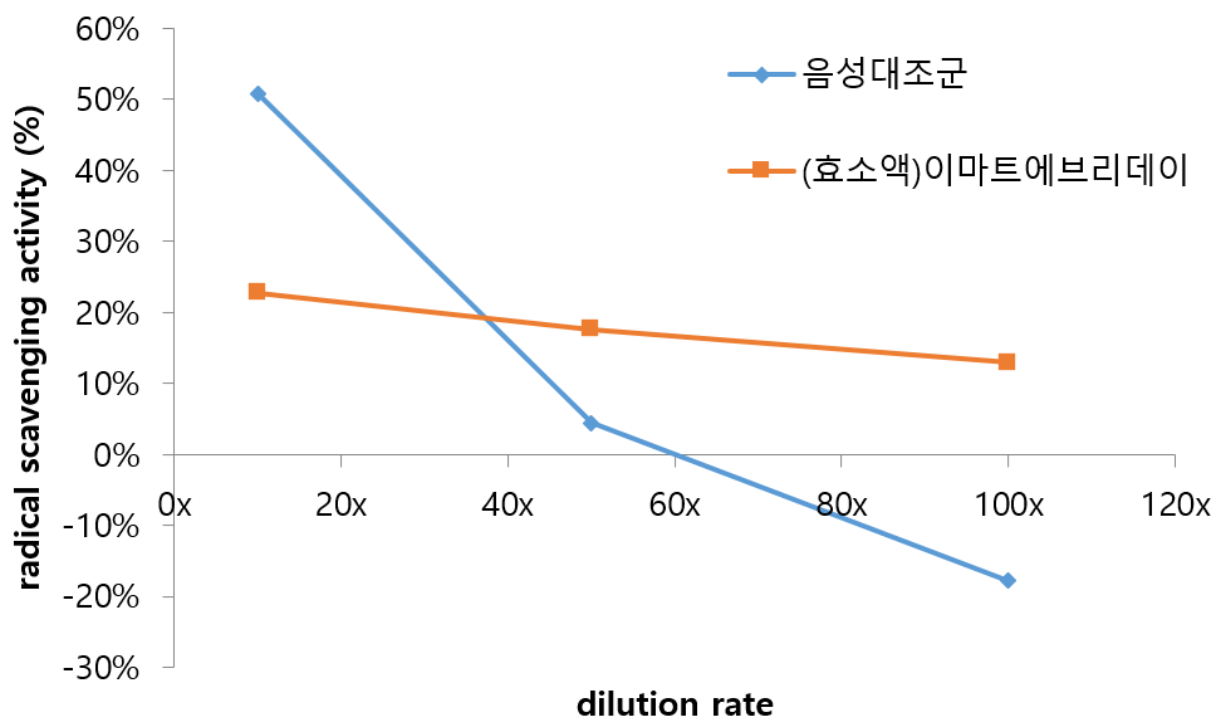


Figure 4-7a. Antioxidant activity of enzyme treated broccoli solution.

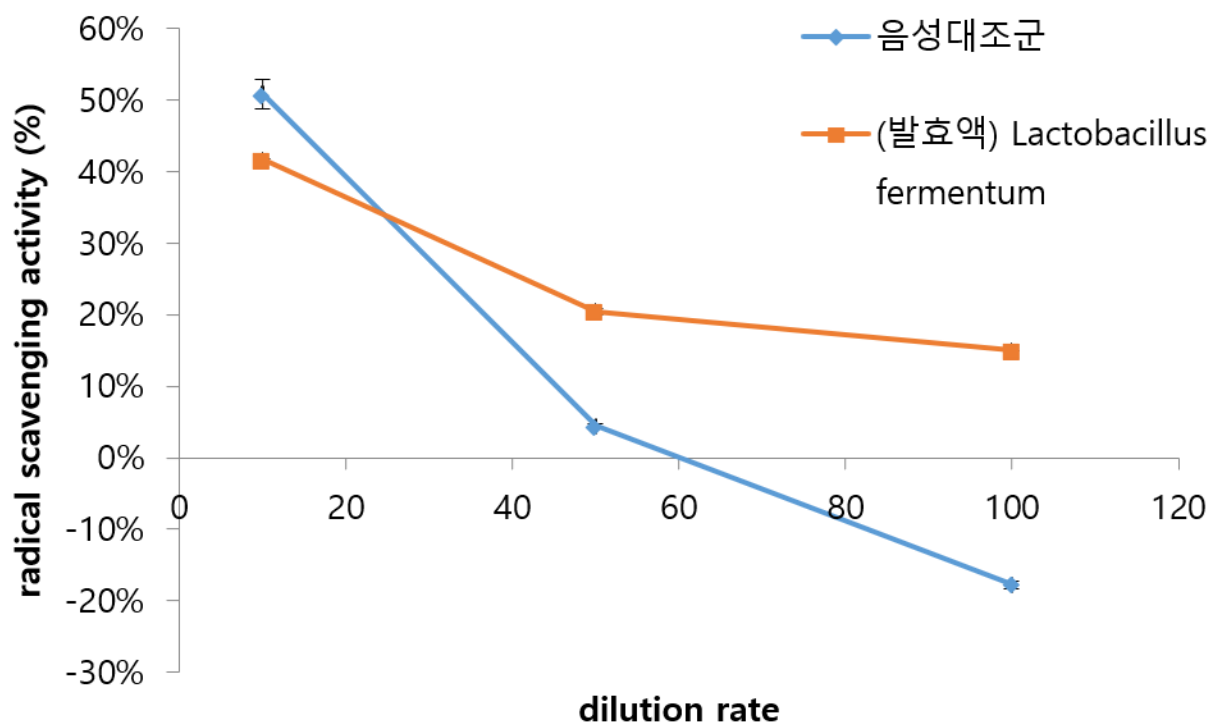


Figure 4-7b. Antioxidant activity of fermented broccoli solution.

2) 간이독성검사 (MTT assay)

항암능은 MTT assay를 통해 측정하였는데, Hwang과 Lim (2015)의 방법을 참조하여 측정하였다. 대식세포 RAW 264.7 세포를 이용하여 실험하였고, 해당 대식세포의 경우 면역을 나타내는 세포로 대식세포를 통하여 세포에 독성이 있는 균주를 선별하고자 실험을 진행하였다. 발효하지 않은 브로콜리를 4배 희석하여 MTT assay를 진행하였을 때 대식세포가 8.2 % 감소하는 것을 확인하였다. Fig. 4-11a~4-11c에서 *Weissella cibaria*를 제외한 다른 유산균들은 3배 이상의 증가율을 보였다. Fig. 4-13에서 효소처리액의 경우 4배 희석한 이후에도 95 % 이상의 대식세포에 대하여 강력한 독성을 보여주었다. 또한 효소 처리한 모든 브로콜리가 10배 정도의 대식세포 성장억제를 보였다 (Fig. 4-8~4-13).

브로콜리의 sulforaphane 성분이 항암 작용을 일으키는 주요 성분이라는 연구결과가 수없이 많이 나오고 있다 (Gamet-Payrastre 등, 2000; Haristoy 등, 2003; Singh 등, 2004). 브로콜리 효소액과 발효액의 간이독성 검사 결과 음성대조군은 무처리 브로콜리액으로 4배 희석했을 때 27.6 % 세포 성장 저해도를 나타냈다. 음성대조군에 비해 효소액은 63.9 %로 약 2.3배, 발효액은 70.7 %로 약 2.6배 높은 세포 성장 저해도를 나타냈다(Fig. 4-13a, 4-13b).

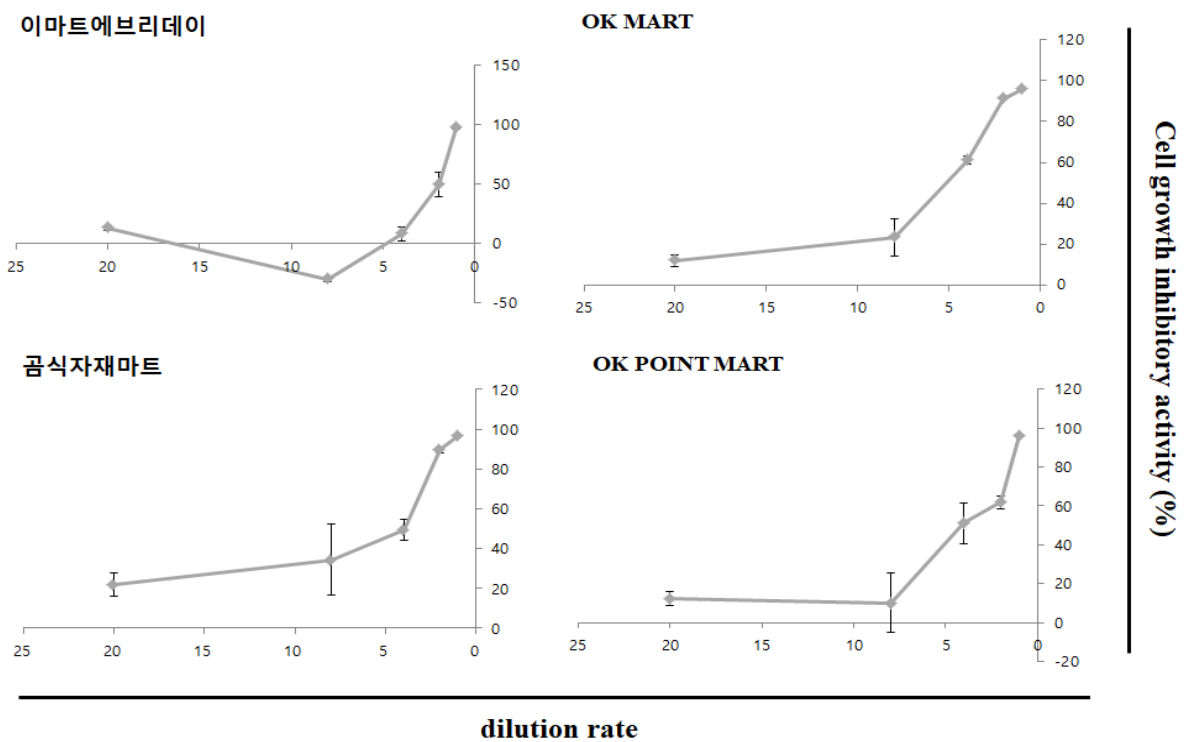


Figure 4-8. Cytoplasmic apoptosis according to place of purchasing broccoli.

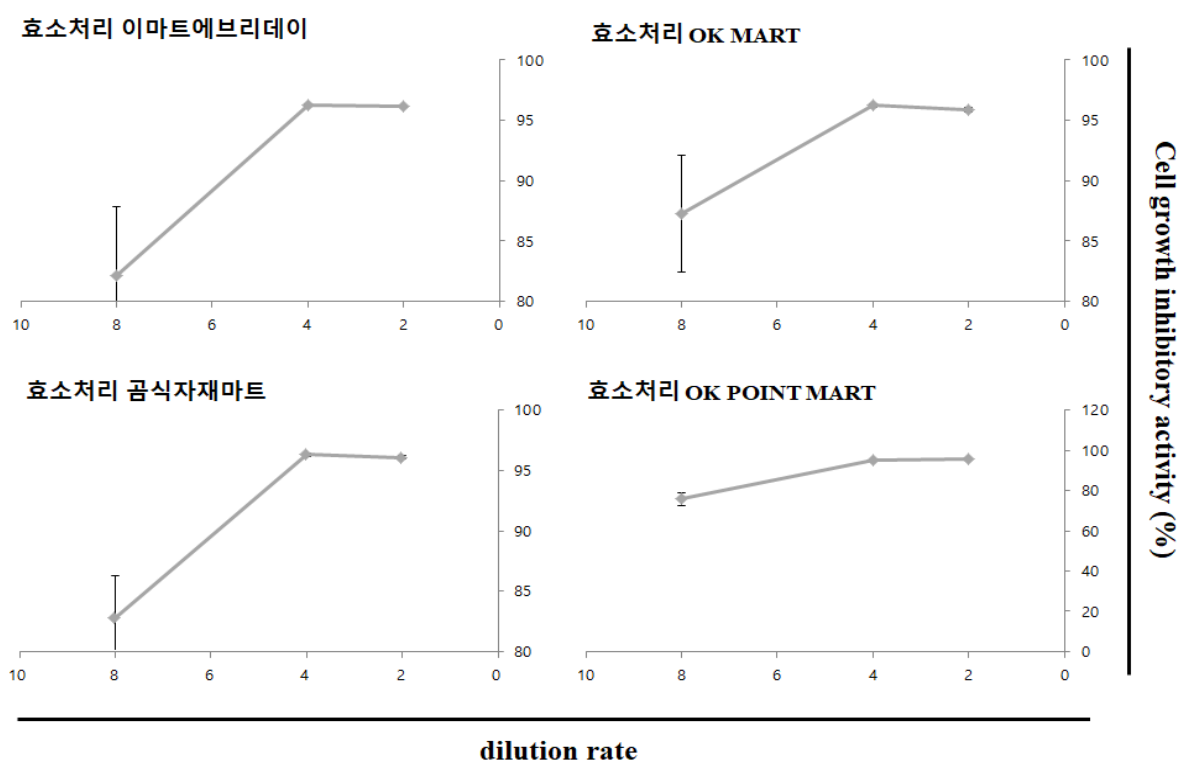


Figure 4-9. Cytoplasmic apoptosis of enzyme treated broccoli solution with 20 % myrosinase.

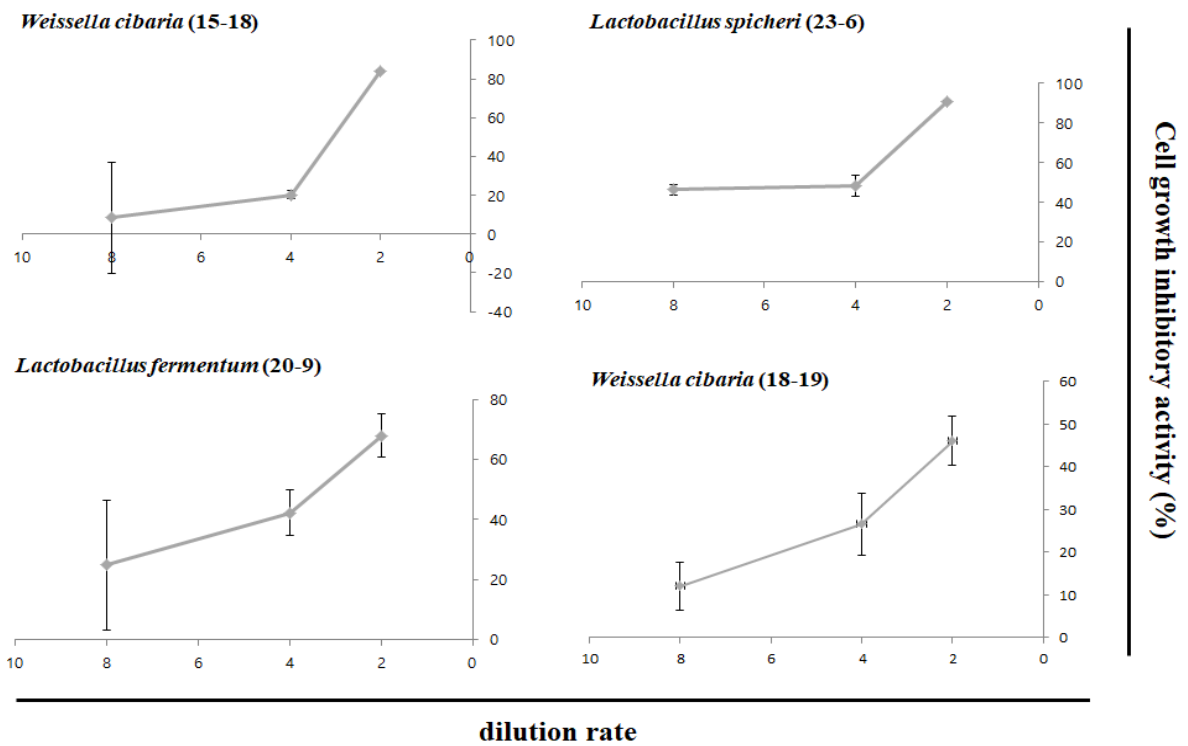


Figure 4-10a. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C.

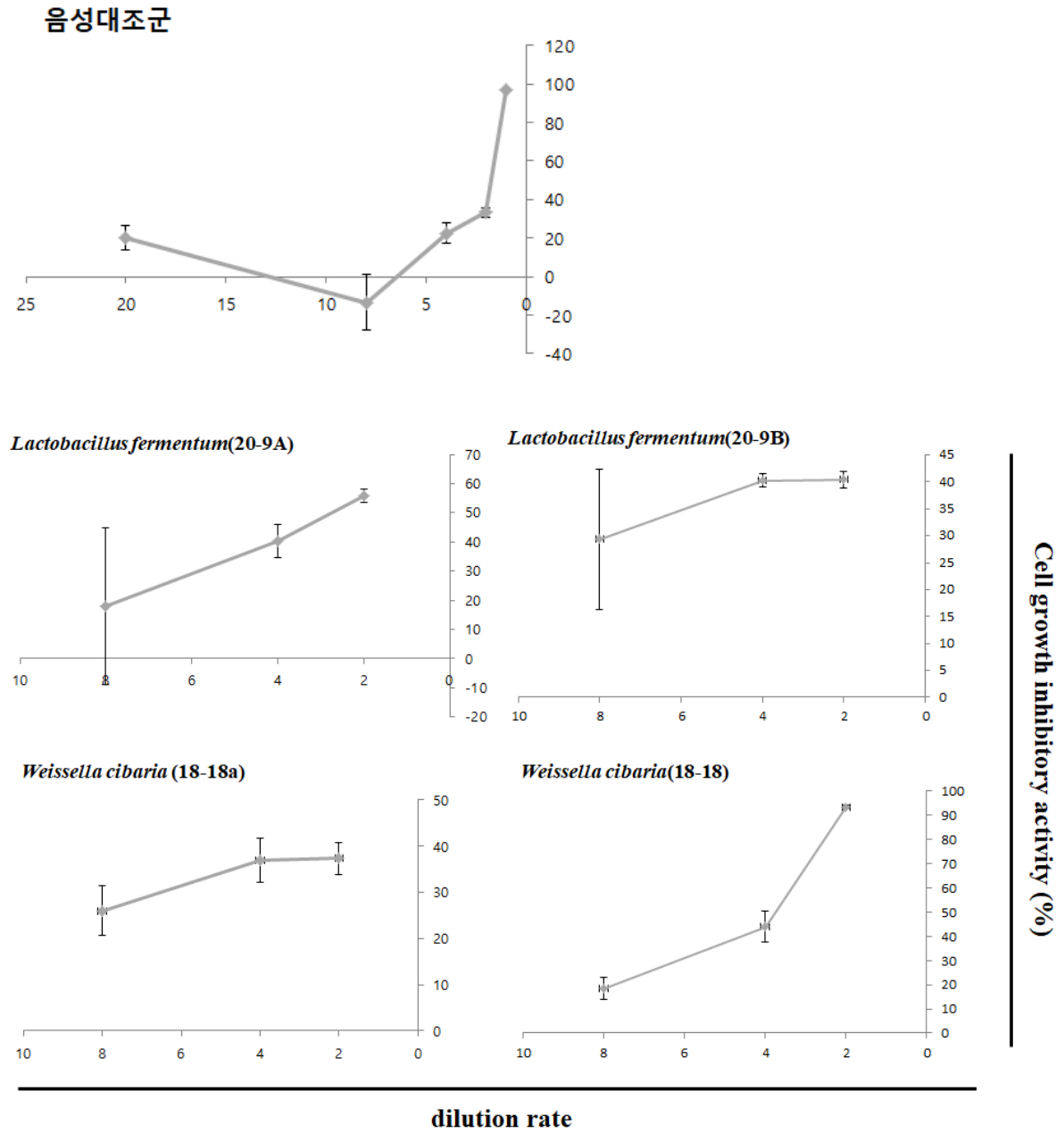


Figure 4-10b. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C.

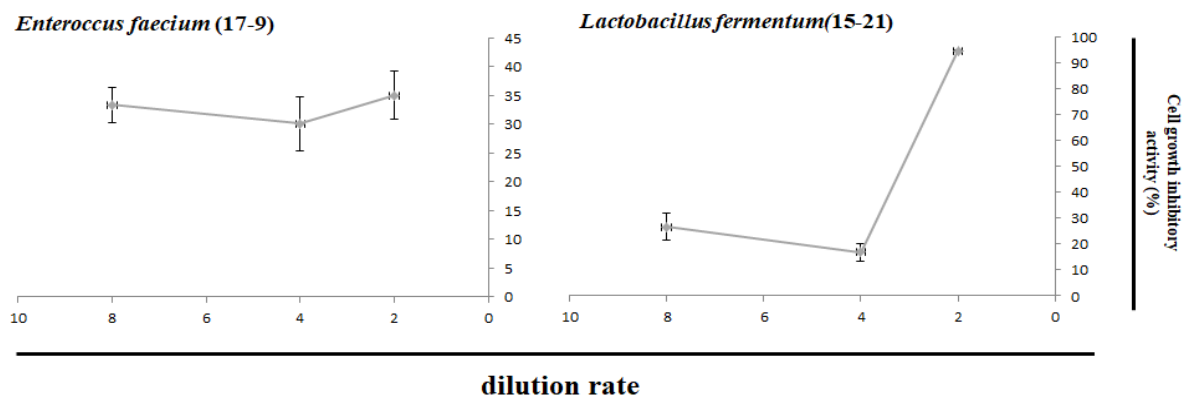


Figure 4-10c. Cytoplasmic apoptosis of broccoli solution fermented 24 hours at 37 °C.

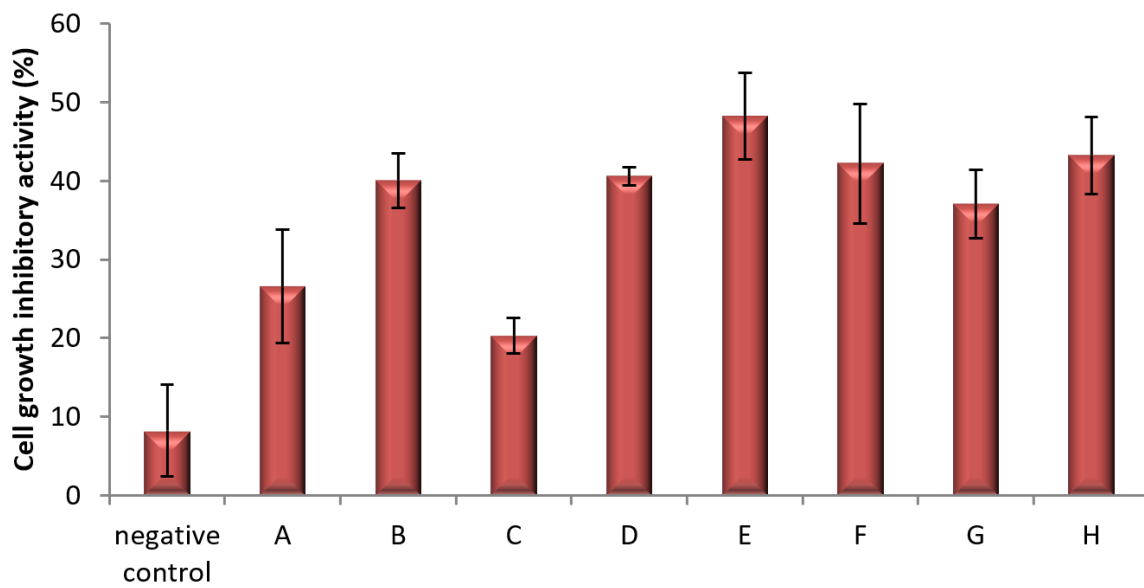


Figure 4-11a. 1st MTT assay of fermented liquid.

(negative control: unfermented broccoli, A: *Weissella cibaria*, B: *Weissella cibaria*,
Lactobacillus fermentum, C: *Weissella cibaria*, D: *Weissella cibaria*,
E: *Lactobacillus paradantarum*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus fermentum*,
F: *Lactobacillus fermentum*, G: *Lactobacillus fermentum*, *Uncultured bacterium*,
H: *Lactobacillus paracasei*)

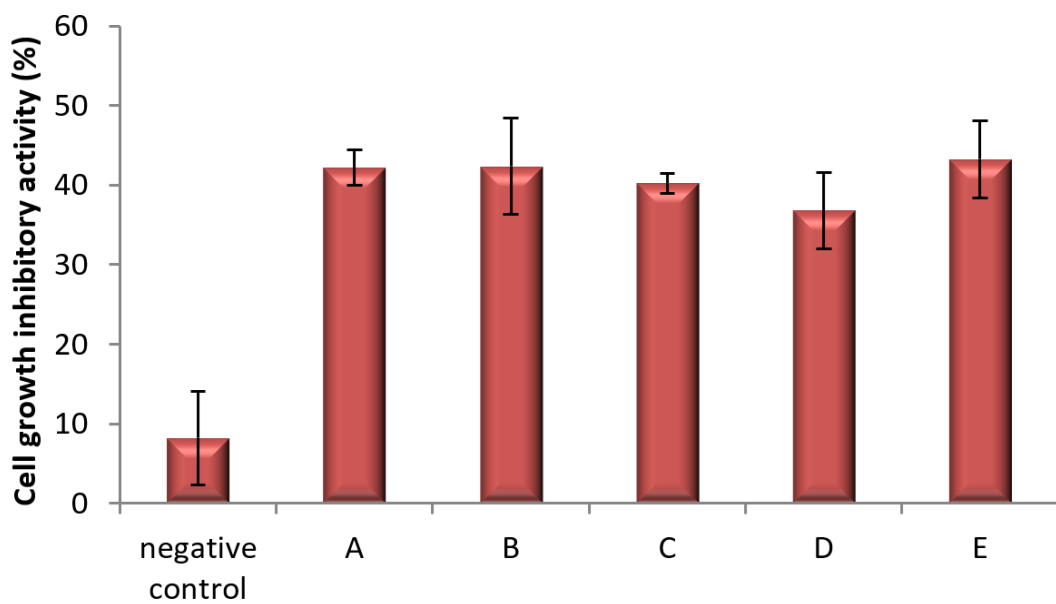


Figure 4-11b. 2nd MTT assay of fermented liquid.

(negative control: unfermented broccoli, A: *Weissella cibaria*,
 B: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hicae*, C: *Lactibacillus fermentum*,
 D: *Weissella cibaria*, E: *Lactobacillus fermentum*)

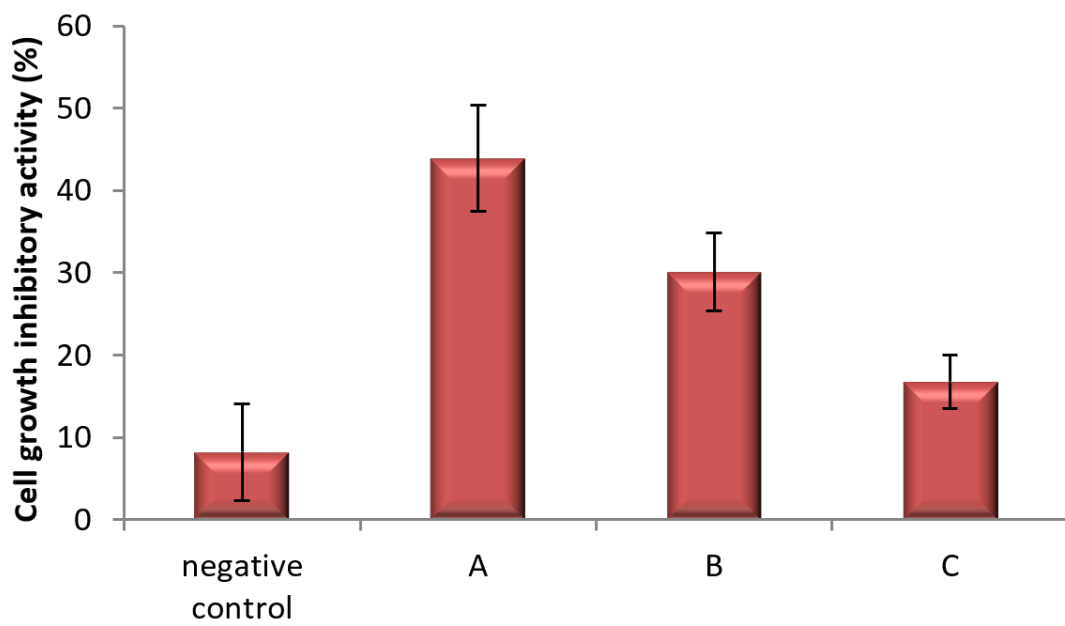


Figure 4-11c. 3rd MTT assay of fermented liquid.
 (negative control: unfermented broccoli, A: *Weissella cibaria*,
 B: *Enterococcus faecium*, C: *Lactibacillus fermentum*)

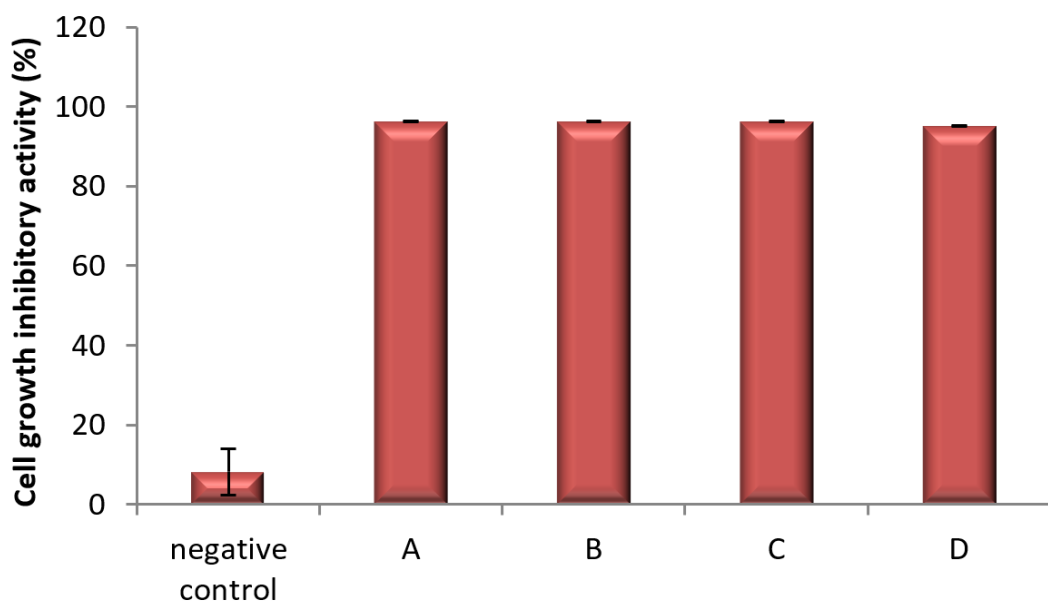


Figure 4-12. MTT assay of enzyme treated broccoli.

(negative control: non-enzyme broccoli, A: E-mart everyday,

B: OK mart, C: GOM food mart, D: OK point mart)

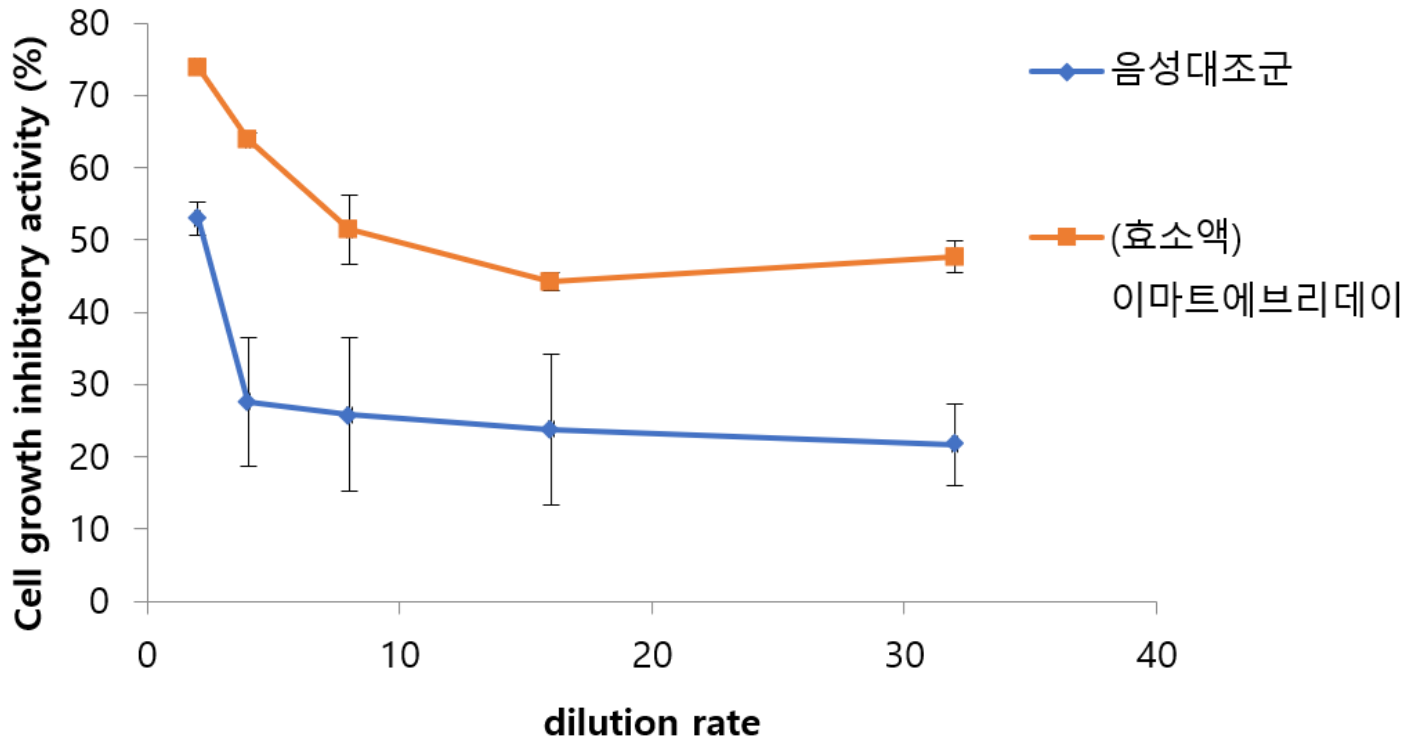


Figure 4-13a. MTT assay of enzyme treated broccoli.

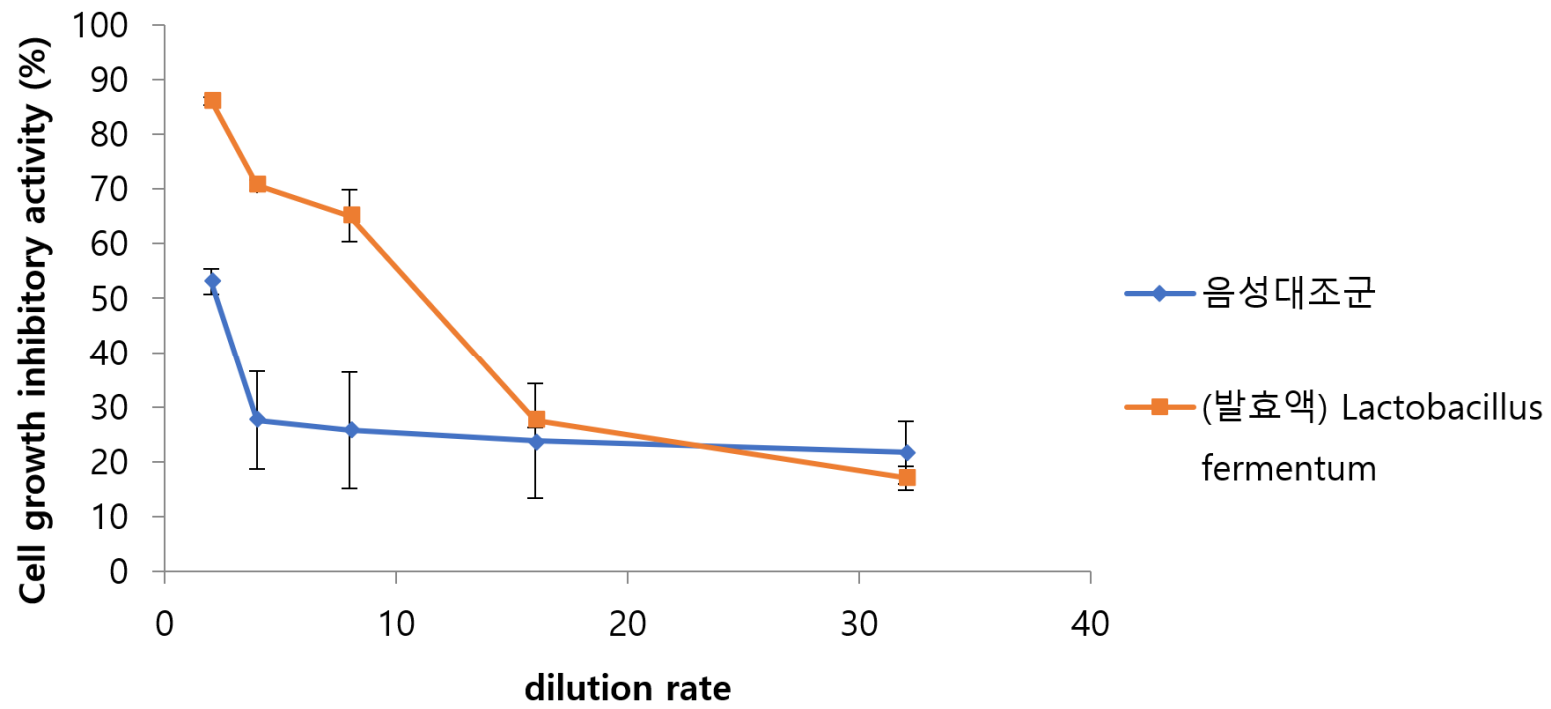


Figure 4-13b. MTT assay of fermented liquid.

3) 구강 건강도

Ocker 등 (2007)과 Myzak 등 (2004)은 실험동물을 이용하여 구강 미생물군총의 정량적 변화를 관찰하였다. 구강 건강에 악영향을 준다고 밝혀진 대표적인 미생물 중에 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* 등이 감소 되었다고 밝혀진 바 있다 (Childers 등, 2011; Han 등, 2000).

초기에 균 dilution이 잘못되고 배지와 발효액이 제대로 mix되지 않았다. 균마다 발효액에 대한 저항성이 다르고, 균의 종류에 따라 발효액이 균의 성장을 오히려 도울 수 있다는 것을 알 수 있다 (Table 4-2).

12 시간과 36 시간의 발효시간이 충분하지 못하여 오히려 구강균이 더욱 많은 활성을 보일 수 있는 환경을 만들어준다. 발효액의 농도가 낮은 것으로 판단되어 발효액의 농도를 증가시켜 추가 실험을 진행하여야 한다고 판단했다 (Table 4-3a, 4-3b).

이전에 실험하였던 결과를 통해 1/20, 1/50, 1/100의 발효액을 첨가하는 것은 너무 농도가 연하다고 판단하여 1/2, 1/4로 농도를 증가하였다. 균 dilution이 긍정적인 결과가 나왔으나, 10⁶ 결과를 보아 균을 더 희석해야 한다고 판단되어 추가 실험을 진행하였다 (Table 4-4).

충치균은 *Strptococcus mutans*로 브로콜리 발효액의 충치균 억제능 측정 결과 음성대조균은 무처리 브로콜리액으로 1.3×10⁸의 균수를 보였으며, 브로콜리 발효액 배지에 균을 분주했을 때 100 % 감소하였다. 브로콜리 발효액 배지에 앞에서 언급했던 균주 2종 와이셀라 사이베리아 (*Weissella cibaria*)와 락토바실러스 파라카제이 (*Lactobacillus paracasei*)를 분주하였을 때 충치균이 100% 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 구강건강도는 100%로 충치균을 억제하고, 브로콜리 발효액을 첨가한 결과 음성대조균인 발효하지 않은 브로콜리액보다 충치균 억제능이 훨씬 높음을 확인하였다 (Fig. 4-14a, 4-14b).

십자화과 식물 고유의 기능성 물질을 증대시키고 활용한다는 점이 기술적 측면에 있어 독창성이 실용성이 있다고 볼 수 있고, 브로콜리 효소액과 발효액은 다양한 분야에 적용할 수 있을 것으로 사료 된다. 또한 고부가가치 소재 개발 및 효소, 기능성 물질 개발을 통해 제주 지역 농산물을 다양한 방법으로 가공하여 활용할 수 있어 제주 농업 발전에 기여할 수 있을 뿐만 아니라 지역 농산물의 가치재고화와 차별화를 통한 지역 경제 활성화에 기여할 것으로 기대한다.

Table 4-2. Fermentation at 37 °C for 24 hours.

Medium composition	Bacillus			
	control	fermented liquid(1/100)	fermented liquid(1/50)	fermented liquid(1/10)
<i>Streptococcus mutans</i>	3.81*10 ⁹	3.784*10 ¹⁰	4.02*10 ⁹	7.73*10 ⁹
<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. animalis</i>	5.2*10 ⁸	11.4*10 ⁸	5.0*10 ⁸	4*10 ⁷
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5.3*10 ⁸	1.13*10 ⁹	3*10 ⁷	2.040*10 ¹⁰

Table 4-3a. Fermentation at 37°C for 24 hours (Test 1).
 (negative control 1: unfermented broccoli solution + glucose ×,
 negative control 2: unfermented broccoli solution + glucose o)

<i>Streptococcus mutans</i>	fermented liquid (1/20)	fermented liquid (1/50)	fermented liquid (1/100)
12h fermentation + glucose ×	1.3*10 ⁸	1.8*10 ⁸	1.4*10 ⁸
36h fermentation + glucose ×	1.4*10 ⁸	9*10 ⁷	3.2*10 ⁸
negative control 1	7*10 ⁷	9*10 ⁷	1.6*10 ⁸
negative control 2	1.8*10 ⁸	1.9*10 ⁸	1.0*10 ⁸

Table 4-3b. Fermentation at 37 °C for 24 hours (Test 2).
 (negative control1: unfermented broccoli solution + glucose ×,
 negative control2: unfermented broccoli solution + glucose o)

<i>Streptococcus mutans</i>	fermented liquid (1/20)	fermented liquid (1/50)	fermented liquid (1/100)
12 h fermentation + glucose ×	6×10^7	2.2×10^8	3.1×10^8
36 h fermentation + glucose ×	2.2×10^8	3.2×10^8	2.9×10^8
negative control 1	7×10^7	4×10^7	1.0×10^7
negative control 2	7×10^7	1.8×10^8	1.4×10^8

Table 4-4. Mixing 36 hours fermented liquid with 72 hours fermented liquid at 37 °C.
 (negative control 1: unfermented broccoli solution, negative control 2: solid medium)

<i>Streptococcus mutans</i>	
18-18 1/2	4.91*10 ⁹
18-18 1/4	3.55*10 ⁹
15-21 1/2	7.89*10 ⁹
15-21 1/4	4.51*10 ⁹
Control 1 (unfermented 1/2)	3.31*10 ⁹
Control 2 (TSA)	2.34*10 ⁹

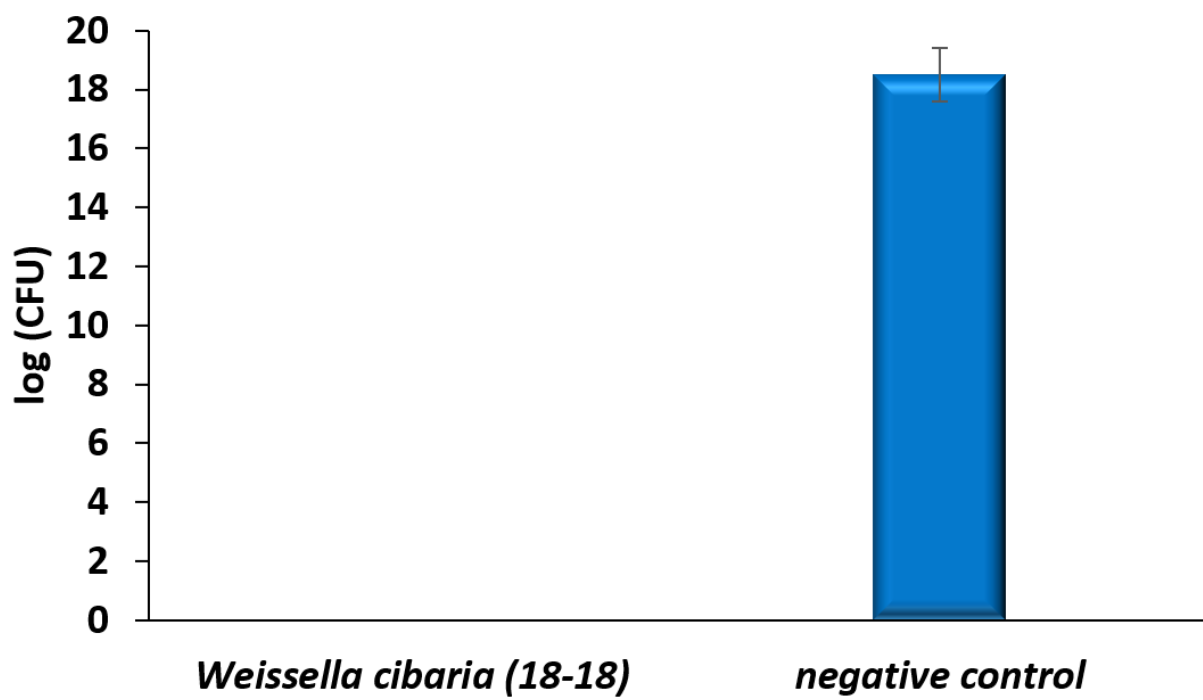


Figure 4-14a. Inhibition activity of *Weissella cibaria* JSKIU 18-18 fermented liquid for *Streptococcus mutans*

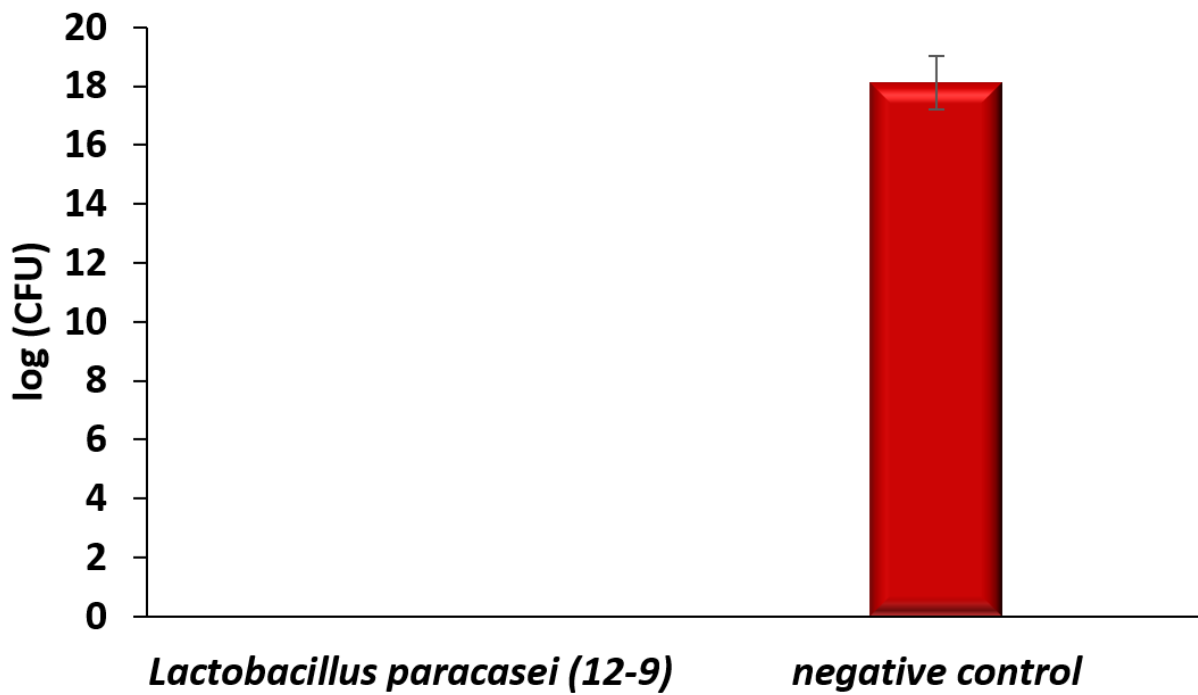


Figure 4-14b. Inhibition activity of *Lactobacillus paracasei* JSKIU 12-9 fermented liquid for *Streptococcus mutans*

4. 요약

본 연구는 제주도 전통 발효 식품들을 분쇄하여 유산균 및 그람 양성균이 선택적으로 배양되는 MRS 고체배지에 도말하여 분리한 단일 콜로니 1,000개를 단독 배양한 후 각각 순수 발효하여 항산화능 시험법인 DPPH 분석과 암세포사멸 시험법인 MTT 분석을 실시하였다. 토종 발효 미생물 선별 기준을 흡광도 0.15 이하로 라디칼 소거 활성능(항산화능)을 보인 미생물을 선별하였고, 그 중 상위 25종 미생물들로 브로콜리 분쇄액의 발효를 진행하였다. 고효율로 추출된 sulforaphane의 기능성을 입증하기 위하여 노화의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 항산화 활성도를 측정하고자 DPPH assay를 실행하였다. 또한 살아있는 세포를 측정하여 세포의 증식 또는 사멸도 변화를 평가하는 실험인 MTT assay를 실행하였으며, 구취를 유발하는 구강 미생물의 성장을 저해하기 위한 실험인 구강건강도 실험을 진행하여 항암, 항산화, 항충치 효과를 모두 검증하였다.

- 1) 항산화능을 측정한 결과 음성 대조군에 비해 항산화능이 약 3배 높게 나온 것으로 보아 발효한 브로콜리액에서 다수, 다량의 항산화 활성 물질이 존재함을 알 수 있다. 브로콜리 효소액과 발효액의 항산화능 측정한 결과 음성 대조군은 무처리 브로콜리액으로 50배 희석했을 때 4.4 %의 항산화능을 나타냈다. 음성 대조군에 비해 효소액은 17.6 %로 4배, 발효액은 20.5 %로 약 4.7배 높은 항산화능을 나타냈다.
- 2) 대식세포 RAW 264.7 세포를 이용하여 실험을 하였고, 해당 대식세포의 경우 면역력을 나타내는 세포로 대식세포를 통하여 세포에 독성이 있는 균주를 선별하고자 실험을 진행하였다. 발효하지 않은 브로콜리를 4배 희석하여 MTT assay를 진행하였을 때 대식세포가 8.2 % 감소하는 것을 확인하였다. *Weissella cibaria*를 제외한 다른 유산균들은 3배 이상의 증가율을 보였으며, 효소처리액의 경우 4배 희석한 이후에도 95% 이상의 대식세포에 대하여 강력한 독성을 보여주었다. 또한 효소처리한 모든 브로콜리가 10배 가량의 대식세포 성장억제를 보였다. 브로콜리 효소액과 발효액의 간독성 검사 결과 음성대조군은 무처리 브로콜리액으로 4배 희석했을 때 27.6% 세포 성장 저해도를 나타냈다. 음성대조군에 비해 효소액은 63.9 %로 약 2.3배, 발효액은 70.7 %로 약 2.6배 높은 세포 성장 저해도를 나타냈다.

3) 구강건강도를 확인하기 위하여 1/20, 1/50, 1/100의 발효액을 첨가하는 것은 너무 농도가 연하다고 판단하여 1/2, 1/4로 농도를 증가하였다. 균 dilution이 긍정적인 결과가 나왔으나, 10^6 결과를 보아 균을 더 희석해야 한다고 판단되어 추가 실험을 진행하였다. 충치균은 *Streptococcus mutans*로 브로콜리 발효액의 충치균 억제능 측정 결과 음성대조군은 무처리 브로콜리액으로 1.3×10^8 의 균수를 보였으며, 브로콜리 발효액 배지에 균을 분주했을 때 100 % 감소하였다. 발효액을 첨가한 결과 음성대조군인 발효하지 않은 브로콜리액보다 충치균 억제능이 훨씬 높음을 확인하였다.

5. 참고문헌

Ares, A. M., Nozal, M. J., Bernal, J. 2013. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A*. 1313: 78-95.

Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E., Zieliński, H. 2007. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology*. 226: 459-465.

Chi, X., Zhang, R., Shen, N., Jin, Y., Alina, A., Yang, S., Lin, S. 2015. Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced ischemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway. *Hepatology International*. 9: 321-329.

Childers, N. K., Osgood, R. C., Hsu, K.-L., Manmontri, C., Momeni, S. S., Mahtani, H. K., Cutter, G. R., Ruby, J. D. 2011. Real-time quantitative polymerase chain reaction for enumeration of *Streptococcus mutans* from oral samples. *European Journal of Oral Sciences*. 119: 447-454.

Clarke, J. D., Hsu, A., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F., Ho, E. 2011. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacological Research*. 64: 456-463.

Clarke, J. D., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F., Ho, E. 2011. Comparison of isothiocyanate metabolite levels and histone deacetylase activity in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 10955-10963.

Domínguez-Perles, R., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., García-Viguera, C., Moreno, D. A. 2010. Broccoli-derived byproducts—a promising source of bioactive ingredients. *Journal of Food Science*. 75: C383-C392.

Dong, Z., Shang, H., Chen, Y. Q., Pan, L.-L., Bhatia, M., Sun, J. 2016. Sulforaphane Protects Pancreatic Acinar Cell Injury by Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3 Inflammatory Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016: 1-12.

Egner, P. A., Chen, J.-G., Zarth, A. T., Ng, D. K., Wang, J.-B., Kensler, K. H., Jacobson, L. P., Munoz, A., Johnson, J. L., Groopman, J. D., Fahey, J. W., Talalay, P., Zhu, j., Chen, T.-Y., Qian G.-S., Camella, S. G., Hecht, S. S., Kensler, T. W. 2014. Rapid and Sustainable Detoxication of Airborne Pollutants by Broccoli Sprout Beverage: Results of a Randomized Clinical Trial in China. *Cancer Prevention Research*. 7: 813-823.

Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A., Rimbault, A. 2001. Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiology Letters*. 197: 99-103.

Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P., Lozniewski, A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7610-7615.

Fahey, J. W., Wehage, S. L., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W., Egner, P. A., Shapiro, T. A., Talalay, P. 2012. Protection of Humans by Plant Glucosinolates: Efficiency of Conversion of Glucosinolates to Isothiocyanates by the Gastrointestinal Microflora. *Cancer Prevention Research*. 5: 603-611.

Farag, M. A., Motaal, A. A. A. 2010. Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *Journal of Advanced Research*. 1: 65-70.

Galan, M. V., Kishan, A. A., Silverman, A. L. 2004. Oral Broccoli Sprouts for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Preliminary Report. *Digestive Diseases and Sciences*. 49: 1088-1090.

Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M. A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., Tercé, F. 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in ht29 human colon cancer cells. *Cancer Research*. 60: 1426-1433.

Gupta, P., Kim, B., Kim, S.-H., Srivastava, S. K. 2014. Molecular targets of isothiocyanates in cancer: Recent advances. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58: 1685-1707.

Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T.-J., Kinder Haake, S., Park, N.-H., Kuramitsu, H., Genco, R. J. 2000. Interactions between Periodontal Bacteria and Human Oral Epithelial Cells: *Fusobacterium nucleatum* Adheres to and Invades Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 68: 3140-3146.

Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A., Lozniewski, A. 2003. Efficacy of Sulforaphane in Eradicating *Helicobacter pylori* in Human Gastric Xenografts Implanted in Nude Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3982-3984.

Hayes, J. D., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*. 47: 73-88.

Hecht, S. S. 1995. Chemoprevention by isothiocyanates. *Journal of Cellular Biochemistry*. 59: 195-209.

Higdon, J., Delage, B., Williams, D., Dashwood, R. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*. 55: 224-236.

Houghton, C. A., Fassett, R. G., Coombes, J. S. 2013. Sulforaphane: Translational research from laboratory bench to clinic. *Nutrition Reviews*. 71: 709-726.

Hwang, J.-H., Lim, S.-B. 2015. Antioxidant and Anticancer Activities of Broccoli By-Products from Different Cultivars and Maturity Stages at Harvest. *Preventive Nutrition and Food Science*. 20: 8-14.

Im, J. S., Lee, E. H., Lee, J. N., Kim, K. D., Kim, H. Y., Kim, M. J. 2010. Sulforaphane and total phenolics contents and antioxidant activity of radish according to genotype and cultivation location with different altitudes. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 28: 335-342.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T. Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes and Development*. 13: 76-86.

Jeffery, E. H., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Keck, A. S., Matusheski, N., Klein, B. P., Juvik, J. A. 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16: 323-330.

Kaur, C., Kumar, K., Anil, D., Kapoor, H. C. 2007. Variations in antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 621-638.

Lampe, J. W., Peterson, S. 2002. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *Journal of Nutrition* . 132: 2991-2994.

Li, F., Hullar, M. A. J., Beresford, S. A. A., Lampe, J. W. 2011. Variation of glucoraphanin metabolism in vivo and ex vivo by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 106: 408-416.

Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Yu, Y., Clouthier, S. G., Schwartz, S. J., Wicha, M. S., Sun, D. 2010. Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*. 16: 2580-2590.

Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., Liu, Y. M. 2006. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 473-476.

Liu, D., Shi, J., Colina Ibarra, A., Kakuda, Y., Jun Xue, S. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT - Food Science and Technology*. 41: 1344-1349.

Michaud, D. S., Spiegelman, D., Clinton, S. K., Rimm, E. B., Willett, W. C., Giovannucci E. L. 1999. Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 91(7): 605-613.

Minich, D. M., Bland, J. S. 2008. A Review of the Clinical Efficacy and Safety of Cruciferous Vegetable Phytochemicals. *Nutrition Reviews*. 65: 259-267.

Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C. 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1508-1522.

Murillo, G., Mehta, R. G. 2001. Cruciferous Vegetables and Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 41: 17-28.

Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F.-L., Dashwood, R. H. 2004. A Novel Mechanism of Chemoprotection by Sulforaphane. *Cancer Research*. 64: 5767-5774.

Ocker, M., Schneider-Stock, R. 2007. Histone deacetylase inhibitors: Signaling towards p21cip1/waf1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 1367-1374.

Paul, M. H., Scarlett, G., Felix, B., Shantel, A. V., Victoria, N., Steven, A. J., Paul, C. E., Felicity, N. E. G. 2017. Sulforaphane Induces Neurovascular Protection Against a Systemic Inflammatory Challenge via Both Nrf2-Dependent and Independent Pathways. *Vascular Pharmacology*. 85: 29-38.

Qi, T., Xu, F., Yan, X., Li, S., Li, H. 2016. Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 37: 182-188.

Sestili, P., Fimognari, C. 2015. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *BioMed Research International*. 2015: 1-9.

Shams, R., Abu-Khudir, R., Ali, E. M. 2017. Sulforaphane, polyphenols and related anti-inflammatory and antioxidant activities changes of Egyptian broccoli during growth. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11: 2061-2068.

Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R., Singh, S. V. 2003. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis*. 25: 83-90.

Singh, S. V., Singh, K. 2012. Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*. 33: 1833-1842.

Tang, L., Zhang, Y. 2004. Isothiocyanates in the Chemoprevention of Bladder Cancer. *Current Drug Metabolism*. 5: 193-201.

Tani, N., Ohtsuru, M., Hata, T. 1974. Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 38: 1623-1630.

van Die, M. D., Bone, K. M., Emery, J., Williams, S. G., Pirotta, M. V., Paller, C. J. 2016. Phytotherapeutic interventions in the management of biochemically recurrent prostate cancer: a systematic review of randomised trials. *BJU International*. 117: 17-34.

Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R. D., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M. 2009. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53: S219.

Wagner, A. E., Boesch-Saadatmandi, C., Dose, J., Schultheiss, G., Rimbach, G. 2012. Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate--role of Nrf2, NF-(kappa) B and microRNA-155. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16: 836-843.

Wise, R. A., Holbrook, J. T., Criner, G., Sethi, S., Rayapudi, S., Sudini, K. R., Sugar, E. A., Burke, A., Thimmulappa, R., Singh, A., Talalay, P., Fahey, J. W., Berenson, S., Jacobs M. R., Biswal, S. 2016. Lack of Effect of Oral Sulforaphane Administration on Nrf2 Expression in COPD: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. *PLOS ONE*. 11: e0163716.

Yanaka, A., Fahey, J. W., Fukumoto, A., Nakayama, M., Inoue, S., Zhang, S., Tauchi, M., Suzuki, H., Hyodo, I., Yamamoto, M. 2009. Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in *Helicobacter pylori*-Infected Mice and Humans. *Cancer Prevention Research*. 2: 353-360.

Yang, B., Xiaolu, W., Song, Z., Chunye, M., Jiuwei, C., Yang, Z. 2015. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 1-13.

Zhao, H., Lin, J., Grossman, H. B., Hernandez, L. M., Dinney, C. P., Wu, X. 2007. Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *International Journal of Cancer*. 120: 2208-2213.

감사의 글

이제 비로소 모든 과정을 마치고 논문의 마무리를 글로 남기려 하니 옛일이 스쳐 지나가면서 도움을 받기만 한 삶을 반성하게 됩니다. 저를 도와주신 분이 많았음에도 불구하고 일일이 찾아뵙고 감사드리지 못한 점 용서를 구합니다.

대학원의 박사과정을 수료하고 논문을 작성하려는 제자에게 수고를 마다하지 않으시고 논문의 결실을 맺게 하여 주시고, 애정 어린 충고와 많은 가르침으로 연구자의 길로 인도하여 주신 류연철 지도교수님께 깊은 존경과 감사의 마음을 드립니다. 바쁘신 일정 가운데에도 항상 애정 어린 충고와 지도를 아끼지 않고 심사하여 주신 이왕식 교수님, 부족하지만 논문의 심사를 맡아 세심하게 열정을 다해 지도해 주시고 조언해 주신 민태선 교수님, 도경탁 교수님, 손영옥 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 성심성의껏 주셨던 교수님들의 피드백과 격려 덕분에 이 논문이 완성될 수 있었습니다. 정말 감사합니다.

논문을 작성하려는 저에게 각별한 관심과 애정을 갖고 응원해 주시고, 소중한 결실을 맺기까지 아낌없이 지원해 주신 주식회사 진산비버리지 장동훈 대표이사님과 본 논문이 완성되기까지 많은 응원과 격려를 해주신 이호철 전무님께 깊은 감사를 드립니다. 논문이 잘 마무리될 수 있도록 많은 격려와 도움을 주신 진산비버리지 홍성연 본부장님을 비롯하여 이용필 팀장님, 김지은 과장님, 수팓, 정승우와 장민우 주임에게 깊은 감사의 말을 전합니다. 그리고 본 연구를 수행하기 위해 저와 함께했던 경일대학교 민원기 교수님과 최인호, 박소현, 김민희, 최하은, 김석현 연구원 모두에게 감사의 인사를 드립니다.

늘 곁에서 따뜻한 격려와 도움을 주시고, 항상 사위의 건강을 염려하여 주신 장모님께도 무한 감사를 드립니다. 사위의 새로운 도전을 진정으로 축하해주시고, 끝까지 공부에 전념할 수 있도록 지원해 주심 정말 감사하고 잊지 않겠습니다. 부족한 저에게 항상 관심을 갖고 충고와 격려를 해준 김남훈 형님과 형수님 그리고 처남에게도 깊은 감사의 말을 전합니다. 항상 내 편이 되어 주고 응원해 준 사랑하는 나의 동생들 김정호, 김예지, 김정건에게도 고마움을 전합니다.

부족한 남편이 공부하는 동안 묵묵히 응원해 주고, 불평 한마디 없이 나를 사랑으로 감싸주는 사랑하는 아내 김보람에게 정말 감사한 마음을 전합니다. 당신 같은 사람을 나의 배우자로 보내주신 주님께 정말 감사하며 당신이 나에게 늘 그랬던 것처럼, 나 역시 앞으로 당신의 곁에서 언제나 사랑하며 지지하겠습니다. 더불어 힘이 들고 어려울 때 아빠에게 찾아와 준 우리 이쁜 딸 김나은에게도 감사한 마음을 보냅니다. 아빠가 공부하는 동안 건강하게 잘 자라주고, 아빠에게 기쁨을 줘서 정말 고맙습니다. 아빠도 앞으로 나은이를 열렬히 응원하고 지원해 주겠습니다. 사랑하는 가족이 있어 저는 정말 행복하고 감사합니다.

다음은 부모님께 전하는 자식의 마음으로 채우고 싶습니다. 저의 짧은 말로는 부모님에 대한 감사의 마음을 다 표현할 수가 없습니다. 부족한 아들은 아직도 여전히 어리고 모자라지만, 이제 조금 커서 학문이라는 대지 위에 한 발 올려놓으려고 합니다. 지금 이 자리까지 올 수 있도록 저를 위해 항상 기도해주시고 격려해 주셔서 감사합니다. 이 배움을 통해 앞으로 더 성장하고 발전하여 도움이 필요한 곳에서 쓰임 받는 사람이 되겠습니다. 저에게 항상 사랑과 믿음을 베풀어 주신 부모님께 사랑한다는 말을 전합니다.

감사의 글 마지막은 전 지도교수님인 정동기 교수님께 전하고 싶습니다. 감사하는 마음을 표하는 맨 끝에 교수님을 언급하는 것은 제 마음이 여전히 교수님께 있기 때문이고, 교수님께 이 논문을 바치기 위해서입니다. 생전에 언제나 훌륭한 가르침을 주시고 부족한 제가 힘이 들고 어려울 때마다 용기를 주시고 포기하고 싶을 때 학위를 계속할 수 있도록 격려해 주신 정동기 교수님의 은혜에 무한한 감사를 드리며 교수님의 영전에 이 논문을 바칩니다.

2020년 7월

김 정 현