

발간등록번호

11-1543000-000566-01

**식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재  
생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발**

Development high value added functional food using  
broccoli sprouts cultivated in the plant factory system

연구기관

(주)미스바알텍

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발 에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 08 월 19 일

주관연구기관명 : (주)미스바알텍

주관연구책임자 : 이 성 표

세부연구책임자 : 이 성 표

연 구 원 : 김 태 수

연 구 원 : 양 웅 석

연 구 원 : 심 민 정

협동연구기관명 : 호서대학교

협동연구책임자 : 김 미 혜

연 구 원 : 김 은 지

연 구 원 : 최 수 진

# 요 약 문

## I. 제 목

식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발의 목적 : 식물공장 생산 시스템을 활용하여 기능성을 가지고 있는 브로콜리새싹 추출물 생산 및 유효물질인 설폴라판 등을 분리·동정하고, 고부가가치 기능성식품 소재로 개발하고자 함.

- (1) 브로콜리 새싹 추출물로부터 유효성분인 Sulforaphane의 분리 및 정제
- (2) 설폴라판을 고함유한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 및 *H.pylori*에 대한 위염 억제 능
- (3) 대량생산 체계 확립 및 기능성 식품 개발(소재의 안전성 평가)

○ 연구개발의 필요성

- : 경제적인 측면 - 국내 건강기능식품 시장 1999년 이후 유통다변화, 신규참여로 꾸준히 증가
- 2008년도 시장규모(건강기능성식품 제조, 수입, 판매업 포함) : 5조 8천 6백억
  - 건강기능식품 시장의 외부환경 위협요인으로 수입 원료 및 제품증가
  - 다국적 기업의 시장점유율 증가
  - 현재 우리나라는 외국에서 대부분의 기능성 식품 소재를 수입하여 식이 보조제를 단순조합 후 판매하는 수준(추후 해외 의존 심화 우려)
  - 국내 유용 기능성 식품소재의 활용에 대한 국가적인 지원확대와 국제 경쟁력이 있는 신규 기능성식품의 상용화가 시급한 실정임
- : 사회적인 측면 - 셀프케어(Self-Care)의식 등의 소비자의 건강관심 고조, 경제상승과 인구 고령화 등의 요인으로 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가, 시장성장 예상됨
- 최종소비자들의 건강기능식품에 대한 지식수준이 높아지고, 동일 기능성 원료라도 유기농, 천연소재 여부를 중시하는 경향
- : 기술적인 측면 - 국내 식물공장 관련 연구는 2000년 초부터 꾸준히 진행되고 있으나, 기초 연구 개발 단계에서 정체
- 농촌진흥청이 식물공장 연구의 대표적인 기관으로서 해당기관 및 연구개발 추진의 특성상 상용화 및 산업화를 위한 연구사업 추진이 힘든 구조

- 일부 지자체나 기업에서 다양한 형태의 식물공장의 설치에 관한 기획이 시도 되고 있지만, 국내적으로 식물공장에 대한 보편적인 핵심 요소기술 및 통합 기술이 확립 및 정리되지 못한 상황
- 농산물 및 일반식품 소재의 고부가가치화를 위한 바이오식품 전문 인력의 부족

- ※ 신규 기능성 식품소재 개발 및 상용화를 위해 기능성 소재 탐색 및 분리, 이화학적 분석 연구, 공정 및 안전성 및 효능평가 연구 등 산학연의 통합적인 협력연구가 절실하게 요구됨
- ※ 식물공장을 활용한 고기능성 바이오식품 개발이 요망됨
- ※ 지역기반기업의 전문기술 확보 및 인재필요
- ※ 산학협력을 통한 전문 인력 양성 및 국가적 연구자원이 시급함

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 식물공장 생산 시스템을 활용한 브로콜리 새싹 추출물 생산 체계 구축(브로콜리 새싹 추출물 rich 파우더 생산, 시제품 생산, 제품화)
- 추출방법 최적화 및 HPLC 정량분석법 확립(유효성분 추출방법 최적화, 생리활성 효능 평가)
- *H.pylori* 에 대한 위염(위궤양) 억제 연구(*H.pylori* 균에 대한 항균효과 및 항 우레아제 활성)
- 브로콜리 새싹의 유효성분인 설포라판 이외의 물질 개발을 통하여 기능성 식품 제품화를 연구

### IV. 연구개발결과

제 1 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹으로부터 기능성 성분의 분리·동정 및 표준화

#### 1. LED 광원에 따른 브로콜리 새싹의 이화학적 특성

○ LED광원에 따른 브로콜리 새싹의 일반성분을 분석한 결과, 광원에 따라 유의적인 차이를 나타냈으며, 구성당은 glucose가 0.22~3.12%로 가장 많았고, fructose는 0.10~2.04% 검출되어, 총 2종이 검출되었다.

○ 유기산은 총 3종의 유기산이 검출되었고, LED 광원에 따라 각각 달랐으며, citric acid, malic acid는 모든 시료에서 검출되었다. citric acid는 241.48~3292.59 mg%로 건조방법별 차이는 나타났으나 blue광원에서 가장 높게 측정되었고, malic acid는 183.76~2477.48 mg%로 red광원에서 가장 높은 함량을 보였으며, 건조방법별로 차이를 나타냈다. oxalic acid 는 42.14~331.31 mg%로 Blue광원에서 가장 높게 측정되었으며 열풍건조에서는 검출이 되지 않았다. 이는 건조과정에서 산화작용을 통한 저분자화로 그 함량이 감소하거나 휘발된 것으로 사료 된다.

○ LED 광원에 따른 브로콜리 새싹의 무기질은 총 7종의 성분이 검출되었고, 동결건조한 브로콜리 새싹의 무기질 조성이 가장 높게 측정 되었으며, Fe, Mn, Cu, Zn의 함량은 10mg/100g 이하로 매우 낮게 측정되었다. K 함량은 73.55-669.04mg/100g, Mg 49.71-585.35mg/100g, Na 27.02-394.13mg/100g 으로, LED 광원을 쬐인 브로콜리 새싹과 브로콜리 잎의 무기질 성분 및 함량에 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

○ 비타민 A와 C 및 E 함량을 측정한 결과, 비타민 A의 함량은 FLR 212.62 $\mu$ gRE/100g, HDR 860.62 $\mu$ gRE/100g, FDR 4633.1 $\mu$ gRE/100g 로 광원별 함량에서 Red광원을 쬐인 브로콜리 새싹에서 가장 높은 함량을 보였으며, 비타민 C의 경우 생잎(FL)브로콜리에서는 측정이 되지 않았고 HDR 134.57mg/100g, HDB 137.05mg/100g, HDW 119.87mg/100g, FDR 136.96mg/100g, FDB 84.19mg/100g, FDW 8.53mg/100g으로 열풍건조 브로콜리가 높게 측정되었다. 비타민 E 경우는 0.93-16.83 IU의 함량을 나타내었으며, 동결건조 브로콜리에서 가장 높게 나타났다.

## 2. LED 광원에 따른 생리활성

○ 식물공장에서 재배한 브로콜리 새싹의 광원에 따른 생리활성 효과를 비교한 결과, 총 페놀 함량은 생 브로콜리 1.51 mg/mL, 저온 열풍 건조 브로콜리 1.6 mg/mL, 동결건조 브로콜리 1.46 mg/mL로 측정되었으며, SOD 유사활성은 생 브로콜리 37.99%, 저온 열풍 건조 브로콜리 63.04%, 동결건조 브로콜리 48.22%로 나타났다. 전자공여능은 생 브로콜리 29.15%, 저온열풍건조 브로콜리 38.81%, 동결건조 브로콜리 15.02% 였으며, Hydroxyl radical 소거능은 생 브로콜리 61.37%, 저온열풍건조 브로콜리 67.76%, 동결건조 브로콜리 60.58%로 나타났다.

## 3. 브로콜리 추출물의 분획별 생리활성

○ 브로콜리 분획물들의 SOD 유사활성 및 hydroxyl radical 소거 능이 매우 높았고, 분획 물에 따라 약간의 차이를 나타내었으나, EDA(전자공여 능)이 다른 분획 물보다 ethyl acetate와 butanol에서 높게 측정되었다. 따라서, 활성이 대체적으로 높은 Butanol 분획 층을 이용하여 활성물질을 분리·정제 하였다.

## 4. Sephadex LH-20에 의한 분획물의 생리활성

○ 브로콜리 분획 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과 EtOA (3.03 mg/mL) > BuOH (2.49 mg/mL) > CHCl<sub>3</sub> (1.62 mg/mL) > H<sub>2</sub>O (1.15 mg/mL) > Hexane (1.05 mg/mL) 순으로 나타났다. SOD 유사활성은 EtOA (94.91%) > BuOH (91.69%) > CHCl<sub>3</sub> (71.27%) > H<sub>2</sub>O (50%) > Hexane (25%)의 활성을 보였으며, 전자공여능은 EtOA (92.64%) > BuOH (82.82%) > CHCl<sub>3</sub> (42.86%) > H<sub>2</sub>O (21.06%) > Hexane (17.07%) 로 나타났고, Hydroxyl radical 소거능은 BuOH (91.08%) > EtOA (89.59%) > H<sub>2</sub>O (87.54%) > Hexane (86.10%) > CHCl<sub>3</sub> (85.76%)순이었으며, Hydrogen radical 소거능은 H<sub>2</sub>O (71.40%) > BuOH (71.37%) > Hexane (70.66%) > EtOA (69.11%) > CHCl<sub>3</sub> (55.24%)의 소거능을 보였다.

## 5. 활성이 높은 브로콜리 정제 추출물의 분리조건 확립 및 활성물질 분리

TLC 분석은 항산화 활성이 높았던 EtOA, BuOH 분획 추출물을 가지고 BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2, v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 0.5 v/v/v/v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 2 : 4 : 1 : 2 : 1, (v/v/v/v/v)을 전개 용매로 TLC를 실시하였다. TLC 결과 모든 분획 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질을 확인할 수 있었다. 확인된 물질이 항산화 활성 및 헬리코박터-위궤양 개선에 효과가 있는 미지의 물질일 것으로 사료된다.

#### 6. HPLC 분석 및 Sulforaphane 함량 분석

브로콜리 새싹 추출물의 용매 분획별 설포라판 함량을 분석한 결과, CHCl<sub>3</sub> (56.76 mg/100g) > BuOH (49.16 mg/100g) > H<sub>2</sub>O (5.67 mg/100g) > n-hexane (2.18 mg/100g)의 함량을 나타내었다. 분석결과, 처리방법과 추출용매에 따라 유효성분인 설포라판의 용출 양에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

#### 7. 구조분석

Positive ion에서 GC/MS상 분자량 측정 결과, 177.03의 분자량을 갖는 것으로 나타났다(m/z ; 177.03 [M+H]<sup>+</sup>(Fig. 6). <sup>1</sup>H-NMR(in CHCl<sub>3</sub>-d<sup>6</sup>) 측정결과와 <sup>13</sup>C-NMR의 결과를 종합하여 구조를 결정하였으며, C 6개, H 11개 그리고 NOS<sub>2</sub> 1개를 갖는 분자식 C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NOS<sub>2</sub> 분자량 177.03인 Isocyanate계 Sulforaphane 으로 동정 되었다.

### 제 2 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발

#### 1. 브로콜리 새싹의 생산방법 및 대량생산체계 구축

가. 원적외선 음이온수 장치(Dileka)를 이용하여 브로콜리 새싹을 생산하는 방법

○ 전자와 원적외선이 부여된 활성수를 공급하고, LED 광원을 12시간씩 조사하였으며, 매 1시간 마다 2분씩 수분을 분사하여 재배하였다.

나. 브로콜리 최적 생육조건 확립

○ LED 청색광원을 받아 2일(암조건), 4일 동안 하루에 12시간씩 조사시켰으며, 온도범위는 21~23℃, 습도는 45~60%로 조절하여 브로콜리 새싹을 재배 하였다. 이러한 결과 LED 광원에 따른 영양소 함량 및 유효성분 함량에도 큰 차이를 보여, 브로콜리 새싹의 성분을 향상시키기 위해 가장 적절한 수확 시기는 발아 후 4일째 LED 청색광원으로 재배하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

다. 브로콜리 새싹의 추출 최적화 방법 확립

○ 수확한 브로콜리 새싹을 열풍건조기를 이용하여 40~60℃로 24시간 건조한 후 70% EtOH 용매로 40℃에서 12시간씩 3반복 추출하여 수율을 측정한 결과, 백색광 처리구 11.87%, 적색광 처리구 7.65%, 청색광 처리구 14.02%로 청색광 처리구에서 생 추출물에 비해 10배 이상의 수율을 얻을 수 있었다.

#### 2. 활성물질의 Open column 에 의한 분획

가. Open column에 의한 브로콜리 새싹의 수율, 활성 및 설포라판 함량

○ 70% 에탄올 브로콜리 열풍건조 추출물을 다공성 입자를 가진 HP-20 resin (H = 26, Ø = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)로 용출한 결과, 수율은 20% 에탄올 용출 분획물 (BHP-20)에서 높았지만, 유효성분인 sulforaphane의 함량은 40% 에탄올 용출 분획물 (BHP-40)에서 가장 높은 함량을 보였다.

○ 브로콜리 항헬리코박터 활성이 가장 우수한 BHP-20 분획물과 생리활성이 우수한 BHP-40 분획물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 open column chromatograph에 sephadex LH-20(H = 58, Ø = 1)을 4 x 50 cm까지 충전시키고, HP-20, HP-40 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 HP-20은chloroform : Methanol (100 : 0 - 0 : 100), HP-40은 70% MeOH(100)을 사용하여 용출하였다. Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1)을 순차적으로 진행하여 최종적으로 HP-20은 8개의 subfractions를 분리하였고, HP-40은 3개의 subfractions를 분리하여 활성이 가장 우수한 fraction으로부터 active compound를 분리·정제하여 구조 분석을 하였다.

○ 항헬리코박터 활성 및 생리활성이 높은 정제된 분획물로부터 얻은 Fr1~Fr8, LH1~LH3의 활성을 측정한 결과, Fr1,Fr3,Fr5, LH1,3의 subfraction에서 대체적으로 활성이 높았으며, 이물질을 이용하여 구조분석을 실시하였다.

### 3. 구조분석

가. 활성물질의 TLC 분석 패턴

○ 생리활성이 높았던 BHP-40, Fr1, Fr5, LH1,3 정제 추출물을 가지고 CHCl<sub>3</sub> : n-hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH (4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 1, v/v/v/v/v/v)을 전개용매로 TLC를 실시하였으며, Fr1,Fr5,LH1 정제 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질을 확인할 수 있었고, BHP-20, 40, 60 부분정제 추출물과, LH3에서 또 다른 형광의 물질을 확인 하였다. 확인된 물질이 생리 활성 및 항헬리코박터에 활성이 있는 미지의 물질일 것으로 사료된다.

나. HPLC분석 및 설포라판 함량

○ HPLC ( $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm; flow rate 0.8 mL/min; inject vol., 10 $\mu$ L; detector, 254 nm)를 통해 유효성분인 Sulforaphane 함량을 측정한 결과, HP-20은 Fr3 (240 mg/100g) > Fr1 (193 mg/100g) > Fr5 (130 mg/100g) 순으로 나타났으며, HP-40은 LH1 (168 mg/100g) > LH2 (135 mg/100g)의 함량을 보였다.

실험결과 HP-20의 경우, Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1)으로 정제하기 전에는 설포라판이 검출되지 않았으나, 순차적인 용매에 의한 정제·추출로 설포라판이 용출되는 것을 확인할 수 있었으며, HP-40의 경우, 순차적으로 정제를 하면서 유효성분인 설포라판 함량이 감소하는 것으로 나타났다. LH3의 정제추출물에서 확인된 다른 형광물질도 분리·정제 중에 있다.

다. GC/MS분석

○ GC/MS로 분자량과 피크의 분리를 확인하기 위해서 전자에 충격을 주어서 fragmentation을 확인한 결과, 1H-Indol-3-propanol 의 adipate와 93%의 유사성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

라. 구조분석(NMR 구조분석)

○ Positive ion에서 GC/MS상 분자량 측정 결과, 175.10의 분자량을 갖는 것으로 나타났다 (m/z ; 175.10 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR(in CHCl<sub>3</sub>-d<sup>6</sup>) 측정결과와 <sup>13</sup>C-NMR의 결과를 종합하여 구조를 결정하였으며, C 11개, H 13개 그리고 NO1개를 갖는 분자식 C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO 분자량 175.10 인 Indol계 1H-Indol-3-propanol 으로 동정 되었다.

#### 4. 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 및 위궤양 개선 효능평가

가. 헬리코박터균에 대한 항균 및 위염 개선 효능 평가

○ 본 연구는 브로콜리 새싹 추출물(broccoli sprout extract, BSE)의 헬리코박터 (*Helicobacter pylori*)균에 대한 항균 및 위염/위궤양 개선효능을 평가하기 위해 수행되었다. BSE는 70% 에탄올로 추출한 후 20%와 40% 에탄올로 부분 정제하여 각각 20BSE, 40BSE 및 70BSE로 명명하였다. *In vitro* 시험에서 10% fetal bovine serum (FBS)와 20BSE, 40BSE 및 70BSE의 최고농도를 첨가하여 serial dilution agar를 제작하고, *H. pylori* 접종 72시간 뒤의 균체 성장이 완전히 억제된 최소증식억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 확인하였다. 20BSE에서는 64 µg/mL 농도 이상의 구간에서, 40BSE와 70BSE에서도 각각 125 µg/mL와 1,000 µg/mL 농도 이상의 구간에서 억제능을 나타내어 20BSE > 40BSE > 70BSE의 순으로 항균효능이 우수하였다. 또한 urease 억제효능을 평가하기 위하여 *H. pylori* 균주(1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL)에 20BSE, 40BSE 및 70BSE를 농도별로 가하고, 6시간 동안 배양한 후 흡광도의 변화를 측정하여 urease의 활성도를 확인하였다. 20BSE, 40BSE 및 70BSE 모두 농도의존적으로 효소활성도를 억제하였는데, 각각 350, 700 및 >2,000 µg/mL의 중간억제농도 (median inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)를 나타내어 항균효능 순위와 일치하였다.

*In vivo* 마우스 감염모델에서 위점막에 대한 CLO kit 및 직접적인 균체확인 결과, 20BSE, 40BSE 및 70BSE 모두 균체제거 효과를 보여 주었는데, 40BSE > 70BSE ≥ 20BSE의 순으로 효과적이었는데, 특히 40BSE는 100 mg/kg에서 30 mg/kg pantoprazole과 유사한 효능을 보여 주었다. 위산분비에 대한 영향에 있어서 BSE는 위액량, pH, free HCl 및 total acidity에 전혀 영향을 미치지 않아 proton pump inhibitor인 pantoprazole과는 다른 기전을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 흥미롭게도, BSE는 위산분비에 영향을 미치지 않음에도 위산과다로 인한 위궤양을 탁월하게 예방하였는데, *in vitro* 항균효능이 탁월한 20BSE나 *in vivo* 균체제거 효과가 뛰어난 40BSE보다 70BSE가 더 우수하였다. 이는 20BSE가 직접적인 항균효능을, 40BSE가 균체의 위점막 침투 억제효과를, 그리고 70BSE가 위점막 보호효과를 나타내는 서로 다른 기전을 가지고 있음을 의미한다. 따라서 브로콜리 새싹 에탄올 추출물은 추출용매에 따라 서로 다른 기전을 통해 복합적인 효능을 발휘하는 것으로 판단된다.

나. 기전별 위궤양 개선 효능 평가

Ethanol, indomethacin, WIRS 등 서로 다른 원인의 위궤양에 대해 브로콜리 새싹 추출물의 개선효능을 비교한 결과, 기존의 시판품인 J-BSE는 indomethacin 유도 위궤양에만 특이적



으로 좋은 효능을 보여 주어 위조직 내로의 혈류저하로 인한 위궤양에 효과적인 것으로 나타났다. 이에 비해 70BSE는 indomethacin과 WIRS 유도 위궤양에 모두 좋은 효과를 나타내어 혈류개선과 위산분비 차단을 통해 효능을 발휘하는 것으로 J-BSE보다 적용범위가 확대되었음이 확인되었다. 흥미롭게도 40BSE는 70BSE에 비해 indomethacin 및 WIRS 유도 위궤양에 대한 효능이 상대적으로 낮았지만 최적용량이 30 mg/kg 이하로 내려가는 경향을 보여 이들 모델에서도 효능이 소실된 것이 아니라 유효용량 재설정이 필요함을 시사하고 있으며, 특히 ethanol 유도 위궤양에 대해서는 효능이 크게 상승하여 폭넓은 적응증이 확보되었음이 확인되었다. 한편, 지표물질 겸 유효물질로 추정된 sulforaphane, indole-3-carbinol 및 3-indolepropanol에 대한 유효성 평가 결과 indole-3-carbinol의 효과는 미약하였지만 sulforaphane과 3-indolepropanol은 0.2-0.6 mg/kg의 아주 적은 용량에서로 pantoprazole (30 mg/kg)에 버금가는 효능을 발휘함으로써 브로콜리 새싹 추출물을 활용한 기능성 식품소재 개발에 좋은 지표가 될 것으로 기대된다.

## 5. 브로콜리 새싹 농축액 원료를 이용한 발효유 식품 (대량생산 공정)

### 가. 원료 생산 과정

- 브로콜리 종자를 식물공장 시스템과 디레카 장치를 활용하여 평균 4~5시간 버블링하고, 평균 120g 씩 파종하여 온도 21~23℃, 습도 45~60%로 조절하여 2일동안 암조건하에 발아를 유도함.
- 발아가 진행되면, LED Blue 광원을 12시간씩 조사하였으며, 매 1시간 마다 2분씩 수분을 분사하여 4일 동안 재배한 후 수확함.

### 나. 브로콜리 새싹 농축액 제조공정

- 수확한 브로콜리를 브로콜리 무게의 5배의 물을 사용하여 깨끗이 수세함.
- 수세한 브로콜리 생물은 식물세포가 살아있기 때문에 건조과정을 거쳐 세포를 파괴시켜 성분이 최대한 추출되도록 함.
- 건조과정을 거친 것을 성분추출의 최적화를 위해 세절함.
- 성분의 파괴를 방지하기 위해 100℃가 아닌 추출온도를 80℃를 유지하며, 장시간 추출함.
- 추출성분이 아닌 이물질을 함유하지 않도록 30 $\mu$ m 필터로 1차 여과하고, 2차로 4  $\mu$ m 필터로 제균 여과하여 브로콜리의 성분만을 함유하게 함.
- 희석된 성분을 고농도로 생산하기 위해 저온 감압 농축함.
- 농축 시 휘발되는 향을 포집하여 액을 다시 농축액에 혼합시켜 농축함으로써 브로콜리 고유의 향을 함유시킴. (에센셜 성분으로 생리활성 강함)
- 농축액을 20 kg 플라스틱 통에 충전 포장함.
- 충전 포장한 것을 출고 전에 표준품과 비교 시험 함.(성상, 물리시험)
- 합격품을 출고 시킴.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

#### 가. 특허출원

- 본 연구결과의 산업재산권 확보를 위해 ‘브로콜리 새싹의 생산방법’, ‘위점막 보호 효능을 갖는 브로콜리 새싹 정제 추출물과 그 제조방법’을 특허 출원 및 등록하였음
- ‘위점막 보호 효능을 갖는 브로콜리 새싹 정제 추출물과 그 제조방법’ 특허가 등록될 경우, 브로콜리 새싹을 주 원료로 한 고부가가치 ‘위 건강기능제품’으로의 실용화 및 용도 특허가 가능하여 기술이전 근거로 활용될 것으로 기대됨

#### 나. 학술대회 발표

- 브로콜리 새싹 추출 유래 유용성분의 분석 및 효능평가 등 다수의 연구결과를 국내학술대회에 지속적으로 발표하였음
  - Physico chemical properties of broccoli sprouts cultivated in the plant factory system with different light conditions. 한국식품영양과학회 학술대회, p2-67, 2011.10.30~2011.11.02, 김태수와 5인
- 식물공장 시스템에서 광원의 종류를 달리하여 재배한 브로콜리 새싹의 유효성분 함량 및 *H.pylori* 억제능. 한국약용작물학회 학술대회, p3-11, 2012.05.03~2012.05.04, 김태수와 3인 (우수포스터상 수상)

#### 다. 논문발표 및 게재

- 브로콜리 새싹 유래 LED 광원에 따른 이화학적 특성 및 생리활성 효능검증에 관련된 논문을 3건 게재하였음
- 현재 위궤양 관련 생체이용 및 건강증진효과와 관련된 논문을 (SCI)게재 예정
  - 식물공장 시스템에서 광원의 종류를 달리하여 재배한 브로콜리 새싹의 이화학적 특성 한국식품영양과학회지, 40(12); 1757-1763 (2011)
  - 광원별 브로콜리 추출물의 화장품 약리활성 검증 생명과학회지, 22(3); 347-353 (2012)
  - 식물공장 시스템에서 재배한 브로콜리 새싹의 건조방법에 따른 이화학 및 항산화 특성 연구, 한국식생활문화학회지, 28(1); 57-69 (2013)

### 2. 활용계획

- 식물공장 생산시스템 기술을 바탕으로 식물공장 생산 시스템 구축
- 설포라판 고 함유된 새싹 생산을 위한 최적 조건 확립
- 설포라판 손실을 최소화 한 원재료의 전처리 및 가공기술 표준화
- 브로콜리 새싹 추출물 생산체계 구축, 시제품 및 최종상품 생산(분말, 농축액)

- 기능성 물질의 최적 추출용매조건 및 최적 추출방법 및 가공 기술 개발
- 가공적성 평가, 활성물질 분석법 검토
- 지역 기업 경쟁력 향상을 위한 기술향상 프로그램 마련
- 원료 작물의 안정적이고 계획적인 자체 생산 공급원으로 활용
- 친환경농업의 새로운 모델로서 한국형 식물공장 모델 제시
- 식물공장을 활용한 식품산업 관련 수익사업 모델 제시
- 브로콜리새싹 추출물 개발 및 국내 유통 및 해외 수출
- 식·음료제품의 기능성 측면에서 upgrade된 제품출시를 위한 국내·외 바이오 식품 원료 공급 및 원료공급을 통한 식품산업 서포트
- 건강기능식품 개발을 위한 기능성 원료 소재로 활용
- 융·복합바이오분야의 전문 인력 양성 및 지역기반업체로의 고용촉진

# SUMMARY

## I. Title

Development of high value added functional food using broccoli sprouts cultivated in the plant factory system

## II. Objective and Necessity of Research & Development (R&D)

### 1. Objective of Research & Development:

In our study, it was planned that an active substances including sulforaphane in broccoli sprouts would be determined and isolated. It was also planned that a high value added functional food using broccoli sprouts would be developed utilizing plant factory system. Outline of our research and development were as below:

- (1) Determination and isolation of sulforaphane as an active substance in broccoli sprouts extract
- (2) Efficacy Analysis on broccoli sprouts extract with high sulforaphane for antioxidant activity and for protective effect against gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori*.
- (3) Establishment of mass production system and development of functional food (Evaluation of safety)

### 2. Necessity of Research & Development:

#### (1) Economic Aspects:

- Health Functional Food (HFF) Market of Korea has been extended due to diversification of distribution channels and new participation in the market since 1999.
- The size of Health Functional Food market including manufacturing, importing and sales) was about USD 5.86 Billion dollars at 2008 year.
- It became a menace to Korea that imported raw materials and HFF products from foreign countries had been increased.
- Also, market share of multinational corporations have been gradually increased in the HFF market of Korea.
- On the other hand, most HFF suppliers in Korea have imported functional food

materials from abroad to mix them and to sale supplement products. It could be a concern that Korea had become more dependent on foreign trade in HFF industry in future.

- Therefore, it is urgent for us to develop useful functional food materials and to make new HFF products which have international competitiveness. Also, it is time that government should enlarge of support to the relevant industry.

(2) Social Aspects:

- Under the influence of consumer's high concern about their health such as selfcare on illness, consumer demand for health functional foods have been gradually increased due to economic revitalization and population aging. So, the market has a lot of room to grow.
- Consumer knowledge level for HFF products have became higher as time goes on. Also, consumer tend to prefer organic and natural food materials if it have same function.

(3) Technological Aspects:

- Studies related to plant factory have been gradually conducted since 2000 year. However, most researches were staying at a basic level.
- A Korean government agency 'Rural development administration (RDA)' is one of representative researching organization for plant factory system. But the government agency has been conducting research activities not for commercialization and industrialization.
- A few companies or local government have been planning to install some types of plant factory. However, core element and integrated technology were not established yet.
- Also, there is a shortage of professional technicians who can develop high value added bio food materials using domestic agricultural products.
- ※ For development of new functional food materials and its commercialization, research and development activities such as screening functional materials, isolating bioactive substances, analysis on physical & chemical features and components and efficacy & safety evaluation have been conducted through Industry–University–Institute collaboration.
- ※ Also, it is required to develop BIO food materials with high performance in health care utilizing plant factory system.
- ※ Professional local technicians and technology are required. Also, government should enlarge of biological research resources.

### III. Scope of Research & Development

- Establishment of production system for broccoli sprouts extract utilizing plant factory for producing broccoli sprouts extract-rich powder, pilot product and commercialization.
- Development and optimization of extract methods for active substances
- Establishment of quantitative analysis methods by HPLC
- Efficacy evaluation for bioactive components on anti-*Helicobacter pylori* effect and improvement of gastric ulcer through measuring minimal inhibitory concentration (MIC) and anti-Urease activity of broccoli sprouts extract
- Development of other substance besides sulforaphane as an active substance of broccoli sprouts and Commercialization for functional food products

### IV. Results of Research & Development

#### Section 1. Simultaneous determination and standardization of functional substances from broccoli sprouts cultivated in plant factory

##### 1. Physical and Chemical Features and Components of Broccoli sprouts by LED light sources

###### ○ Sugar:

According to a result of chemical composition analysis of broccoli sprouts by LED light sources, it shows that chemical composition were significantly different by light sources, respectively. In component sugar analysis, there were 2 kinds of monosaccharides. In details, 0.22%–3.12% of glucose was found and 0.10%–2.04% of fructose was detected.

###### ○ Organic Acid:

There were 3 kinds of organic acid in broccoli sprouts samples and its contents were different by LED light conditions. Citric acid, malic acid were detected from all the samples. Range of citric acid was 241.48–3292.59 mg%. Content of citric acid was different by drying methods, also high content of citric acid was detected in broccoli sprouts by blue LED light. Regarding malic acid, the range was 183.76–2477.48 mg%. And high content of malic acid was detected by red LED. The content also was different by drying method, In case of oxalic acid, the range of content was 42.14–331.31 mg% and high content of the acid was detected by blue LED light condition. However, oxalic acid was not detected in the hot-air drying sample. It was assumed that content of oxalic acid was decreased or volatilized because of low-molecularization through drying process.

○ Minerals:

Total 7 kinds of minerals were detected from broccoli sprouts samples by different LED conditions. Also, high component of minerals was in the freezing dried broccoli sprouts. Contents of Fe, Mn, Cu, Zn were less than 10mg/100g. K was 73.55 – 669.04 mg/100g, Mg was 49.71 – 585.5 mg/100g and Na was 27.02 – 394.13mg/100g. Mineral ingredients and its content were slightly different between broccoli sprouts and broccoli leaf exposed by LED lights.

○ Vitamins:

Content of Vitamin A of broccoli sprouts samples was FLR 212.62 $\mu$ gRE/100g, HDR 860.62 $\mu$ gRE/100g. In the samples by red LED, Vitamin A was highly contained. Content of Vitamin C was HDR 134.57mg/100g, HDB 137.05mg/100g, HDW 119.87mg /100g, FDR 136.96mg/100g, FDB 84.19mg/100g, FDW 8.53mg/100g. Vitamin C was highly detected from hot-air drying sample while it was not contained in sample of broccoli leaf (FL). In case of Vitamin E, the content was 0.93–16.83 IU. Also, Vitamin E was most highly detected from freezing dried sample.

## 2. Bioactive effect of active substances in broccoli sprouts with different drying methods

○ Bioactive effect of active substances in broccoli sprouts with different drying methods were investigated.

– Total phenol contents were as below:

In fresh broccoli sprouts: 1.51 mg/mL,

In low temperature drying broccoli sprouts: 1.6 mg/mL,

And In freezing dried broccoli sprouts: 1.46mg/mL.

– SOD (Superoxide dismutase)–like activity were as below:

In fresh broccoli sprouts: 37.99%,

In low temperature drying broccoli sprouts: 63.04%,

And In freezing dried broccoli sprouts: 48.22%

– Electron–Donating Abilities (EDA) were as below:

In fresh broccoli sprouts: 29.15%,

In low temperature drying broccoli sprouts: 38.81%,

And In freezing dried broccoli sprouts: 15.02%

– Hydroxyl radical scavenging activities were as below:

In fresh broccoli sprouts: 61.37%,

In low temperature drying broccoli sprouts: 67.76%,

And In freezing dried broccoli sprouts: 60.58%

### 3. Bioactive effect of active substances among broccoli sprouts fractions

- SOD-like activities and hydroxyl radical scavenging activities of broccoli sprouts fractions were very high. EDA(Electron-Donating Abilities) of ethyl acetate fraction and butanol fraction were high comparing other fraction. Therefore, it was tried that the active substances were isolated and refined by butanol fraction which had high activities.

### 4. Bioactive effect of broccoli sprouts fractions by Sephadex LH-20

- Bioactive effect of broccoli sprouts fractions by Sephadex LH-20 were investigated.
  - Total phenol contents were followed by (as below):  
EtOA (3.03 mg/mL) > BuOH (2.49 mg/mL) > CHCl<sub>3</sub> (1.62 mg/mL) > H<sub>2</sub>O (1.15 mg/mL) > Hexane (1.05 mg/mL)
  - SOD-like activities were followed by (as below):  
EtOA (94.91%) > BuOH (91.69%) > CHCl<sub>3</sub> (71.27%) > H<sub>2</sub>O (50%) > Hexane (25%)
  - EDA were followed by (as below):  
EtOA (92.64%) > BuOH (82.82%) > CHCl<sub>3</sub> (42.86%) > H<sub>2</sub>O (21.06%) > Hexane (17.07%)
  - Hydroxyl radical scavenging activities were followed by (as below):  
BuOH (91.08%) > EtOA (89.59%) > H<sub>2</sub>O (87.54%) > Hexane (86.10%) > CHCl<sub>3</sub> (85.76%)
  - Hydrogen radical scavenging activities were followed by (as below):  
H<sub>2</sub>O (71.40%) > BuOH (71.37%) > Hexane (70.66%) > EtOA (69.11%) > CHCl<sub>3</sub> (55.24%)

### 5. Determination of bioactive substances and Establishment of isolation condition for broccoli sprouts extract which has high performance

- Thin layer chromatography (TLC) analysis was conducted with EtOA, BuOH fractions which antioxidant activities were high. In the TLC analysis, developing solvents were BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2, v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 0.5 v/v/v/v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 2 : 4 : 1 : 2 : 1, (v/v/v/v/v). Result of the analysis showed that Refention factor (Rf) values were same. It was found that all fractions were collinear substances. It was suggested that verified substance might be an unknown chemical which had antioxidant activity,



anti-*helicobacter pylori* and improvement of gastric ulcer.

## 6. HPLC Analysis and Sulforaphane Quantitative Analysis

○ Sulforaphane contents of solvent fractions of broccoli sprouts extracts were followed by  $\text{CHCl}_3$  (56.76 mg/100g) > BuOH (49.16 mg/100g) >  $\text{H}_2\text{O}$  (5.67 mg/100g) > n-hexane (2.18 mg/100g). Result showed that processing methods and extraction solvents could influence elution of active substance sulforaphane.

## 7. Structural Analysis

○ Molecular weight was measured by using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). M.W. at positive ion on GC/MS was 177.03 [M+H]<sup>+</sup>. Structure was determined with combination of the results of <sup>1</sup>H-NMR(in  $\text{CHCl}_3\text{-d}^6$ ) and <sup>13</sup>C-NMR. In our study, sulforaphane (molecular fomular:  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NOS}_2$ , M.W. 177.03) was isolated from broccoli sprouts fraction.

○ Japanese BSE (J-BSE) exerted a high anti-ulcer effect in only indomethacin-induced ulcers, indicative of its improving activity on the local blood flow. In comparison, 70BSE exhibited high efficacies in both indomethacin- and WIRS-induced ulcers, suggesting that it improves local blood flow and inhibits gastric acid secretion as seen in pantoprazole. Notably, 40BSE displayed an excellent anti-ulcer activity in ethanol-induced ulcers, in addition to the decreased optimal dosages in indomethacin- and WIRS-induced ulcers, implying that the target causative factors were expanded. As active ingredients, sulforaphane and 3-indolepropanol were found to improve the ethanol-induced ulcers at low doses (0.2–0.6 mg/kg), whereas the effect of indole-3-carbinol was negligible. The results indicate that BSE, prepared by stepwise ethanol extraction, attenuates gastric ulcers induced by various ulcerative factors via diverse action mechanisms. Therefore, it is suggested that 40BSE could be a good candidate for the improvement of gastric function, and that sulforaphane and 3-indolepropanol might be useful markers as active ingredients in 40BSE.

## Section 2. Establishment of mass production of broccoli sprouts utilizing plant factory and development of high value added functional food

### 1. Production Methods of broccoli sprouts and establishment of mass production

A. Production method of broccoli sprouts using an infrared and electron generating device for water (DILEKA)

- In order to cultivate broccoli sprouts, infrared and electron generated water was supplied in the plant factory system. The water was injected for 2 minutes per 1 hour during cultivation period. Also, the sprouts were exposed by LED lights 12 hours per day.

B. Optimization of growth conditions for broccoli sprouts

- Germination of broccoli seeds was conducted 2 days in the dark place with temperature 21~23°C and humidity 45~60%. After germination, LED light exposed 12 hours during 4 days.
- The result showed that contents of nutrients and active substances were different by cultivation conditions of broccoli sprouts. It was suggested that optimized harvest time of broccoli sprouts was 4 days after germination and cultivation with blue LED light.

C. Establishment of optimized extract methods for broccoli sprouts

- Harvested broccoli sprouts was dried in the hot air drying device with 40~60°C, 24 hour. The dried sprouts were extracted 3 times by 70% EtOH solvent, 40°C, 12 hours. Yield rate of broccoli sprouts with white light 11.87%, red light 7.65% and blue light 14.02%. It showed that yield rate of broccoli sprouts cultivated with blue light were more than 10 times comparing fresh broccoli sprouts.

### 2. Active substance from broccoli sprouts fraction by open column

A. Yield rates, activities and sulforaphane contents of broccoli sprouts by open column

- Hot-air dried broccoli sprouts were extracted by 70% EtOH. And the broccoli sprouts extract was absorbed in particle size selectable HP-20 resin (H = 26, Ø = 10). And the extract was eluted by different EtOH concentrations (0, 20, 40, 60, 80, 100%). The yield rate was most high at 20% EtOH eluted fraction (BHP-20). However, sulforaphane was most highly contained at 40% EtOH fraction (BHP-40).
- BHP-20 fraction was excellent activity of anti-*Helicobacter pylori* effect. Also, HP-40 was superior in bioactive effect. In order to isolate bioactive substances from BHP-20

and BHP-40. The fractions inserted into 4 x 50 cm of sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1) for open column chromatograph. And 2 g of HP-20 and HP-40 fraction were loaded, respectively. In the elution, developing solvent of HP-20 was chloroform : Methanol (100 : 0 - 0 : 100) and the solvent of HP-40 was 70% MeOH(100). From HP-20 fraction, 8 kinds of subfractions were isolated using Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1). And, 3 kinds of subfractions were isolated from the HP-40 fraction. Also, active compound from superior fractions was isolated and refined. And the structural analysis was also in progress.

- Fr1~Fr8 subfractions were obtained from BHP-20 fraction which had anti-*Helicobacter pylori* effect. LH1 ~ LH3 subfractions were also obtained from BHP-40 fraction which had superior bioactive effect. The results for subfractions analysis, activities were high at the Fr1, Fr3, Fr5 and LH1,3 subfractions. Using this substances, structural analysis were conducted.

### 3. Structural Analysis

#### A. TLC Analysis patterns for active substances

- Thin layer chromatography (TLC) analysis was conducted using BHP-40, and Fr1, Fr5, LH1,3 refined extracts which had superior bioactive effect. In the TLC analysis, developing solvents were CHCl<sub>3</sub> : n-hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH (4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 1, v/v/v/v/v/v). Result of the analysis showed that Retention factor (R<sub>f</sub>) values were same. It was found that all fractions of Fr1, Fr5 and LH1 were collinear substances. Also, other fluorescence substances were found at BHP-20, 40, 60 and LH3 refined extracts. It was suggested that verified substances might be an unknown chemical which had bioactive effect and anti-*Helicobacter pylori* effect.

#### B. HPLC Analysis and Sulforaphane content

- Bioactive substance sulforaphane were analyzed by HPLC (µ-Bondapak C18 3.9x300 mm; flow rate 0.8 ml/min; inject vol., 10µL; detector, 254 nm). Sulforaphane contents of HP-20 were followed by Fr3 (240 mg/100g) > Fr1 (193 mg/100g) > Fr5 (130 mg/100g). And the content of HP-40 were followed by LH1 (168 mg/100g) > LH2 (135 mg/100g). In case of HP-20, sulforaphane was not detected before refining by Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1). However, it showed that sulforaphane was eluted through extraction and refinement by solvents. Regarding HP-40, content of sulforaphane was decreased through refinement. Other fluorescence materials from refined LH3 subfractions were also being isolated and refined

#### C. GC/MS Analysis

○ In order to measure molecular weight and identify peak, Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) was used. After electron impact fragmentation, it showed that peak was 93% similar with adipate of 1-H-indol-3-propanol.

#### D. NMR Structural Analysis

○ Molecular weight at positive ion on GC/MS was 175.10 [M+H]<sup>+</sup>. Structure was determined with combination of the results of 1H-NMR(in CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) and 13C-NMR. In our study, 1H-Indol-3-propanol (molecular formula C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO, M.W. 175.10) was isolated.

#### 4. Efficacy evaluation of broccoli sprouts extract on anti-*Helicobacter pylori* effect and improvement of gastric ulcer

○ The study was conducted in the purpose of efficacy evaluation of broccoli sprouts extract (BSE) on anti-*Helicobacter pylori* effect and improvement of gastritis / gastric ulcer. After BSE was extract by 70% EtOH, the extract was also refined by 20% and 40% EtOH, separately. *In vitro*, 3 kinds of BSEs such as 20% BSE, 40% BSE and 70% BSE were prepared. 10% of fetal bovine serum (FBS) was added into the high concentrations of 20 BSE, 40 BSE and 70 BSE in order to prepare serial dilution agar. And the agar preparation were inoculated by *Helicobacter pylori*. After 72 hours of *H. pylori* inoculation, Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of antimicrobial. Inhibition activity of 20 BSE was found over 64 µg/mL concentration. And inhibition activities of 20 BSE and 70 BSE were found over 125 µg/mL and 1,000µg/mL, respectively. Inhibition activities of BSEs were effective followed by 20 BSE > 40 BSE > 70BSE. To evaluate efficacy of urease inhibition activity, 1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL of *H. pylori* strain were added on 20 BSE, 40 BSE and 70 BSE. After 6 hour cultivation, urease activity was determined by measuring change of absorbance. All of the BSEs inhibited enzyme activity dose-dependantly. Median inhibitory concentration IC<sub>50</sub> of 20 BSE, 40 BSE and 70 BSE were 350, 700, over 2,000 µg/mL. The order is same as those of antimicrobial activity. *In vivo*, in a mouse infection model, the result of CLO kit analysis showed that all of 20 BSE, 40 BSE and 70 BSE had efficacy of bacteria eradications against gastric mucosa. The efficacy of bacteria eradications were followed by 40BSE > 70BSE ≥ 20BSE. Especially, 100mg/kg of 40 BSE showed similar efficacy of 30mg/kg of pantoprazole. Regarding effect of maximum gastric acid secretion, BSE didn't influence to amount of gastric juice, pH, free HCL and total

acidity, so that it had different mechanism comparing with pantoprazole (a proton pump inhibitor, PPI). Although BSEs didn't influence to gastric acid secretion, the BSEs prevented excellently gastric ulcer induced by excess acid in the stomach. In this study, 70 BSE showed superior activity comparing with 20 BSE which had antimicrobial activity (*in vitro*) and with 40 BSE which had bacteria eradications (*in vivo*). It was suggested that 3 kinds of BSE had different mechanism, respectively. In details, 20 BSE had direct antimicrobial activity, and 40 BSE had inhibition effect of penetration of bacteria into gastric mucosa . Also, 40 BSE had protective effect on gastric mucosa. Therefore, it was suggested that the broccoli sprouts extracts (EtOH BSEs) had synergistic effects on gastric health by their complex activities with different mechanisms.

○ 70BSE exhibited high efficacies in both indomethacin- and WIRS-induced ulcers, suggesting that it improves local blood flow and inhibits gastric acid secretion as seen in pantoprazole. Notably, 40BSE displayed an excellent anti-ulcer activity in ethanol-induced ulcers, in addition to the decreased optimal dosages in indomethacin- and WIRS-induced ulcers, implying that the target causative factors were expanded. As active ingredients, sulforaphane and 3-indolepropanol were found to improve the ethanol-induced ulcers at low doses (0.2–0.6 mg/kg), whereas the effect of indole-3-carbinol was negligible. The results indicate that BSE, prepared by stepwise ethanol extraction, attenuates gastric ulcers induced by various ulcerative factors via diverse action mechanisms. Therefore, it is suggested that 40BSE could be a good candidate for the improvement of gastric function, and that sulforaphane and 3-indolepropanol might be useful markers as active ingredients in 40BSE.

## **5. Mass production process of broccoli sprouts concentrate for application of a yogurt product**

### **A. Production of broccoli sprouts**

○ Broccoli seeds were washed for 4~5 hours. And broccoli sprouts were cultivated in the plant factory system utilizing DILEKA device. Average 120g of broccoli seeds were sown on plates of plant factory. Germination was conducted in the dark place during 2 days with temperature 21~23°C, and humidity 45~60%.

○ After germination, blue LED light exposed 12 hours per day. And the water was injected for 2 minutes per 1 hour during cultivation period. Harvest time of broccoli sprouts was 4 days after germination and cultivation.

### **B. Process flow of Broccoli sprouts concentrate**

- Cleaning fresh broccoli sprouts with 5 times of water
- Drying of broccoli sprouts for extraction
- Cutting dried broccoli sprouts for optimization of substance extraction
- Extraction with temperature 80°C, long hours.
- First Filtration with 30 $\mu$ m filter for removal of foreign substance
- Second Filtration with 4 $\mu$ m filter for removal of microorganism
- Concentration of diluted substances using low temperature evaporator
- Collecting volatile flavour of broccoli sprouts when concentration
- Mixed flavour into broccoli sprouts concentrate
- Filling the concentrate into PE 20KG bag
- Quality Control for broccoli sprouts concentrate
- Labelling of the product in accordance with Korean Food Sanitation Act

## V. Application of results and further plan

### 1. Details of applications of the results

#### A. Patents

- As results of this study, applied and registered patent are as below:
  - Registered Patent: Producing method for broccoli sprouts buds
  - Applied Patent: Refined extract of broccoli sprouts with inhibitory activity of *Helicobacter pylori* and manufacturing method thereof
- If the above applied patent "Refined extract of broccoli sprouts with inhibitory activity of *Helicobacter pylori* and manufacturing method thereof" were registered, it is expected that broccoli sprouts extract product can be a high value added functional food materials for gut health.

#### B. Attending symposium and conference

- As results of this study, we attended symposium and conference for announcement as below:
  - Physico chemical properties of broccoli sprouts cultivated in the plant factory system with different light conditions. Symposium of KFN, p2-67, TAESU KIM et al. (30, OCT. ~ 02 NOV. 2011)
- Content of active substances from broccoli sprouts cultivated in plant factory system with different light conditions and its effect on H. pylori inhibition, Conference of the Korean Society of Medical Crop Science, p3-11, TS Kim et al.

(03. MAY, ~ 04. MAY, 2012)

### C. Scientific Articles

- As results of this study, 3 articles were published in journals as below:
  - Physico-Chemical Properties of Broccoli Sprouts Cultivated in a Plant Factory System with Different Lighting Conditions, Journal of the Korean society of food science and nutrition / v.40 no.12, pp.1757-1763 (2011)
  - Cosmeceutical Activity of Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica Plenck) with Different Light Sources, Journal of life science / v.22 no.3, pp.347-353 (2012)
  - Physicochemical and Antioxidant Properties of Broccoli Sprouts Cultivated in the Plant Factory System, Journal of the Korean Society of Food Culture / v.28 no.1, pp.57-69 (2013)
- Currently, preparing article to a science journal (SCI) regarding efficacy evaluation of the extract on improvement of gastric ulcer and promotion of health care

### 2. Further plans

- Establishment of plant factory system for BIO functional foods.
- Optimization of broccoli sprouts production for high sulforaphane content
- Standardization of preprocessing method and processing technology for loss minimization of sulforaphane
- Establishment of mass production system for broccoli sprouts extracts and production of pilot products and final products such as powder and concentrate
- Development of processing technology with optimal solvent condition and extract methods for functional substances
- Evaluation of processing quality and Review of analysis method of active substances
- Preparing technology improvement program to raise competitiveness of local companies
- Stable and planned use of raw material crops for its own product
- Proposing an alternative model of Korean Plant Factory System for an environmentally-friendly agriculture
- Proposal of profitable model related to food industries utilizing plant factory
- Domestic sale and overseas export of broccoli sprouts extracts
- Development of upgraded broccoli sprouts extract with high performance in health care
- Utilizing functional raw materials as a source of health functional foods

- Preparing education program for professional experts of combined biotechnology and employment promotion to local companies



## CONTENTS

SUMMARY .....	12
Chapter 1. Objective and Scope .....	31
Section 1. Objective of Research & Development .....	31
Section 2. Scope of Research & Development .....	34
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology .....	35
Section 1. Current Status on Domestic Technology .....	35
Section 2. Current Status on Foreign Technology .....	36
Chapter 3. Experimental Methods and Results .....	39
Section 1. Development of high value added functional food using broccoli sprouts cultivated in plant factory system .....	39
1. Production methods of broccoli sprouts and establishment of plant factory system .....	39
2. Extract methods of broccoli sprouts .....	40
3. Antioxidant activities of broccoli sprouts by various solvents .....	40
4. Antioxidant activities of broccoli sprouts by different temp. conditions .....	41
5. Antioxidant activities of broccoli sprouts by cultivation periods .....	42
6. Antioxidant activities of broccoli sprouts by lights and drying methods .....	42
7. Sulforaphane Analysis in broccoli sprouts with LED light .....	42
8. Total analysis of yield rates, activities and sulforaphane in broccoli sprouts by open column .....	43
9. Determination of the compounds which has anti- <i>Helicobacter pylori</i> activity in broccoli sprouts .....	43
10. Bioactive effect of active substances in broccoli sprouts .....	43
11. Determination condition of active substances by TLC .....	44
12. Sulforaphane quantitative analysis by HPLC .....	44
13. Instrumental Analysis .....	45
14. Minimal inhibitory concentration (MIC) and anti-Urease activity of broccoli	

sprouts extract .....	45
15. Efficacy evaluation of broccoli sprouts extract on anti- <i>Helicobacter pylori</i>	
effect and improvement of gastric ulcer .....	49
Section 2. Simultaneous determination and standardization of functional	
substances from broccoli sprouts cultivated in plant factory system .....	52
1. Materials and Methods .....	52
2. Analysis on Physical and Chemical Features and Components .....	52
3. Bioactive effect of broccoli sprouts by production and optimal extraction	
conditions .....	54
4. Antioxidant activity of broccoli sprouts fraction by various solvents .....	55
5. Antioxidant activity of broccoli sprouts fraction by Sephadex LH-20 .....	55
6. Instrumental Analysis .....	58
Section 3. Results and Discussion .....	59
1. Simultaneous determination and standardization of functional substances	
from broccoli sprouts cultivated in plant factory system .....	59
A. Analysis on Physical and Chemical Features and Components .....	59
B. Bioactive effect of broccoli sprouts by optimal extraction conditions .....	65
C. Antioxidant activity of broccoli sprouts fraction by various solvents .....	69
D. Antioxidant activity of broccoli sprouts fraction by Sephadex LH-20 .....	70
E. Instrumental Analysis .....	77
2. Development of high value added functional food using broccoli sprouts	
cultivated in plant factory system .....	80
A. Production methods of broccoli sprouts and establishment of plant factory	
system .....	80
B. Extract methods of broccoli sprouts .....	81
C. Antioxidant activities of broccoli sprouts by various solvents .....	82
D. Antioxidant activities of broccoli sprouts by different temperature conditions .....	83
E. Antioxidant activities of broccoli sprouts by cultivation periods .....	84
F. Antioxidant activities of broccoli sprouts by light sources and drying methods .....	87
G. Sulforaphane Analysis in broccoli sprouts with LED light by cultivation periods .....	88
H. Total analysis of yield rates, activities and sulforaphane in broccoli sprouts	

by open column .....	89
I. Determination of the compounds which has anti- <i>Helicobacter pylori</i> activity in broccoli sprouts .....	96
J. Bioactive effect of active substances in broccoli sprouts .....	98
K. Determination condition of active substances by TLC .....	100
L. Sulforaphane quantitative analysis by HPLC .....	102
M. Instrumental Analysis .....	106
N. Minimal inhibitory concentration (MIC) and anti-Urease activity of broccoli sprouts extracts .....	109
O. Efficacy evaluation of broccoli sprouts extract on anti- <i>Helicobacter pylori</i> effect and improvement of gastric ulcer .....	125
 Section 4. Application of broccoli sprouts concentrate as a supplementary material in a yogurt product .....	 145
 Chapter 4. Attainment of objectives and contribution .....	 150
Section 1. Attainment of objectives .....	150
Section 2. Contribution to advancement of relevant technology .....	151
 Chapter 5. Applications of the results .....	 153
Section 1. Details of Applications of the results .....	153
Section 2. Plan for Commercialization .....	154
 Chapter 6. Scientific Information of Current Technology .....	 157
Section 1. The U.S .....	157
Section 2. JAPAN .....	157
 Chapter 7. References .....	 159

# 목 차

요약문 .....	3
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	31
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	31
제 2 절 연구개발 범위 .....	34
제 2 장 국내외 기술개발현황 .....	35
제 1 절 국내기술개발 현황 .....	35
제 2 절 국외기술개발 현황 .....	36
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	39
제 1 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계	
구축 및 고부가가치 기능성 식품개발 .....	39
1. 브로콜리 새싹의 생산방법 및 식물공장 생산시스템 체계 확립 .....	39
2. 브로콜리 추출 조건 최적화 .....	40
3. 브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 항산화 효과 .....	40
4. 온도조건을 달리한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 효과 .....	41
5. 브로콜리 새싹 수확시기별 항산화 효과 .....	42
6. 광원별 브로콜리 새싹 추출물의 건조방법별 항산화 효과 .....	42
7. LED 광원에 따른 수확시기별 Sulforaphane 함량 분석 .....	42
8. Open column에 의한 브로콜리 새싹 수율, 활성 및 설포라판 함량 분석 .....	43
9. 브로콜리 향 헬리코박터 활성 및 유효성분 분리 .....	43
10. 활성성분의 생리활성 효과 .....	43
11. TLC 분리 조건 확립 .....	44
12. HPLC 분석 및 설포라판 함량 분석 .....	44
13. 기기분석 .....	45
14. 브로콜리 새싹 추출물 최소증식억제농도(Minimal inhibitory concentration,	

MIC) 및 항 Urease 활성도 .....	45
15. 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 위궤양 개선 효능 평가 .....	49
제 2 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹으로부터 기능성 성분의 분리·동정 및 표준화 .....	52
1. 실험재료 및 방법 .....	52
2. 일반성분 및 이화학적 특성 분석 .....	52
3. 가공조건 및 최적 추출조건에 따른 브로콜리 새싹의 생리활성 효과 .....	54
4. 브로콜리 추출물의 용매분획별 항산화 활성 .....	55
5. Sephadex LH-20에 의한 분획물의 항산화 활성 .....	55
6. 기기분석 .....	58
제 3 절 결과 및 고찰 .....	59
1. 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹으로부터 기능성 성분 분리·동정 및 표준화 .....	59
가. 일반성분 및 이화학적 특성 분석 .....	59
나. 가공조건 및 최적 추출조건에 따른 브로콜리 새싹 생리활성 효과 .....	65
다. 브로콜리 추출물의 용매분획별 항산화 활성 .....	69
라. Sephadex LH-20에 의한 분획물의 항산화 활성 .....	70
마. 기기분석 .....	77
2. 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발 .....	80
가. 브로콜리 새싹의 생산방법 및 식물공장 생산시스템 체계 확립 .....	80
나. 브로콜리 추출 조건 최적화 .....	81
다. 브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 항산화 효과 .....	82
라. 온도조건을 달리한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 효과 .....	83
마. 브로콜리 새싹 수확시기별 항산화 효과 .....	84
바. 광원별 브로콜리 새싹 추출물의 건조방법별 항산화 효과 .....	87
사. LED 광원에 따른 수확시기별 Sulforaphane 함량 분석 .....	88
아. Open column에 의한 브로콜리 새싹의 수율, 활성 및 설폴라판함량 분석 .....	89
자. 브로콜리 항 헬리코박터 활성 및 유효성분 분리 .....	96
차. 활성성분의 생리활성 효과 .....	98
카. TLC 분리 조건 확립 .....	100

타. HPLC 분석 및 설포라판 함량 분석 .....	102
파. 기기분석 .....	106
하. 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 위궤양 개선 효능 평가 .....	109
(1) 브로콜리 새싹 추출물 최소증식억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 및 항 Urease 활성도 .....	109
(2) 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 위궤양 개선 효능 평가 .....	125
제 4 절 브로콜리 새싹 농축액 원료를 부원료로 이용한 발효유 식품 .....	145
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	150
제 1 절 목표 달성도 .....	150
제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도 .....	151
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	153
제 1 절 연구개발 성과 .....	153
제 2 절 산업화 추진방안 .....	154
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	157
제 1 절 일본 .....	157
제 2 절 미국 .....	157
제 7 장 참고문헌 .....	159

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 경제적인 측면

- 가. 국내 건강기능식품 시장 1999년 이후 유통다변화, 신규참여로 꾸준히 증가
- 나. 2008년도 시장규모(건강기능성식품 제조, 수입, 판매업 포함) : 5조 8천 6백억
- 다. 건강기능식품 시장의 외부 환경 위협요인으로 수입원료 및 제품증가
- 라. 다국적 기업의 시장점유율 증가
- 마. 현재 우리나라는 외국에서 대부분의 기능성 식품 소재를 수입하여 식이 보조제를 단순 조합 후 판매하는 수준(추후 해외 의존 심화 우려)
- 바. 국내 유용 기능성 식품소재의 활용에 대한 국가적인 지원확대와 국제 경쟁력이 있는 신규 기능성식품의 상용화가 시급한 실정임

### 2. 사회적인 측면

- 가. 셀프케어(Self Care) 의식 등의 소비자의 건강관심 고조, 경제 상승과 인구 고령화 등의 요인으로 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가, 시장성장 예상됨
  - 나. 최종소비자들의 건강기능식품에 대한 지식수준이 높아지고, 동일 기능성 원료라도 유기농, 천연소재 여부를 중시하는 경향
- ※ 신규 기능성 식품소재 개발 및 상용화를 위해 기능성 소재 탐색 및 분리, 이화학적 분석 연구, 공정 및 안전성 및 효능평가 연구 등 산·학·연의 통합적인 협력연구가 절실하게 요구됨

### 3. 기술적인 측면

- 가. 국내 식물공장 관련 연구는 2000년 초부터 꾸준히 진행되고 있으나, 기초 연구개발 단계에서 정체
- 나. 농촌진흥청이 식물공장 연구의 대표적인 기관으로서 해당기관 및 연구개발 추진의 특성상 상용화 및 산업화를 위한 연구사업 추진이 힘든 구조
- 다. 일부 지자체나 기업에서 다양한 형태의 식물공장의 설치에 관한 기획이 시도되고 있지만, 국내적으로 식물공장에 대한 보편적인 핵심 요소기술 및 통합기술이 확립 및 정리되지 못한 상황
- 라. 농산물 및 일반식품 소재의 고부가가치화를 위한 바이오식품 전문 인력의 부족

### 4. 본 기술개발 사업의 추진사유

- 가. 식물공장을 활용한 고기능성 바이오식품의 개발이 요구됨
- 나. 지역기반기업의 전문기술 확보 및 인재필요
- 다. 산·학·연 협력을 통한 전문 인력 양성 및 국가적 연구자원이 시급함
- 라. 참여기업의 식물공장 생산시스템 구축
  - (1) 식물공장 생산시스템 기술을 바탕으로 브로콜리새싹 대량생산 시스템 구축
    - (가) 균일한 품질의 원료(브로콜리새싹)를 언제든지 필요한 만큼 계획적으로 공급할 수 있는 작물 생산 체계 구축
      - ① 식물공장 생산시스템(메인 + 양액 + 조명 + 재배 + 제어)





다. 식물공장생산시스템을 활용한 고기능성 브로콜리새싹 재배기술 개발

- (1) 선행연구로 식물공장 생산시스템내에서 20여 종의 줄기·열매·잎 채소류와 12여종의 새싹 베이비 채소 재배기술 확립
- (2) 브로콜리새싹의 기능성 성분인 Sulforaphane이 고 함유된 새싹 생산을 위한 광량 및 광질 등 최적 생육조건 확립
- (가) 선행연구 : 기능성 성분인 Sulforaphane이 고 함유된 브로콜리 새싹 생산 최적 생육 조건 확립

○ **선행연구** : 기능성 성분인 Sulforaphane(설포라판)이 고함유된 브로컬리 새싹 생산 최적 생육 조건 확립



다양한 작물 재배 경험 및 기술 확립

바. 브로콜리새싹 분말 및 추출액 생산 기술 개발

(1) 설포라판의 손실을 최소화 한 추출 및 제조·가공 기술개발

(가) 원료 생산을 위한 원재료의 전처리 방법 설정 및 표준화

(나) 원료의 추출 및 제조·가공을 위한 최적 조건 확립

(2) 설포라판 이외의 기능성 성분에 대한 식품 개발 관련 연구

(가) 식품산업분야에 농업분야의 식물공장시스템을 적용하여, 기능성 원료로 사용되는 고부가가치 작물의 생산·공급부터 최종제품 제조·가공과정까지를 일원화하여 식물공장을 활용한 기능성 식품산업 분야의 수익모델 구축

(나) 산학협력 프로그램을 통하여, 기업이 원하는 인재를 육성하고, 지역기반기업의 연구개발 능력을 강화시키며, 고용촉진을 도모

## 제 2 절 연구개발 범위

1. 식물공장 생산시스템을 활용하여 기능성을 가지고 있는 브로콜리 새싹 추출물 생산 및 유효물질인 설포라판 등을 분리·동정하고, 고부가가치 기능성 식품소재로 개발하고자 함

가. 브로콜리 새싹 추출물로부터 유효성분인 Sulforaphane 의 분리 및 정제

나. 설포라판을 고 함유한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 및 *H.pylori* 에 대한 위염 억제능 및 작용기전 연구

다. 대량생산 체계 확립 및 기능성 식품 개발(소재의 안전성 평가)

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 기술개발 현황

#### 1. 국내 제품생산 및 시장현황

가. 국내 식물공장 관련 연구는 2000년 초부터 꾸준히 진행되고 있으나, 기초 연구개발 단계에서 정체

(1) 농촌진흥청이 식물공장 연구의 대표적인 기관으로서 해당기관 및 연구개발 추진의 특성상 상용화 및 산업화를 위한 연구사업 추진이 힘든 구조

나. 일부 지자체나 기업에서 다양한 형태의 식물공장의 설치에 관한 기획이 시도되고 있지만, 국내적으로 식물공장에 대한 보편적인 핵심 요소기술 및 통합 기술이 확립 및 정리되지 못한 상황

(1) 화우테크놀로지, 와이즈산전, 카스트엔지니어링, 다인바이오, LG, CNS, 파루스, 우양디지컴, 유양디앤유, 오디텍, 인성테크, 신한, 서울반도체 등이 식물공장 관련 연구 및 제품생산을 시도하고 있으나, 대부분 조명업체 및 기계설비 업체로서 식물공장의 조명을 비롯한 하드웨어적인 부분 기술개발로 식물공장의 상용화 및 산업화에 무리가 따름

(가) 남극 세종기지에 컨테이너형 식물공장을 설치(농진청, 파루)

(나) LG CNS와 전주시가 공동으로 식물공장을 건립하여 상용화 시도

(다) 롯데그룹은 중앙연구소에 파일럿 규모의 식물공장 설치 후 자체 기술 확보 계획(롯데 마트에 소규모 식물공장 설치, 잠실 슈퍼타워에 식물공장 운영 등)

(라) 포스코, CJ는 첨단 식물공장 활용방안 모색

(마) 경상북도 구미 완전 밀폐형 식물공장 시범 설치 계획

(바) 남양주시 수직농장, 부천시 sky farm, 인천시 청라지구 초고층 수직 농장 등

다. 인성테크의 식물공장 상용화

(1) 경기도 용인 죽전에 170m<sup>2</sup> 규모의 식물공장을 설치하여 운영 중이며, 최대 월 1만 5000포기 이상의 채소(꽃상추) 생산이 가능하다고 함

(2) 신세계 백화점 납품 : 수익사업이 아닌 대국민 홍보차원으로 추진

(3) Shop in shop 운영

(4) 생산 가능한 품목의 한정 및 메뉴 다양화의 부재로 사업 추진 애로 발생

## 제 2 절 국외기술 개발현황

### 1. 국외 제품생산 및 시장현황

#### 가. 일본

- (1) 지역경제를 활성화하고, 기후변화 대응 차원에서 경제산업성과 농림수산성이 협력하는 농상공 연계를 추진하여 식물공장 사업을 추진 중
- (2) 일본의 식물공장 시장규모는 2009년 95억엔에서 2020년에는 417억엔으로 고성장할 것으로 전망되며, 정부의 식물공장 보조금지원에 의한 것으로 판단되며 현재 50여개의 식물공장이 운영되고 있으나, 2015년에 150여개로 확대 될 예정
- (3) 일본의 식자재 공급업체인 스프레드는 기후변화 등으로 인한 가격변동 리스크 회피차원에서 2008년 식물공장을 설립하여 프릴 양상추, 로메인양상추, 상추 등을 생산하여 대형마트와 호텔에 판매 중
- (4) 일본 (주)미라이의 'Green Flavor' 식물공장은 파나소닉의 형광등을 채용하여 도심 곳곳에 점포를 개설하고, 점포 내 식물공장 시설에서 직접 재배한 야채류를 판매 중
- (5) 일본 미즈비시케미컬은 LED와 태양전지를 이용한 새로운 조명시스템을 개발하면서 2009년 기능성 채소류 생산 목적의 식물공장 사업 진출 중

#### 나. 미국

- (1) 미국은 1960-1970년대 GE, General Food, General Mills 등 기업체를 중심으로 완전인공광형 식물공장에 대한 연구를 진행하였으나, 경제성을 이유로 중도에 포기 함
- (2) Vertical Farm(수직농장) 개념으로 진화 중이나, 구체적으로 진행되고 있는 사업은 없음

### 2. 연구개발 결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

가. 우리나라에는 아직 식물공장이라고 부를 수 있는 상업적인 시설농업은 존재하지 않으며, 농업연구기관에서 시험재배를 실시하는 정도이며, 특히 식물공장에 적합한 작물을 선발하고, 각각의 작물에 적합한 최적 조건을 구명하기 위한 연구개발이 지속되고 있는 실정임

나. 일본에서는 현재까지 개발된 기술을 통해 시금치, 양상추 등의 엽채류는 이미 상품의 출하가 일반화되어 있으며, 토마토, 멜론, 딸기 등의 과채류와 국화 등의 화훼류 생산을 위한 연구도 계속되고 있음

다. 현재까지 식물공장을 활용한 새싹 채소를 주원료로한 제품의 개발이 전무한 실정임. 따라서, 브로콜리 새싹 자체를 주원료로한 제품개발은 브로콜리 새싹의 활용도를 1차 농산물물이 아닌 가공 산업으로의 확대를 가져올 수 있으며 건강기능식품원료에도 적용하였음

라. 브로콜리 새싹은 다양한 isothiocyanates, nitriles, indole 및 sulfides 등의 화합물이 함유되어 있어 그 가치가 높을 것으로 기대됨에도 불구하고 아직까지 각각의 화합물들에 대한 연구가 미진한 상태임. 이는 Sulfides 화합물이 휘발성 소재로서 수용화되지 못하기 때문에 분석 및 *in vitro* 실험 수행 시 시료의 전처리 및 실험조작에 고난이도 기술을 요하며 기능성 구명에도 애로점이 되고 있음. 본 연구에서는 브로콜리 새싹의 유효성분을 탐색하고 이의 분석기술을 정립하였으며, 이를 기반으로 소재 생산에 따른 기능성 유효성분을 검증하였음

마. 브로콜리는 항 *H.pylori* 및 항암에 효능이 있는 것으로 보고되고 있으나, 아직까지 bioactive organosulfur phytochemicals 등의 효능평가는 미미한 상태임. 특히 브로콜리 및 브로콜리 유래 indole 화합물 섭취에 따른 알코올성 위궤양 효능평가의 수행은 위점막 및 위궤양 예방 측면에서 브로콜리 새싹의 부가가치를 더욱 향상 시킬 수 있는 기술임

바. 식물공장은 농작물의 생육상태를 과학적으로 관리하여 비료나 농약을 저투입하는 정밀농업(precision agriculture)의 성격을 가지므로, 일반 농산물에 비해 안전성을 확보할 수 있으며, 또한 노지에서 재배가 어려운 기능성 농작물을 재배함으로써 고부가가치 농업을 실현할 수 있을 뿐만 아니라, 식량작물의 연중 재배를 통해 생산성을 비약적으로 높임으로써 식량기지로 활용할 수 있다는 점에서 식물공장 방식은 미래 농업의 대안이 될 수 있을 것임

사. 식물공장은 농업기술에 기계, 전기, 전자, 제어, 환경 등의 첨단산업기술을 접목하는 하이테크농업 형태이므로, 한국형 식물공장의 모델 개발이 긴급하며, 식물공장의 발전을 통해 우리나라 농업이 선진국형 산업으로 도약하기 위한 기술적인 초석을 다지는 의미도 클 것임

아. 관행 농업과 식물공장의 차별화

- (1) 기후 등 불규칙한 자연환경 변화에 영향을 받지 않거나 이를 극복하는 농업을 실현할 수 있음
- (2) 지리적 입지와 지역의 풍토에 영향을 받지 않는 농업임
- (3) 연중 안정적인 농업을 실현할 수 있음

- (4) 농산물을 균일화 규격화된 상품으로 생산함으로써 가격 결정이 용이하고 소득의 예측이 가능함
- (5) 생산요소의 저투입 농업이 가능하며, 소비자와 근접한 시장성을 추구할 수 있음
- (6) 농산물 소비패턴이나 소비자 기호에 능동적으로 대처할 수 있음

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹의 기능성 소재 생산체계 구축 및 고부가가치 기능성 식품 개발

#### 1. 브로콜리 새싹의 생산방법 및 식물공장 생산시스템 체계 확립



- 가. 식물공장 작물재배 시스템 : 구성은 다단형과 회전형으로 구성되어 있으며, 다단형은 대량생산과 컨테이너형으로 재배할 수 있도록 하는 것이 장점이며, 회전형은 공기의 순환과 공간의 최소화로 생산량은 다단형에 비해 높음
- 나. 양액공급 시스템 : 미스트(분사노즐)와 관수로 구성되어 있는 시스템으로 컴퓨터 프로그램에 의해 자동적으로 양액이 분사 혹은 점점에 의한 공급을 해주는 장치
- 다. 조명시스템 : 식물의 재배 조건에는 광합성을 활성화시키기 위해 태양의 조도를 이용하여 광합성을 하는 것을 실내에서 효율을 극대화하기 위하여 조도와 파장을 이용하여 각 식물의 성분 및 발육 상태를 최적화하기 위한 장치
- 라. 환경감지/자동제어 시스템 : 식물의 노지에서 생산 및 재배를 하는 과정에서 자연의 변수에 의한 재배조건을 최적화하기 위한 장치로 공기 및 조도, 수분공급을 최적화 하여 생산량 및 오염원을 최소화 하여 생산하기 위한 장치

### 마. 브로콜리 생산방법

브로콜리 새싹은 식물공장에서 WRM(White lighting raw materials) 백색광을 조사한 브로콜리 새싹과 BRM(Bule lighting raw materials) 청색광을 조사한 브로콜리 새싹 RRM(Red lighting raw materials) 적색광을 조사한 브로콜리 새싹 RBRM(Red + Blue lighting raw materials) 적색 + 청색광원을 혼합한 브로콜리 새싹으로, 발아 2일(암조건), 4,5,6일 동안 하루에 12시간씩 조사시켰다. 온도범위는 21~23℃, 습도는 45~60%로 조절하여 브로콜리 새싹을 재배하였다.

## 2. 브로콜리 새싹 추출 조건 최적화

가. 브로콜리 새싹을 저온열수추출 방법 및 용매조건별, 온도조건별, 수확시기별로 가장 효능효과가 뛰어난 추출방법을 생리활성 평가를 통해 선택하였다.

## 3. 브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 생리활성 효과

가. 추출

(1) 시료 10g을 20%, 50%, 70%, 100% ethanol을 사용하여 40℃ 온도조건에서 12시간씩 3반복에 걸쳐 추출하였다. 추출 한 시료를 여과(Whatman No.2)후 40℃에서 감압농축(Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL 의 농도로 조제한 후 0.45 $\mu$ m membrane filter로 재 여과한 다음 각종 분석에 사용하였다.

나. 페놀성 화합물

(1) 추출물 0.1mL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 2.0mL 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 페놀성 화합물 정량을 위한 검량선은 catechin을 이용하여 0~1.0 mg/mL의 농도로 작성하였으며, 모든 과정은 3회 반복하였다.

다. SOD 유사활성 측정

(1) 시험관에 tris-HCl buffer 3mL, 0.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하고 25℃에서 10분 방치한 후, 1N-HCl 1mL를 첨가하여 반응을 정지시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{SOD-liked activity (\%)} = 100 - \left( \frac{A}{B} \times 100 \right)$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도



#### 라. 전자공여능 측정

(1) 추출물 0.5mL에 0.15 mM DPPH 용액 3.5 mL 가하여 잘 섞은 후 517 nm에서 30분간 흡광도의 변화를 측정하여 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = 100 - \left( \frac{A}{B} \times 100 \right)$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

#### 마. Hydroxyl radical 소거활성 측정

(1) 시험관에 0.1 mM FesO4/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL 추출물 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.3 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL를 가하고, 37°C incubator에서 2시간 반응시킨 후 20% TCA (trichloroacetic acid) 용액 1 mL를 가하여 100°C에서 15분간 가열한 후 급속히 냉각시켜 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity}(\%) = \frac{B - A}{B} \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

### 4. 온도조건을 달리한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 효과

#### 가. 추출

(1) 시료 10 g와 70% ethanol를 사용하여 40°C, 60°C 온도조건에서 12시간 씩 3반복에 걸쳐 추출하였다. 추출 한 시료를 여과(Whatman No.2)후 40°C에서 감압농축(Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL 의 농도로 조제한 후 0.45 um membrane filter 로 제 여과한 다음 각종 분석에 사용하였다.

#### 나. 항산화 효과

(1) 항산화 효과 측정은 ‘브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 항산화 효과’ 에서 사용한 방법과 동일하게 측정하였다.

## 5. 브로콜리 새싹 수확시기별 항산화 효과

### 가. 추출

(1) 생 브로콜리 새싹과 60℃ 열풍 건조한 브로콜리 새싹 10g과 70% ethanol를 사용하여 40℃에서 12시간씩 3회 반복에 걸쳐 추출하였다. 추출 한 시료를 여과(Whatman No.2) 후 40℃에서 감압농축(Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL의 농도로 조제한 후 0.45 $\mu$ m membrane filter 로 재 여과한 다음 각종 분석에 사용하였다.

### 나. 항산화 효과

(1) 항산화효과 측정은 ‘브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 항산화 효과’ 에서 사용한 방법과 동일하게 측정하였다.

## 6. 광원별 브로콜리 새싹 추출물의 건조방법별 항산화 효과

브로콜리 새싹은 식물공장에서 FLW(fresh leaf white lighting) 백색광을 조사한 브로콜리 새싹과 FLB(fresh leaf Blue lighting) 청색광을 조사한 브로콜리 새싹 RRM(fresh leaf Red lighting) 적색광을 조사한 브로콜리 새싹을 저온 열풍건조하여 70% ethanol를 사용하여 40℃에서 12시간씩 3회 반복에 걸쳐 추출하였다. 추출 한 시료를 여과(Whatman No.2) 후 40℃에서 감압농축(Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL의 농도로 조제한 후 0.45 $\mu$ m membrane filter 로 재 여과한 다음 각종 생리활성 분석에 사용하였다.

## 7. LED광원에 따른 수확시기별 Sulforaphane 함량분석

가. Sulforaphane 함량분석을 위해 sigma Co.에서 Sulforaphane(표준품)을 구입하여 10~1000 $\mu$ g/mL 농도로 표준곡선을 작성하여 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis Sulforaphane extracts

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm) Initial step - Acetonitrile / Water
Mobile phase	(20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	1 ml/min

## 8. Open column에 의한 브로콜리 새싹의 수율, 활성 및 설포라판 함량 분석

70% 에탄올을 사용하여 브로콜리 저온 열풍 건조 추출물을 다공성 입자를 가진 HP-20 resin (H = 26, Ø = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)로 용출한 다음 수율, 생리활성 및 설포라판 함량 등을 분석하였다.

## 9. 브로콜리 항 헬리코박터 활성 및 유효성분 분리

다공성 입자를 가진 HP-20 (H = 26, Ø = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (20, 40%)로 용출한 용출분획물을 Sephadex LH-20. 4 x 50 cm, chloroform : methanol (10:0-0:10), methanol)의 조건에서 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수과장을 확인하였으며, 같은 과장의 분획 물은 합쳐 Fr. 1 - Fr. 8 까지 나누었다. 각각의 fraction을 HPLC( $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm; flow rate 0.8 ml/min; inject vol., 10  $\mu$ L; detector, 254 nm, 327nm)를 이용하여 분리정제 하였다.

## 10. 활성성분의 생리활성 효과

### 가. 추출

(1) 다공성 입자를 가진 HP-20 (H = 26, Ø = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (20, 40%)로 용출한 후, in vitro 상에서 브로콜리 항헬리코박터 활성이 가장 우수한 BHP-20 분획물과 생리활성이 우수한 BHP-40 분획물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 open column chromatography에 sephadex LH-20(H = 58, Ø = 1)을 4 x 50 cm까지 충진시키고, HP-20, HP-40 분획물중 2 g을 loading하였으며, 전개용매는 HP-20은 chloroform : Methanol (100 : 0 - 0 : 100), HP-40은 70% MeOH(100)을 사용하여 용출하였다. Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1)을 순차적으로 진행하여 최종적으로 HP-20은 8개의 subfractions를 분리하였고, HP-40은 3개의 subfractions를 분리하여 40℃에서 감압농축(Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL의 농도로 조제한 후 0.45  $\mu$ m membrane filter로 제 여과한 다음 각종 생리활성 분석에 사용하였다.

(2) 항산화 효과 측정은 ‘브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 항산화 효과’ 에서 사용한 방법과 동일하게 측정하였다.

### (3) 항균활성 측정

(가) 실험에 사용한 균주는 *Bacillus subtilis*(ATCC 9372), *Staphylococcus aureus*(ATCC13301), *Salmonella Enteritidis*(ATCC13076), *Escherichia coli*(ATCC15489) 종을 각각 사용하였고 생육배지는 nutrient broth와 agar(Difco)를 사용하였다.

각 추출물의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk plate method)로 측정하였다. 즉 각각의 시료를 추출용액인 에탄올을 사용하여 5% 농도로 조절한 후 0.45  $\mu$ m membrane filter(Milipore Co., USA)로 여과 제균하고, 멸균된 paper disk(Toyoseisakusho, 8

mm, Japan)에 20  $\mu$ L씩 흡수시켰다. 추출용매인 에탄올을 완전히 휘발시킨 후 평판배지에 paper disk를 밀착시키고, 4°C냉장고에서 1시간 방치 후 30°C의 incubator에서 48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하여 항균력을 비교하였다.

#### 11. TLC 분리조건 확립

TLC 전개용매 및 기타시약은 특급 및 분석용 시약을 사용하였고, TLC plate는 Merck사의 precoated kieselgel 60 F<sub>254</sub> (layer thickness 0.25mm, 20×20 cm, Merck Art. No. 5715)를 사용하였다. 각각의 fraction은 ① CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH = 2 : 4 : 1 : 2 : 1 (v:v:v:v:v), ② CHCl<sub>3</sub> : Acetone : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH = 2 : 4 : 1 : 2 : 1 (v/v/v/v/v), ③ CHCl<sub>3</sub> : n -hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH = 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 1 (v/v/v/v/v/v) 조건에서 전개하여 확인하였으며, 물질은 UV 254 nm, 334 nm에서 확인하였고, 5%황산 용액을 도포 후 발색하여 확인하였다.

#### 12. HPLC분석 및 설포라판 함량 분석

활성물질 정량을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)조건은 다음 Table 2와 같다. mobile phase는 Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40), 25min Acetonitrile / Water (20/80) 에서  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> (3.9×300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 254, 327 nm에서 측정하였다.

Table 2. Operating conditions of HPLC for analysis Sulforaphane extracts.

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40) /Acetonitrile / Water (20/80)
Detector	UV 254, 327 nm
Flow rate	0.8 ml/min

### 13. 기기 분석

가. GC/MS(Gas Chromatography Mass Spectrometer; Thermo Finnigan AQA. Thermo Finnigan, USA)로부터 분자량을 확인 후, NMR(nuclear magnetic resonance spectrophotometer)을 통해 구조분석 하였다.

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR는 Varian Unity Inova 300MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>용매를 사용하였고, ppm 단위로 나타내었다.

Table 3. Operating conditions of GC/MS for analysis molecular weight of isolated and purified from broccoli sprouts extracts.

Items	Conditions
GC	Agilent 6890N(USA)
Column	HP 5MS, 0.5 mm * 30 m * 0.25 μm
Column temp	Held 200°C at 2 min, temperature programed at 10°C/min to 300°C and held at this point for a futher 30 min
Carrier gas	He
Flow rate	1.0 mL/min
Injector volume	1 μL
MASS	Agilent 5973i (USA)
MS quad	150°C
MS source	230°C

### 14. 브로콜리 새싹 추출물의 최소증식억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 및 항 Urease 활성도

#### 가. 시험물질

(1) 시험물질인 브로콜리 새싹 추출물(broccoli sprout extract, BSE)은 70% 에탄올로 추출하여 얻었으며(70BSE), 70% 에탄올 추출물을 다시 40%와 20%의 에탄올로 부분 정제한 40% (40BSE)와 20% 에탄올 추출물(20BSE)을 실험에 사용하였다. 비교물질로는 proton-pump inhibitor로써 위액분비를 억제하고 parietal cells을 보호하며 *H. pylori*

의성장을 억제하는 것으로 알려진 pantoprazole을 사용하였다.

#### 나. 실험동물

(1) *In vivo* *H. pylori*균체 제거효능 평가를 위한 실험동물은 대한바이오링크(충북 음성)로부터 25-27 g의 수컷 C57BL/6 마우스를 공급받아 마우스용 케이지에 2-3마리씩 수용하였다. *In vivo* 위액분비 억제효과를 평가하기 위한 실험동물은 200-220 g의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫드를 공급받아 랫드용 케이지에 3-4마리씩 수용하였다. 모든 동물은 약 1주일간 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다.

#### 다. *H. pylori* 배양 및 동정

(1) 실험에 사용한 *H. pylori* 균은 *in vitro* 실험에서는 표준균주인 ATCC 49503를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 분양받아 사용하였으며, *in vivo* 실험에서는 *H. pylori* SS1 균주를 사용하여 감염실험을 진행하였다. *H. pylori*의 배양에는 선택배지인 Brucella with 5% sheep blood (vancomycin 10 mg, amphotricin B 10 mg, cefsulodin 5 mg/L)와 brain heart infusion (BHI) broth를 사용하였으며, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>의 조건에서 37°C와 충분한 습도를 유지하면서 7일간 배양하였다. *H. pylori*는 광택이 있는 반투명의 미소집락을 형성하므로 1개의 검체당 의심되는 집락을 조균하여 2장의 혈액한천배지에서 순수배양하였다. 이 중에서 1장은 호기배양을, 나머지 1장은 분리배지에 배양함과 동시에 다시 미호기성 배양을 계속하여 2일간 배양 후 2장의 배지를 관찰하였다. 미호기성 배양을 한 배지에서 발육한 균을 Gram 염색을 포함한 생화학적 동정을 통하여 본 균주가 *H. pylori*임을 확인하였다.

#### 라. 브로콜리 새싹 추출물의 최소증식억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)

##### (1) *In vitro* 항균효능 평가

*H. pylori*에 대한 항균효능은 CLSI guide line에서 제시하는 표준시험법인 Agar-dilution method로 평가하였다. 먼저 *H. pylori*를 유지하거나 증식시키기 위해서 Brucella agar (1.5% agar, 10% FBS) plate에 접종한 후, 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, 100% 습도 환경에서 계대 배양하였다. Agar dilution test을 위하여 시험물질인 브로콜리 새싹 추출물(2 mg/mL - 4 µg/mL)을 연속희석하여 10% fetal bovine serum (FBS) 함유 Mueller-Hinton agar 배지를 제작한 후, McFarland를 사용하여 탁도 2.0에 맞추어 *H. pylori*를 접종하였다. 접종 후 72시간 동안 배양한 다음 균체 성장이 완전히 억제된 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 확인하였다.

##### (2) 브로콜리 새싹 추출물의 항 urease 활성도 억제효능

###### (가) *In vitro* urease 억제효능 평가

Urease 활성도 억제효능을 평가하기 위해, 1 x 10<sup>8</sup> CFU/mL의 *H. pylori* 균주에 브로콜리 새싹 추출물을 농도별(2 mg/mL-4 µg/mL)로 가하고, 50 rpm으로 교반하면서 6시간

동안 배양하였다. 50  $\mu$ L의 urease base (2% urea 및 0.03% phenol red 함유)를 가한 후 30분 동안 반응시킨 다음 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. Urease 활성도를 50% 억제하는 농도(median inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)를 제시하였다.

마. 브로콜리 새싹 추출물의 *In vivo H.pylori* 균체 제거효능 평가

(1) *In vivo H.pylori* 균체 제거효능 평가

12시간 동안 절식시킨 마우스에 *H.pylori*균이 쉽게 정착할 수 있도록 감염접종 직전 위 내 산도조절을 위해 0.25mL의 0.7M sodium bicarbonate를 경구투여 하였으며, 이어 *H.pylori* SSI 균주 (5 X 10<sup>9</sup> CFU/mL)를 saline에 현탁하여 0.2 mL/mouse씩 2일 간격으로 2회 경구 투여 하였다. 5일 경과 후, 무작위로 선별한 마우스에서 urease test를 응용한 CLO test kit를 이용하여 감염여부를 확인하였다. 이어 7일간 1일 2회씩 3단계용량 (10, 30 또는 100mg/kg)의 시험물질을 경구로 투여함과 동시에 2일 간격으로 *H.pylori* SS1 균을 3회 추가 접종하였다. 시험물질 마지막투여 3시간 후 절식시키고 ether 마취 하에 채혈한 다음, 위를 적출하여 일부는 CLO kit를 이용하여 균체의 잔존 여부를 판단하였으며, 일부는 10% 중성포르말린에 고정하여 위점막 염증반응, 산화적 손상 및 병리학적 변화 (histopathological findings)를 검사하였다.

시험물질에 대한 각 군의 조성은 Table 4와 같다.

Table 4. Test groups for the evaluation of *in vivo* anti-*H. pylori* effects of broccoli sprout extract

시험물질	시험군	동물수	용 량
Vehicle	용매대조군	6	10 mL/kg
20% Broccoli sprout extract (20BSE)	저용량군	6	10 mg/kg
	중간용량군	6	30 mg/kg
	고용량군	6	100 mg/kg
40% Broccoli sprout extract (40BSE)	저용량군	6	10 mg/kg
	중간용량군	6	30 mg/kg
	고용량군	6	100 mg/kg
70% Broccoli sprout extract (70BSE)	저용량군	6	10 mg/kg
	중간용량군	6	30 mg/kg
	고용량군	6	100 mg/kg
Pantoprazole (PTZ)	비교물질군	6	30 mg/kg

(2) *In vivo* 위액분비 억제효능 평가

수컷 랫드를 48시간 절식시킨 뒤, 3단계 용량(10, 30 또는 100 mg/kg)의 시험물질을 경구 투여 하였다. 비교물질군에는 pantoprazole (30mg/kg)을 1% carboxymethylcellulose (CMC)에 현탁하여 투여하였고, 음성대조군은 멸균한 1% CMC만을 투여하였다. 동물의 복부 검사돌기 아래 정중부를 절개하고, 유문부를 suture silk로 결찰한 뒤, 복부 절개창을 wound stapler로 봉합하고 동물을 회복시켰다. 시험물질 투여 6시간 후 동물을 ether로 마취하여 희생시킨 다음 위를 적출하여 위의 대만곡부를 절개한 후 위액을 pipette으로 회수한 다음 3,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 상등액을 채취하고 위액의 양과 pH를 측정하였다. 500  $\mu$ L의 위액을 취하여 1% phenolphthalein 지시약을 각각 10  $\mu$ L씩 가한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 유리염산량 (free HCl)과 총산도(total acidity)를 측정하였다. 위점막 손상정도를 검사하기 위하여 위점막 손상 부위의 길이를 측정하여 ulcer index를 산출하고, 조직병리학적 변화를 검사하였다. 시험물질에 대한 각 군의 조성은 Table 5와 같다.

Table 5. Test groups for the evaluation of inhibitory activity of broccoli sprout extracts on gastric secretion

시험물질시험군동물수용

Vehicle	용매대조군	8	10 mL/kg
20% Broccoli sprout extract (20BSE)	저용량군	8	10 mg/kg
	중간용량군	8	30 mg/kg
	고용량군	8	100 mg/kg
40% Broccoli sprout extract (40BSE)	저용량군	8	10 mg/kg
	중간용량군	8	30 mg/kg
	고용량군	8	100 mg/kg
70% Broccoli sprout extract (70BSE)	저용량군	8	10 mg/kg
	중간용량군	7	30 mg/kg
	고용량군	8	100 mg/kg
Pantoprazole (PTZ)	비교물질군	5	30 mg/kg

조직병리학적 검사로부터 위점막 손상의 정도는 two-step scoring system (length score and depth score)를 이용하였다. Length score는 관찰된 총 위점막의 길이에서 병변 부위를 백분율로 나타내어 0-3점(0=no lesion, 1=lesion involving 1-10% mucosa, 2=lesion involving 11-20% mucosa, 3=lesion involving >20% mucosa)으로 평가하였고, depth score는 병변이 나타난 부위를 병변의 깊이에 따라 0-3점(0=no



change, 0.5=superficial erosion, 1=ulcer involving one internal third of the mucosa, 2=ulcer involving two internal thirds of the mucosa, 3=ulcer involving almost entire mucosal thickness)으로 평가한 후, length score와 depth score를 합산하여 점막손상 정도를 평가하였다. 동물실험실의 환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ , 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Purina Rat Chow<sup>®</sup>를 바이오피아(경기도 군포)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

## 15. 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 위궤양 개선 효능 평가

### 가. 시험물질

시험물질인 브로콜리 새싹 추출물(broccoli sprout extract, BSE)은 70% 에탄올로 추출하여 얻었으며(70BSE), 70% 에탄올 추출물을 다시 40%의 에탄올로 부분 정제한 40%에탄올 추출물(40BSE)을 실험에 사용하였다. 또한 효능 비교를 위해 일본에서 시판되고 있는 브로콜리 새싹 추출물(J-BSE)을 OOO사(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였으며, 의약품으로 위액분비를 억제하고 parietal cells을 보호하는 것으로 잘 알려진 proton-pump inhibitor로서 pantoprazole을 양성 비교물질로 사용하였다.

### 나. 실험동물

위궤양 개선효능 평가를 위한 실험동물은 대한바이오링크(충북 음성)로부터 200-220 g의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫드를 공급받아 랫드용 케이지에 3-4마리씩 수용하였다. 모든 동물은 약 1주일간 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다.

동물실험실의 환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ , 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간, 조도 150-300 Lux로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Purina Rat Chow<sup>®</sup>를 바이오피아(경기도 군포)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 각각의 위궤양 실험에서의 시험물질에 대한 각 군의 조성은 Table 6과 같다.

Table 6. Test groups for the evaluation of antiulcer activities effects of broccoli sprout extract on gastric ulcer model

시험물질	시험군	동물수	용량
Vehicle	음성대조군	6	10 mL/kg
40% Broccoli sprout extract (40BSE)	저용량군	6	30 mg/kg
	중간용량군	6	100 mg/kg
	고용량군	6	300 mg/kg
70% Broccoli sprout extract (70BSE)	저용량군	6	30 mg/kg
	중간용량군	6	100 mg/kg
	고용량군	6	300 mg/kg
Japanese broccoli sprout extract (J-BSE)	저용량군	6	30 mg/kg
	중간용량군	6	100 mg/kg
	고용량군	6	300 mg/kg
Pantoprazole (PTZ)	비교물질군	6	30 mg/kg

다. Alcohol-induced gastric ulcer(알콜 유도 위궤양 모델)

수컷 랫드를 48시간 절식시킨 뒤, 3단계 용량(30, 100 또는 300 mg/kg)의 시험물질을 경구투여하였다. 비교물질군에는 pantoprazole (30 mg/kg)을 1% carboxymethylcellulose (CMC)에 현탁하여 투여하였고, 음성대조군에는 멸균한 1% CMC만을 투여하였다. 시험물질 투여 30분 후 위궤양을 유도하기 위하여 3 ml/kg의 ethanol을 경구 투여하였다.

Ethanol 투여 2시간 후 동물을 ether로 과마취하여 희생시킨 다음 위를 적출하여 대만곡부를 따라 절개하고 위 중량을 측정하였다. 위 내용물은 Kimwipes로 가볍게 문질러 제거하고 cork board에 펼쳐 위궤양(출혈부위) 병변을 digital camera로 촬영한 후 image analyzer로 면적(mm<sup>2</sup>)을 산출하였다.

Vascular leakage 분석을 위한 동물에 대해서는 희생시키기 30분 전 Evan's blue 용액(0.5 ml/rat)을 혈관 내로 주사하고, 희생시킨 후 복대동맥을 절단하여 충분히 방혈하였다. 위를 적출하여 병변촬영 및 중량측정을 시행하고 5 ml의 formamide에 24시간 이상 담그어 30분 동안 조직 내로 누출된 Evan's blue를 추출한 뒤 610 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선으로부터 누출된 Evan's blue를 정량하여  $\mu\text{g/g}$  tissue로 표시하였다.

위점막을 보호하는 mucus contents 분석을 위해서는 위궤양 병변 촬영 후 조직을 Alcian blue 용액(10 ml)에 2시간 동안 담그고, sucrose 용액으로 2회 세척하였다. Alcian

blue-mucus complex를 10 ml MgCl<sub>2</sub> 용액으로 30분씩 4회 용출한 다음 용출액 4 ml를 취하여 동량의 diethyl ether와 혼합한 후 세차게 vortexing하였다. 용출액을 원심분리(1,420 g × 10 min)한 다음 상등액을 취하여 604 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선으로부터 Alcian blue를 정량하여  $\mu\text{g/g}$  tissue로 표시하였다.

라. Indomethacin-induced gastric ulcer (Indomethacin 유도 위궤양 모델)

수컷 랫드를 48시간 절식시킨 뒤, 3단계 용량(30, 100 또는 300 mg/kg)의 시험물질을 경구투여하였다. 비교물질군에는 pantoprazole (30 mg/kg)을 1% carboxymethylcellulose (CMC)에 현탁하여 투여하였고, 음성대조군은 멸균한 1% CMC만을 투여하였다. 시험물질 투여 30분 후 위궤양을 유도하기 위하여 25 ml/kg의 indomethacin을 복강 내로 투여하였다.

Indomethacin 투여 6시간 후 동물을 ether로 과마취하여 희생시킨 다음 위를 적출하여 대만곡부를 따라 절개하고 위 중량을 측정하였다. 위궤양 병변, mucin contents, vascular Evan's blue leakage 등은 위에서 언급한 알콜 유도 위궤양 모델에서와 같은 방법으로 측정하였다.

마. Water-immersion restraint stress (WIRS)-induced gastric ulcer(수침 및 속박 stress성 위궤양 모델)

수컷 랫드를 48시간 절식시킨 뒤, 3단계 용량(30, 100 또는 300 mg/kg)의 시험물질을 경구투여하였다. 비교물질군에는 pantoprazole (30 mg/kg)을 1% carboxymethylcellulose (CMC)에 현탁하여 투여하였고, 음성대조군은 멸균한 1% CMC만을 투여하였다. 시험물질 투여 30분 후 restraint device에 보정하고 22°C의 수조에 xiphoid process까지 침수시켜 위궤양을 유도하였다.

침수 7시간 후 동물을 ether로 과마취하여 희생시킨 다음 위를 적출하여 대만곡부를 따라 절개하고 위 중량을 측정하였다. 위궤양 병변, mucin contents, vascular Evan's blue leakage 등은 위에서 언급한 알콜 유도 위궤양 모델에서와 같은 방법으로 측정하였다.

## 제 2 절 식물공장을 활용한 브로콜리 새싹으로부터 기능성 성분의 분리·동정 및 표준화

### 1. 실험재료 및 방법

가. 본 실험에 사용된 브로콜리 새싹은 식물공장에서 430nm 내지 460nm 파장 범위의 LED 청색광원을 받아 2일(암조건), 4일 동안 하루에 12시간씩 조사시켰으며, 적색광원은 650nm 내지 680nm 범위의 LED 광원, 적색+청색 LED광원, 일반 LED 광원을 사용하였다. 온도 범위는 21-23℃, 습도는 45-60%로 조절하여 브로콜리 새싹을 재배하였으며, 수확한 브로콜리 새싹은 수분이 많아 신선한 상태로 장기저장이 어려운 문제점이 있어 저온열풍건조기 60℃에서 24시간 동안 건조하였다. 전 처리된 브로콜리 새싹은 200 mesh로 분쇄하여 분석시료로 사용하였다.

### 2. 일반성분 및 이화학적 특성

#### 가. 일반성분 분석

시료의 일반성분은 AACC의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 수분함량(AACC 44-15a)은 105℃ 건조법, 조단백질은 Kjeldahl법(AACC 46-10), 조회분은 회화법(AACC 08-01)으로 측정하였다. 무기질 함량은 0.5g의 시료에 9mL HNO<sub>3</sub>, 1mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 후 Microwave digestion system (MPR-300/12S, Milestone Co., Italy)에서 산분해하여 전처리 한 시료를 증류수로 50 mL 정용 후 ICP (Inductively Coupled Plasma, Thermo Jarrell Ash Co., USA)로 분석하였고, 원소 Fe, K, Mg, Mn, Cu, Na, Zn의 ICP 표준시약(AnApex Co., Ltd, Korea) 으로 표준곡선을 작성하였다.

#### 나. 유리당 조성

유리당 분석은 Jeong 등의 방법으로 유리당 획분을 얻은 다음 0.22 μm membrane filter 로 여과한 후 Sep-pak C<sub>18</sub>로 색소 및 단백질 성분을 제거하여 HPLC (HPLC 1100 Series, Agilent, USA)로 분석하였다. Column은 Carbohydrate column (4.6×250 mm, Waters)을 사용하였고, solvent와 flow rate는 70% acetonitrile과 1.0 mL/min, detector는 RI로 하였고, column 온도와 injection volume은 각각 35℃와 20 μL였다. 표준물질로 사용한 glucose, fructose는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

#### 다. 클로로필 함량 측정

브로콜리 새싹 3g에 85% 아세톤 100 mL을 가하여 분쇄 후 3,000 rpm, 5분간 원심분리하여 얻은 잔사에 다시 85% 아세톤을 넣어 추출하는 과정을 3회 반복 실시 후 상등액 만

모아 500 mL로 정용하였다. 이 액 25 mL를 취하여 에테르 50 mL과 증류수 25 mL을 가하여 1분간 진탕, 에테르층을 취하는 조작을 3회 실시 후 sodium sulfate를 소량 가하여 수분을 제거한 다음 에테르로 100 mL 정용하여 660 nm, 642 nm에서 흡광도를 측정하여 총클로로필, 클로로필 a, 클로로필 b 함량을 측정하였다.

#### 라. 유기산

유기산 함량은 분쇄한 시료 3 g에 80% EtOH 60 mL를 가하여 6시간 동안 초음파 추출(3회)하였다. 추출한 시료액은 분석조건에 맞도록 희석한 다음 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridges (Waters, Milford, MA, USA)를 통과시켜 0.45 µm membrane filter (Woongki science Co., Ltd., Seoul, Korea)로 여과한 것을 HPLC (HPLC 1200 Series, Agilent, USA)로 분석하였다. 유기산 분석을 위한 HPLC 조건은 Capcell Pak C<sub>18</sub>-AQ (4.6×250 mm, 5 µm)칼럼을 사용하여 UV 210 nm에서 검출하였으며, 이동상으로는 0.1 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 용액을 1 mL/min의 속도로 이동시켰다. 분리된 피크는 유기산 표준물질 (Sigma)과 retention time을 비교하여 동정하고, 표준곡선으로부터 정량하였다.

#### 마. Vitamin A

비타민 A의 함량은 Beaulieu 등의 방법을 이용하여 HPLC (HPLC 1100 Series, Agilent, USA)로 분석하였다. 즉, 시료 10 g를 취해 에탄올 30 mL과 10% pyrogallol-에탄올 용액 1 mL를 가하여 잘 혼합하였다. 여기에 KOH용액 3 mL를 넣고 환류 냉각기를 장치한 후 끓는 물에서 30분간 가열 검화 시켰다. 실온으로 급냉시킨 다음 증류수 30 mL를 가해 석유 에테르 층을 분액한 후 증류수 페놀프탈레인 지시약이 정색되지 않을 때까지 세척하였다. 석유 에테르 층에 무수 황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 가해 탈수시킨 다음 rotary evaporator로 증류(45°C)하였다. 이때 얻어진 잔류물에 benzene : hexane (1:5)용액 10 mL를 가해 용해시킨 다음 이것을 시험용액으로 하였다. 이 시험용액 10 µL를 Novapak-Silica (3.9×150 mm, Waters) column 이 장착된 HPLC에 주입하여 453 nm에서 β-carotene 함량을 측정하였다. 이 β-carotene 함량으로부터 vitamin A 효력치(IU)는 다음과 같이 환산하였다. 즉 β-carotene 0.6 µg이 vitamin A 1 IU와 동가이며, 이 값의 1/3이 생물학적 효력을 나타내므로, 시료 100 g 중의 β-carotene 함량(µg)을 1.8로 나누어 vitamin A의 효력(IU)으로 표시하였다.

#### 바. Vitamin C

비타민 C 함량은 RLD(적색광원), BLD(청색광원), RBLD(적색+청색광원), WLD(일반광원)으로 채배한 브로콜리 새싹 각각의 시료 2 g에 20 mL의 10% metaphosphoric acid를 가하여 10분간 현탁시킨 후 적당량의 5% metaphosphoric acid를 넣어 균질화한 다음 균질화된 시료

를 100 mL mass flask에 옮기고 소량의 5% metaphosphoric acid액으로 용기를 씻은 후 mass flask에 합하여 100 mL로 정용한 다음 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하여 HPLC (Agilent 1200, Agilent, USA)로 분석하였다. Column은 shiseido C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Tokyo, Japan)를 사용하였고, solvent와 flow rate는 각각 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : acetonitrile (60 : 40) 과 1 mL/min으로 하였으며, UV파장과 injection volume은 254 nm와 20  $\mu\text{L}$ 였다. 표준곡선은 L(+)-Ascorbic acid (Shinyo pure chemicals Co., LTD., Japan)를 표준시약으로 사용하여 최종농도가 25, 50, 75, 100 ppm이 되도록 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.

#### 사. Vitamin E

비타민 E는 Ueda와 Igarash의 방법에 따라 HPLC (HPLC 1100 Series, Agilent, USA)로 분석하였다. 시험용액은 앞선 비타민 A와 동일한 방법으로 제조하였으며, 다만 석유 에테르 층을 rotary evaporator로 증류한 다음 잔류물에 hexane 1.0 mL를 가해 용해시켜 이것을 시험용액으로 하였다. 이 시험용액 1 mL에 tocopherol 표준용액 1 mL를 가한 다음, 그 중 10  $\mu\text{L}$ 를 Novapak-Silica (3.9×150 mm, Waters) column 이 장착된 HPLC에 주입하였으며, peak 면적법으로 계산하여 시료중의 tocopherol 함량을 정량하였다. Tocopherol 측정 시 사용한 이동상 용매 조건은 hexane : Isopropanol (98 : 2), 유속 : 0.5 mL/min, 검출기 UV, wavelength : 298 nm이었다.

### 3. 가공조건 및 최적 추출조건에 따른 브로콜리 새싹의 생리활성 효과

#### 가. 추출

(1) 생 브로콜리 새싹과 60°C 저온열풍 건조한 브로콜리 새싹, 진공 동결건조 시료는 -20°C에서 냉동 후, 진공 동결건조기(FD5508, Ilshin Lab Co., Korea)를 이용하여 -70°C에서 12시간 건조한 브로콜리 새싹 10g과 70% ethanol를 사용하여 40°C에서 12시간 씩 3회 반복에 걸쳐 추출하였다. 추출한 시료를 여과(Whatman No.2)후 40°C에서 감압농축 (Rotary evaporator EYELA N-1000, Japan)하였다. 농축된 시료는 methanol에 mg/mL의 농도로 조제한 후 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 재 여과한 다음 각종 분석에 사용하였다.

#### 나. 페놀성 화합물

(1) 추출물 0.1 mL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 2.0 mL 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 페놀성 화합물 정량을 위한 검량선은 catechin 을 이용하여 0~1.0 mg/mL의 농도로 작성하였으며, 모든 과정은 3회 반복하였다.

#### 다. SOD 유사활성 측정

(1) 시험관에 tris-HCl buffer 3 mL, 0.2 mM pyrogallol 0.2 mL, 추출물 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분 방치한 후, 1N HCl 1 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{SOD-liked activity (\%)} = 100 - \left( \frac{A}{B} \times 100 \right)$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

#### 라. 전자공여능 측정

(1) 추출물 0.5 mL에 0.15 mM DPPH 용액 3.5 mL 가하여 잘 섞은 후 517 nm에서 30분간 흡광도의 변화를 측정하여 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{EDA(\%)} = 100 - \left( \frac{A}{B} \times 100 \right)$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

#### 마. Hydroxyl radical 소거활성 측정

(1) 시험관에 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 추출물 0.1 mL와 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.3 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 mL를 가하고, 37°C incubator 에서 2시간 반응시킨 후 20% TCA (trichloroacetic acid)용액 1 mL를 가하여 100°C에서 15분간 가열한 후 급속히 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

#### 4. 브로콜리 추출물의 용매분획별 항산화 활성

브로콜리 새싹 70% EtOH 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol로 순차적으로 분획 후 3과 같은 방법으로 생리활성을 측정하였다.

#### 5. Sephadex LH-20에 의한 분획물의 항산화 활성

##### 가. 활성물질 분리

브로콜리 새싹 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol로 분획 후 활

성이 좋았던 ethyl acetate 층과 n-butanol 층을 이용하여, Sephadex LH-20. 4 x 50 cm, methanol(0-100)의 조건에서 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수과장을 확인하였으며, 같은 과장의 분획 물은 합쳐 LH1 - LH 5 까지 나누었다. 각각의 fraction을 HPLC( $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm; flow rate 0.8 ml/min; inject vol., 10  $\mu$ L; detector, 254 nm, 327nm)를 이용하여 분리정제 하였다.

#### 나. TLC분리

TLC 전개용매 및 기타시약은 특급 및 분석용 시약을 사용하였고, TLC plate는 Merck사의 precoated kieselgel 60 F<sub>254</sub> (layer thickness 0.25mm, 20×20 cm, Merck Art. No. 5715)를 사용하였다. TLC 전개조건은 (CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 2 : 4 : 1 : 2 : 1, v/v/v/v/v), (BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O - 4 : 1 : 2, v/v/v), (CHCl<sub>3</sub> : Hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 0.5, v/v/v/v/v/v)후 UV 254 nm, 334 nm에서 확인하였고, 5% 황산 용액을 도포 후 발색하여 확인하였다. 그리고 동일한 Rf 값을 갖는 spot의 분획은 합쳐 감압 농축하여 5개의 소분획물(LH1~LH5)을 얻었으며, 각종 항산화 활성 실험을 하였다.

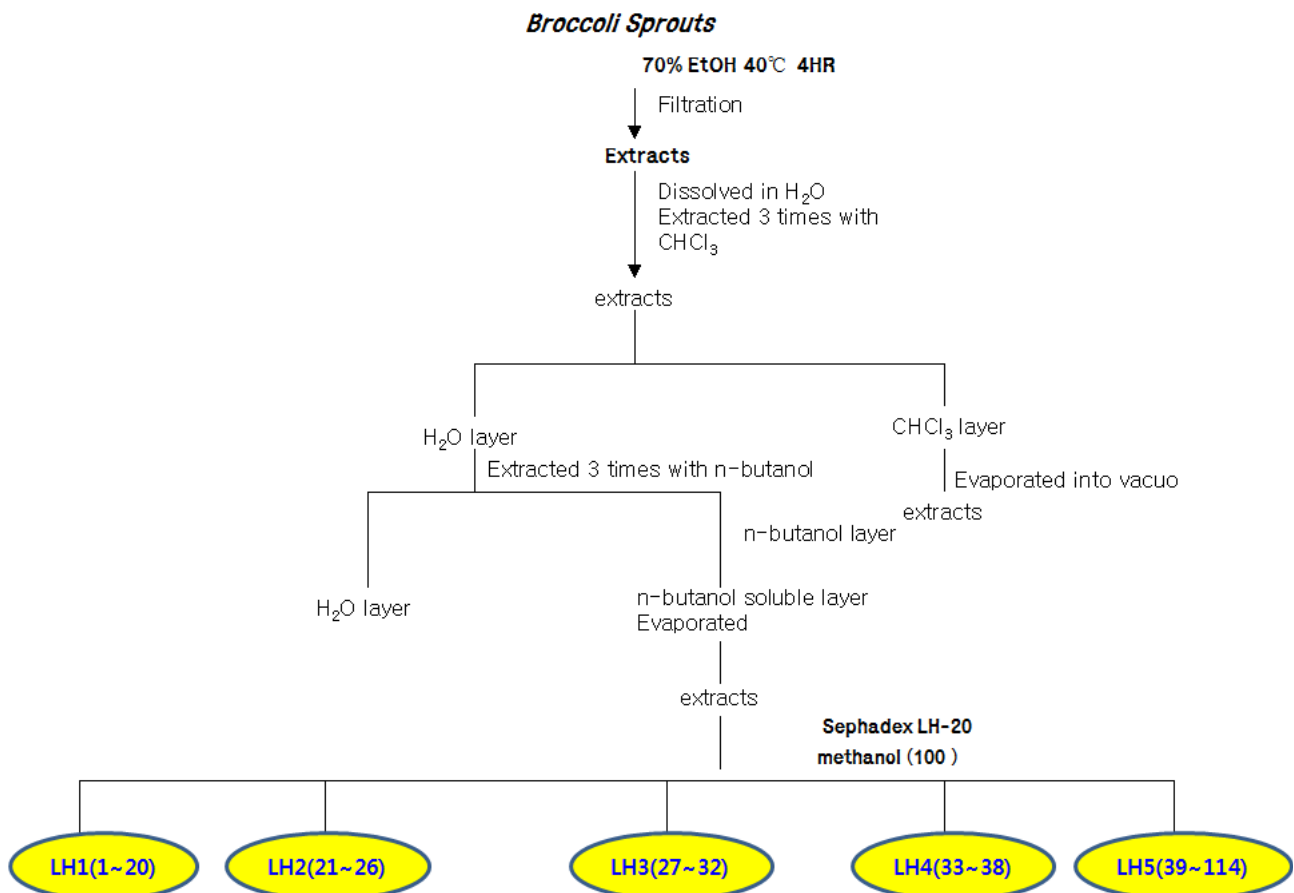


Fig. 1. Scheme of extraction and solvent fractionation of n-butanol extract from broccoli sprouts.



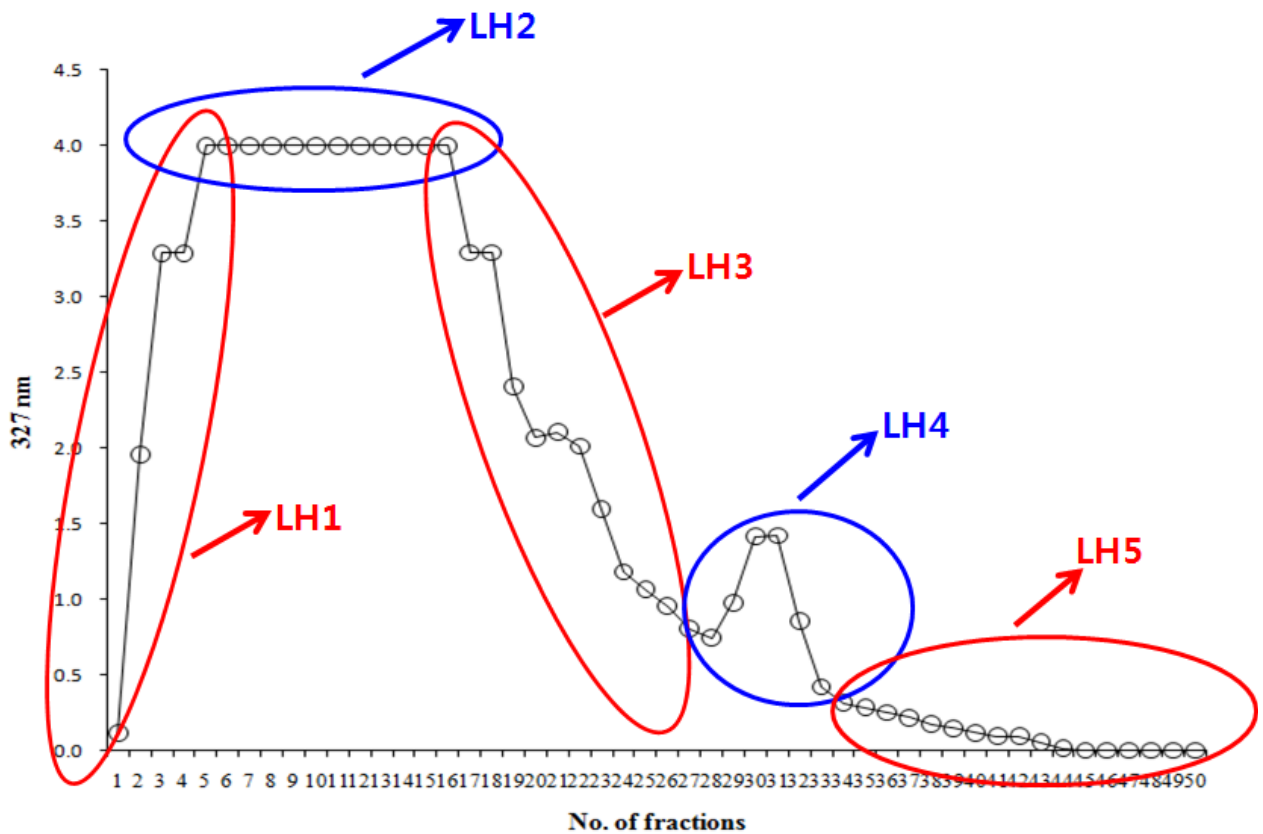


Fig. 2. The spectrum of Sephadex LH-20 subfractions by using spectrophotometer at 254 nm.

라. HPLC분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)조건은 다음 Table 7과 같다. mobile phase는 Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40), 25min Acetonitrile / Water (20/80) 에서  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (3.9×300 mm) 컬럼을 사용하였으며, 254, 327 nm에서 측정하였다.

Table 7. Operating conditions of HPLC for analysis Sulforaphane extracts.

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm) Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40) /Acetonitrile / Water (20/80)
Mobile phase	
Detector	UV 254, 327 nm
Flow rate	0.8 ml/min

## 6. 기기분석

분리 된 물질을 positive position에서 GC/MS (Gas Chromatograph Mass Spectrometer. Thermo Finnigan AQA. Thermo Finnigan, USA)로부터 분자량을 확인한 후, NMR(nuclear magnetic resonance spectrophotometer)을 통해 구조 분석 하였다.

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR는 Varian Unity Inova 400MHZ(Varian Inc., Palo Alto, CA., USA)로 측정 하였으며, CDCl<sub>3</sub>-d<sup>6</sup>용매를 사용 하였고, ppm 단위로 나타내었다.

Table 8. Operating conditions of GC/MS for analysis molecular weight of isolated and purified from broccoli sprouts extracts.

Items	Conditions
GC	Agilent 6890N(USA)
Column	HP 5MS, 0.5 mm * 30 m * 0.25 $\mu$ m Held 200°C at 2 min, temperature prograded at 10°C/min to 300°C and held at this point for a futher 30 min
Column temp	
Carrier gas	He
Flow rate	1.0 mL/min
Injector volume	1 $\mu$ L
MASS	Agilent 5973i (USA)
MS quad	150°C
MS source	230°C

## 제 3 절 연구수행 결과

### 1. 브로콜리 새싹의 이화학적 특성

#### 가. 일반성분

본 실험에 사용한 브로콜리 새싹의 일반 성분 분석 결과는 Table 9와 같다. 발아에 의한 영양소의 함량 변화를 평가할 때에는 실질적인 고형물의 변화가 중요하기 때문에 습량기준보다는 건량기준이 효과적이라고 보고되어있다. 본 연구에서는 습량기준과 건량기준을 분리하여 일반성분 및 영양성분 함량을 측정하였다. 수분함량은 FLR 86.01%, FLB 87.97%, FLW 90.85%, HDR 1.91%, HDB 0.95%, HDW 1.12%, FDR 1.28%, FDB 0.70%, FDW 1.29% 로 측정이 되었다. 생잎의 브로콜리의 수분함량은 85%이상으로 측정되었으며, 건조한 브로콜리의 경우 2%미만의 수분함량을 나타냈다. 조회분 함량은 FLW 0.80%, FLB 0.81%, FLR 0.62%, HDR 4.94%, HDW 5.20%, HDB 5.27%, FDW 9.28%, FDB 8.54%, FDR 8.52%로 생엽은 0.8%의 함량을 나타냈으며 처리방법에 따라 4.9~9.2% 함량으로 다양하게 분포하였다. 조지방 함량을 측정한 결과는 FLW 1.69%, FLB 1.31%, FLR 1.43%, HDR 7.48%, HDW 7.30%, HDB 4.11%, FDW 12.93%, FDB 11.22%, FDR 15.45%로 측정이 되었다. 건조방법별 브로콜리의 조단백 함량은 FLW 5.75%, FLB 5.24%, FLR 9.71%, HDR 13.20%, HDW 14.24%, HDB 16.05%, FDW 14.10%, FDB 18.31%, FDR 19.48%로 측정이 되었다. 같은 십자화과에 속하는 건조한 메밀새싹의 경우는 수분 2.84%, 조단백질 21.82%, 조지방 2.98%, 조회분 3.78%를 함유하고 있어 브로콜리 새싹에 비하여 조단백질 함량은 높았으나, 조지방 함량은 낮았다. 7일간 발아시킨 브로콜리 새싹의 경우 건량기준으로 수분 함량은 2.04%, 조단백질 22.04%, 조지방 12.80%, 조회분 6.25% 및 탄수화물 56.87% 함유하고 있다고 보고되어 RED광원을 쬐인 열풍건조한 브로콜리 새싹을 제외한 LED광원을 쬐인 브로콜리 새싹보다 조단백질 함량은 높았으나, 조지방, 조회분 함량은 비슷한 결과를 나타내었다. 일반적으로 채소류는 곡류의 조단백질 함량인 7~12%에 비하여 높은 함량을 보이지만 채소류의 단백질은 세포벽에 결합된 형태나 사람 체내에서 이용될 수 없는 형태로 결합되기 때문에 채소류를 통한 단백질 섭취량은 큰 의미가 없다고 한다. 조지방도 채소류가 곡류인 옥수수 3.8%와 쌀 1.3%에 비하여 높은 함량을 차지하고 있으며 발아채소에 함량이 높은 것을 감안할 때 지금까지 채소류의 지방 함량에 대해서는 비중 있게 연구된 바가 없고, 한국인의 1일 영양소 섭취기준과 관련하여 논의된 적이 없기 때문에 이들을 고려해야 할 것으로 사료된다.

Table 9. Proximate composition of broccoli sprouts according to the dehydration methods (%)

Sprout samples <sup>1)</sup>	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Carbohydrate
FLR	86.01	9.71	1.43	0.80	2.05
FLB	87.97	5.24	1.31	0.81	4.67
FLW	90.85	5.75	1.69	0.62	1.09
HDR	1.63	13.20	7.48	4.94	72.75
HDB	1.27	16.05	4.11	5.20	73.37
HDW	1.08	14.24	7.30	5.27	72.11
FDR	1.83	19.48	15.45	9.28	46.04
FDB	0.72	18.31	11.22	8.54	61.21
FDW	1.35	14.10	12.93	8.52	63.10

- <sup>1)</sup>FLR: fresh leaf red lighting
- FLB: fresh leaf blue lighting
- FLW: fresh leaf white lighting
- HDR: hot-air drying red lighting
- HDB: hot-air drying blue lighting
- HDW: hot-air drying white lighting
- FDR: freeze drying red lighting
- FDB: freeze drying blue lighting
- FDW: freeze drying white lighting

#### 나. 유리당 함량

6일간 발아시킨 브로콜리 새싹의 구성당 함량을 측정된 결과는 Table 10과 같다. LED 광원을 쬐인 브로콜리 새싹은 glucose, fructose 가 검출 되었다. glucose가 건조 전 0.22~0.29%, 건조 후 2.51~3.12%로 가장 많이 검출되었고, fructose는 건조 전 0.10~0.16%, 건조 후 1.16~2.04% 검출되었다. glucose 함량은 Blue 광원을 쬐인 열풍 건조한 브로콜리가 가장 높았으나, Red 광원과 차이가 작게 나타났으며, 그 외의 생, 동결건조 브로콜리 새싹에서는 RED 광원을 쬐인 브로콜리 새싹의 glucose 함량이 가장 높았다. fructose 함량은 Red 광원을 쬐인 브로콜리 새싹이 가장 높게 측정되었다. 이러한 결과로 볼 때, 브로콜리 새싹은 LED 광질의 종류에 따른 차이가 있는 것으로 사료된다. Lee 등에 의하면 브로콜리 새싹은 ribose, fructose 및 glucose 3종의 유리당이 검출되었고, 무순은 2종의 유리당인 fructose와 glucose, 1종이 이당류인 sucrose가 검출되었으며, 5일간 발아시킨 유채 새싹은 무순과 마찬가지로 fructose, glucose 및 sucrose 3종만이 검출되었다고 보고 하였다.

Table 10. Free sugar content of broccoli sprouts

(%)

Sprout samples <sup>1)</sup>	Glucose	Fructose
FLR	0.29	0.16
FLB	0.22	0.12
FLW	0.26	0.10
HDR	3.06	2.04
HDB	3.11	1.66
HDW	2.94	1.54
FDR	3.08	1.71
FDB	2.51	1.16
FDW	2.67	1.46

<sup>1)</sup>See the Table 9.

#### 다. 클로로필 함량

클로로필 a는 청록색, 클로로필 b는 황록색을 나타내며 그 비율은 3:1로 존재한다. LED 광원에 따른 브로콜리 새싹에 함유되어 있는 클로로필의 화학구조는 다른 물질과 결합하기 쉬워 염증을 발생시키는 물질을 흡착, 포획하여 염증을 중화시키고 해독력을 높여준다. 또한 클로로필의 핵 중심은 Mg, 혈색소의 핵 중심은 Fe이란 점 외에 이 둘은 같은 porphyrin 구조이며, 이는 동물이 엽록소를 섭취하여 소화될 때 소장 용모에 존재하는 Fe과 Mg가 치환되어 혈색소를 생성하는 조혈작용에 관여하는 것으로 보고되고 있다. LED 광원에 따른 브로콜리 새싹의 클로로필 함량을 분석한 결과(Table 11) Total 클로로필 함량은 FLR  $31.89 \pm 0.045\%$ , FLB  $41.04 \pm 0.009\%$ , FLW  $32.45 \pm 0.019\%$ , HDR  $9.8 \pm 0.002\%$ , HDB  $15.09 \pm 0.007\%$ , HDW  $19.44 \pm 0.042\%$ , FDR  $34.5 \pm 0.063\%$ , FDB  $27.75 \pm 0.04\%$ , FDW  $28.27 \pm 0.002\%$  로 측정되었으며 동결건조한 브로콜리 새싹보다 생잎 브로콜리가 높은 클로로필 함량을 나타내었다. Hwang 등은 건조온도가 상승할수록 클로로필이 감소된다고 하였는데 본 연구와 유사하였으며 건조온도가 낮을수록 좋은 품질의 건조채소를 얻을 수 있다고 보고하였다. 청록색을 나타내는 클로로필 a의 함량이 클로로필 b에 비해 높은 경향을 보였으며, 청록색을 나타내는 a 값과 총 클로로필 함량은 FLB에서 가장 높게 나타났다. 또한 브로콜리 새싹의 클로로필 함량은 시금치 총 클로로필 9.47%, 클로로필 a 6.98%, 클로로필 b 2.49%, 미나리 총 클로로필 6.12%, 클로로필 a 4.62%, 클로로필 b 1.53%보다 높았다.

Table 11. Chlorophyll contents of broccoli sprouts

Sprout samples <sup>1)</sup>	<i>Citric (%)</i>		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total
FLR	20.55±0.052	11.34±0.007	31.89±0.045
FLB	27.45±0.011	13.58±0.02	41.04±0.009
FLW	20.99±0.007	11.46±0.012	32.45±0.019
HDR	6.9±0.003	2.89±.002	9.8±0.002
HDB	11.1±0.001	3.99±0.008	15.09±0.007
HDW	14.12±0.026	5.32±0.016	19.44±0.042
FDR	25.53±0.1	8.97±0.037	34.5±0.063
FDB	20.94±0.068	6.81±0.028	27.75±0.04
FDW	20.91±0.007	7.36±0.009	28.27±0.002

<sup>1)</sup>See the Table 9.

#### 라. 유기산 분석

LED 광원으로 처리한 브로콜리 새싹의 유기산은 citric acid, malic acid, oxalic acid 가 검출되었으며, LED 광원에 따라 각각 달랐다 (Table 12). citric acid, malic acid는 모든 시료에서 검출되었으며, lactic acid는 검출되지 않았고, oxalic acid 는 부분검출 되었다. citric acid는 241.48-3292.59 mg%로 건조방법별 차이는 나타났으나 blue광원에서 가장 높게 측정되었다. malic acid는 183.76-2477.48 mg%로 red광원에서 가장 높은 함량을 보였으며, 건조방법별로 차이를 나타냈다. oxalic acid 는 42.14-331.31 mg%로 Blue광원에서 가장 높게 측정되었으며 열풍건조에서는 검출이 되지 않았다. 휘발성을 갖는 oxalic acid는 Ca과 불용성염을 형성하여 Ca의 체내 이용률을 저하시키는 유기산으로 알려졌다. 열풍건조 브로콜리 새싹에서 검출되지 않았다. 이는 건조과정에서 산화작용을 통한 저분자화로 그 함량이 감소하거나 휘발된 것으로 사료된다. 같은 십자화과 채소인 무순도 oxalic acid가 검출되지 않았으며, 무순에 함유된 유기산은 levulinic acid, malic acid, citric acid 순이었다. 메밀 싹의 경우는 유기산 중 oxalic acid 함량이 가장 많이 검출되었고, 다음으로 citric acid, maleic acid, succinic acid, malic acid, acetic acid, formic acid 순으로 검출되었다.

Table 12. Organic acids contents of broccoli sprouts

(mg%)

Sprout samples <sup>1)</sup>	Citric acid	Malic acid	Lactic acid	Oxalic acid
FLR	283.96	183.76	N.D <sup>2)</sup>	30.92
FLB	241.48	152.46	N.D	42.14
FLW	74.57	179.5	N.D	23.13
HDR	908.87	834.58	N.D	N.D
HDB	1,136.98	514.71	N.D	N.D
HDW	1,132.59	716.49	N.D	N.D
FDR	2,692.63	2,477.48	N.D	293.81
FDB	3,292.59	2,291.86	N.D	331.31
FDW	2,653.52	1,803.12	N.D	271.73

<sup>1)</sup>See the Table 9.<sup>2)</sup>Not detected

#### 마. 무기질 조성

LED 광원에 따른 브로콜리 새싹의 무기질 함량은 Table 7과 같다. 총 7종의 무기질 성분이 검출되었다. 브로콜리 새싹의 Fe, K, Mg, Mn, Cu, Na, Zn 함량을 ICP를 사용하여 측정한 결과는 Table 13 과 같다. 동결건조한 브로콜리 새싹의 무기질조성이 가장 높게 측정되었다. Fe, Mn, Cu, Zn의 함량은 10mg/100g 이하로 매우 낮게 측정되었다. K 73.55-669.04mg/100g, Mg 49.71-585.35mg/100g, Na 27.02-394.13mg/100g 이었고, Kim 등의 다 자란 브로콜리 잎 즙의 경우 무기질 함량은 K, Ca, Na, Mg, Mn, Fe, Zn, Mn, Se 순으로 나타나 LED 광원을 쬐인 브로콜리 새싹과 브로콜리 잎의 무기질 성분 및 함량에 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

Table 13. Mineral contents of broccoli sprouts

(mg%, dry basis)

Sprout samples <sup>1)</sup>	Fe	K	Mg	Mn	Cu	Na	Zn
FLR	1.09	90.77	55.77	0.09	0.28	31.36	0.80
FLB	1.14	92.88	58.36	0.03	0.21	29.34	0.74
FLW	0.91	73.55	49.31	N.D <sup>2)</sup>	0.14	27.02	0.75
HDR	5.79	518.67	339.02	2.63	0.76	94.03	6.95
HDB	5.88	427.71	281.85	2.40	0.79	83.21	8.43
HDW	5.53	433.09	360.08	2.53	0.79	117.44	6.16
FDR	4.1	669.04	585.35	2.45	1.99	394.13	6.6
FDB	4.1	607.3	569.96	2.41	1.59	376.97	6.4
FDW	4.03	634.92	579.22	2.4	1.98	383.17	6.72

<sup>1)</sup>See the Table 9.<sup>2)</sup>Not detected

#### 바. 비타민 A, C, E 함량

비타민 A, C 및 E 함량을 측정된 결과는 Table 14와 같다. 비타민 A의 함량은 FLR 212.62 $\mu$ gRE/100g, HDR 860.62 $\mu$ gRE/100g, FDR 4633.1 $\mu$ gRE/100g 로 광원별 함량에서 Red광원을 쬐인 브로콜리 새싹에서 가장 높은 함량을 보였으며, 브로콜리 새싹 처리방법별에서 함량의 차이를 나타냈다. 비타민 C의 경우 생잎(FL)브로콜리에서는 측정이 되지 않았고 HDR 134.57mg/100g, HDB 137.05mg/100g, HDW 119.87mg/100g, FDR 136.96mg/100g, FDB 84.19mg/100g, FDW 8.53mg/100g으로 열풍건조 브로콜리가 높게 측정되었다. 비타민 E 경우는 0.93-16.83 IU의 함량을 나타내었으며, 동결건조 브로콜리에서 가장 높게 나타났다. 유채 싹의 경우 비타민 E가 0.37 mg% 함유되어 있는 것으로 보고되어 브로콜리 새싹이 지용성 항산화 비타민인 비타민 E 함량이 유채 싹 보다 3~4배 이상 높게 나타났다. 또한 순무 싹 분말의 비타민 함량 분석 결과 비타민 A와 E의 함량은 각각 0.09 mg%와 30.6 mg% 이었다. 브로콜리 싹의 경우 비타민 A와 E의 함량은 0.06 mg%, 0.82 mg%로 LED광원을 쬐인 브로콜리 새싹이 순무 싹이나 브로콜리 싹, 유채 싹에 비하여 지용성 항산화 비타민인 비타민 E 함량이 월등히 높은 것으로 나타났다.



Table 14. Contents of Vitamin A, C, E in broccoli sprouts

Sprout samples <sup>1)</sup>	Vitamin A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ )	Vitamin C ( $\text{mg}/100\text{g}$ )	Vitamin E ( $\text{IU}/100\text{g}$ )
FLR	212.62	N.D <sup>2)</sup>	1.27
FLB	295.3	N.D	1.34
FLW	306.28	N.D	0.93
HDR	860.62	134.57	1.44
HDB	432.48	137.05	1.11
HDW	640.25	119.87	1.31
FDR	4633.1	136.96	10.14
FDB	1998.28	84.19	13.44
FDW	3446.04	8.53	16.83

<sup>1)</sup>See the Table 9.

<sup>2)</sup>Not detected

## 2. 가공조건(가공적성)에 따른 항산화 효과

가공조건에 따른 브로콜리 새싹의 항산화 효과는 Fig. 3. 과 Table 15와 같다. 총 페놀 함량은 생 브로콜리 1.51 mg/mL, 저온 열풍 건조 브로콜리 1.6 mg/mL, 동결건조 브로콜리 1.46 mg/mL로 측정되었으며, SOD 유사활성은 생 브로콜리 37.99%, 저온 열풍 건조 브로콜리 63.04%, 동결건조 브로콜리 48.22%로 나타났다. 전자공여능은 생 브로콜리 29.15%, 저온열풍건조 브로콜리 38.81%, 동결건조 브로콜리 15.02% 였으며, Hydroxyl radical 소거능은 생 브로콜리 61.37%, 저온열풍건조 브로콜리 67.76%, 동결건조 브로콜리 60.58%로 나타났다. Kim 등에 의하면 끓는 물이나 스팀과 같은 조리가공 조건에 따른 항산화 능력과 설포라판(Sulforaphane) 함량의 변화를 비교 연구한 결과 끓는 물에서 조리한 경우, 라디칼 소거 능력이 감소하고, 설포라판 함량이 급격히 감소하였다고 보고하여 항산화 능력은 가공 조건에 영향을 받을 것이라 사료된다.

김 등은 삼백초 건조방법별 연구에서 총 페놀성 화합물 함량은 동결건조에서 가장 높았고, 열풍건조 후 볶음과 증자처리를 함으로써 감소하였다고 보고하였다. 본 연구 결과에서 총 페놀성 화합물은 저온 열풍 건조 방법으로 가공한 브로콜리 새싹이 가장 높아 상반된 결과를 보였

다. 박 등에 의하면 보리 잎을 생잎, 열처리 후 건조, 진공 동결건조, 전자레인지 건조방법으로 건조하였을 때 총 페놀함량은 건조방법별 함량에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였고, 총 페놀함량은 건조를 통하여 45-55.3% 감소하였다고 보고하였다. Garcia-Viguera 등은 데치는 과정을 통해 20-30% 정도의 항산화성분이 감소하였으며, 냉동 저장에 있어서도 적은 양이지만 손실이 생긴다고 보고하였다. 또 김 등에 의하면 동결건조한 방아풀의 전자공여능이 유의적으로 높게 나타났다. 그러나 본 연구 결과 저온 열풍 건조에서 총 페놀함량, SOD 유사활성, 전자공여능(EDA), Hydroxyl radical 소거능이 모두 높게 나타나 상반된 결과를 보였다. Donnelly 등은 페놀성 화합물이 SOD 유사활성을 갖는다 하였고, H대 등은 한국에서 나물용으로 많이 이용되는 11종류의 식물에 대해 총 페놀 화합물 함량과 전자공여능을 조사한 결과 총 페놀 화합물 함량이 높은 것은 전자공여능도 높다고 보고하였는데, 본 연구에서는 총 페놀화합물이 높은 저온 열풍 건조에서 SOD 유사활성이 가장 높게 나타났으나, 다음으로 총 페놀 함량이 높은 생 브로콜리보다 동결 건조한 브로콜리 새싹이 SOD 유사활성이 높아 총 페놀 함량이 항산화 효과와 반드시 비례하지 않았다. 이는 브로콜리에 페놀계 물질 이외에도 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase 등의 항산화 효소와 비타민 C, E,  $\beta$ -carotene, carotenoids, flavonoids 등의 다양한 항산화 물질이 존재하는데, 이물질들은 가공 조건에 따라 함량이나 활성에 영향을 받기 때문으로 사료된다.

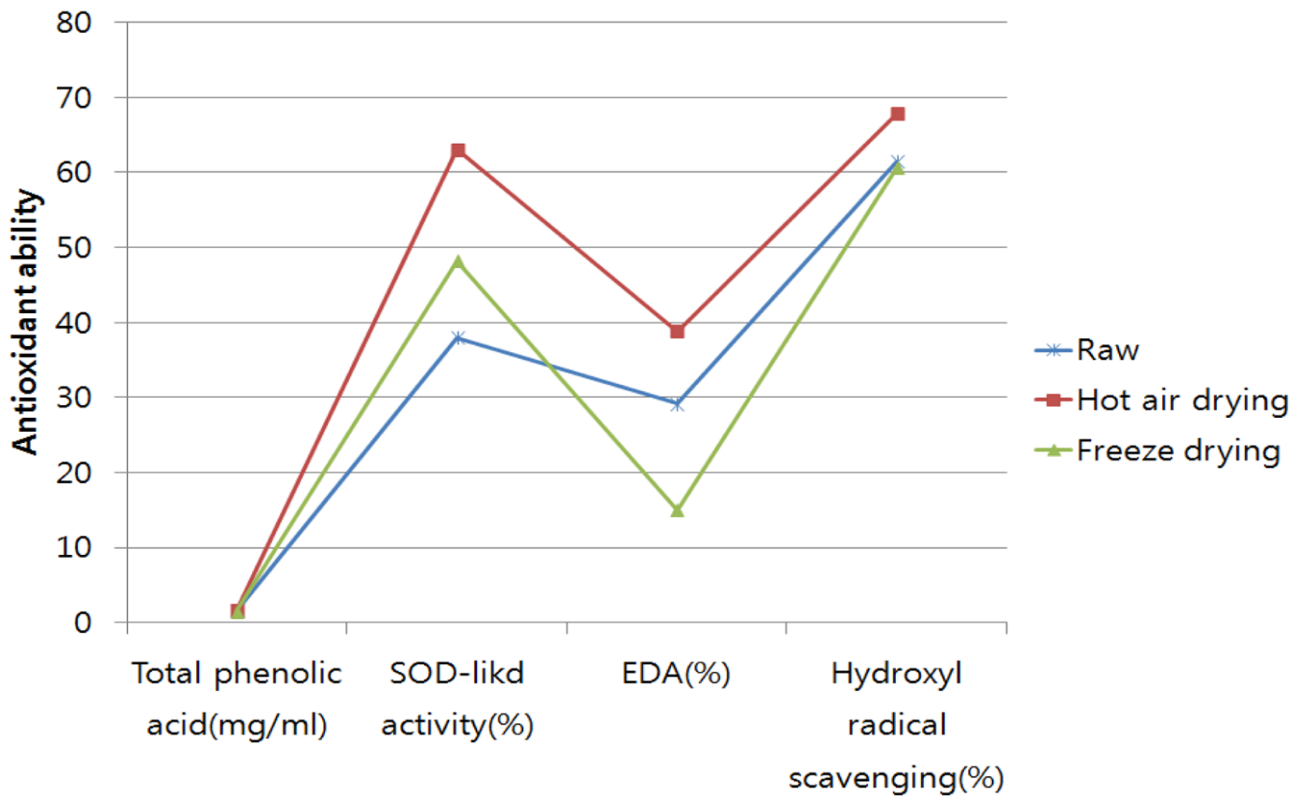


Fig. 3. Antioxidant effects due to conditions of productivity

Table 15. Antioxidantal effects due to photosynthesis.

Sprout sample1)		Total phenolic acid (mg/mL)	SOD-liked activity (%)	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging (%)
Red lighting	RAW	1.43±0.03	33.81±0.32	29.11	63.21±0.77
	HAD	1.47±0.01	59.63±0.52	32.02	66.70±0.00
	FD	1.42±0.00	55.03±0.08	14.13	58.52±0.62
Blue lighting	RAW	1.61±0.02	40.56±0.04	29.63	65.7±0.59
	HAD	1.77±0.01	61.8±0.38	46.29	68.78±0.14
	FD	1.52±0.01	38.87±0.04	16.53	62.37±2.14
White lighting	RAW	1.50±0.00	39.6±0.30	28.72	55.19±4.14
	HAD	1.56±0.00	67.79±0.07	38.12	67.79±0.14
	FD	1.44±0.00	50.77±0.17	14.41	60.84±0.13

1) RAW : Raw broccoli sprout, HAD : Hot air drying broccoli sprout, FD : Freeze drying broccoli sprout

### 3. 브로콜리 추출물의 분획별 항산화 활성

#### 가. 용매별 분획에 따른 항산화 효과

발아채소는 본잎이 나오기 전의 어린 떡잎상태일 때가 유효한 생리활성 물질의 생성량이 최대가 되며 완전히 자란 식물에 비하여 4-100배 이상 많이 함유하고 있다. 일반적으로 폴리페놀과 플라보노이드 등과 같은 페놀계물질은 식물에 존재하는 대표적인 항산화 물질이며, radical 소거활성 및 금속이온 안정화 효과가 우수하다고 알려져 있다. 브로콜리 분획 추출물의 총 페놀 함량을 측정된 결과 EtOA (3.03 mg/mL) > BuOH (2.49 mg/mL) > CHCl<sub>3</sub> (1.62 mg/mL) > H<sub>2</sub>O (1.15 mg/mL) > Hexane (1.05 mg/mL) 순으로 나타났으며, SOD 유사활성은 EtOA (94.91%) > BuOH (91.69%) > CHCl<sub>3</sub> (71.27%) > H<sub>2</sub>O (50%) > Hexane (25%)의 활성을 보였으며, 전자공여능은 EtOA (92.64%) > BuOH (82.82%) > CHCl<sub>3</sub> (42.86%) > H<sub>2</sub>O (21.06%) > Hexane (17.07%) 로 나타났고, Hydroxyl radical 소거능은 BuOH (91.08%) > EtOA (89.59%) > H<sub>2</sub>O (87.54%) > Hexane (86.10%) > CHCl<sub>3</sub> (85.76%) 순이었으며, Hydrogen radical 소거능은 H<sub>2</sub>O (71.40%) > BuOH (71.37%) > Hexane (70.66%) > EtOA (69.11%) > CHCl<sub>3</sub> (55.24%)의 소거능을 보였다. 일반적으로 ethyl acetate 또는 butanol로 추출하면 극성이 큰 플라보노이드나 배당체 등이 추출되는 것으로 알려졌다. Lee 등은 올리브 잎의 생리활성 연구에서 butanol 분획 물에서 총 플라보노이드, 총 페놀 함량이 높게 측정되었다고 보고하였고, 이결과는 본 실험의 결과와 일치한다. 브로콜리 분획물들의 SOD 유사활성 및 hydroxyl radical 소거 능 또한 매우 높았고, 분획 물에 따라 약간의 차이를 나타내었으나, EDA(전자공여 능)이 다른 분획 물보다 ethyl acetate와 butanol에서 높게 측정되었다. 따라서, 활성이 대체적으로 높은 Butanol 분획 층을 이용하여 open column chromatography, TLC, HPLC를 통해 활성 물질을 분리·정제 하였다.

Table 16. Antioxidant activity of broccoli sprout extracts fractionated from each solution.

	Total phenolic acid contents (mg/mL)	SOD-liked activity	EDA	Hydroxyl radical scavenging (%)	Lecithin oxidation
CHCl <sub>3</sub>	1.62±0.006	71.27±0.579	42.86	85.76±0.127	55.24±0.398
Hexane	1.05±0.002	24.26±0.520	17.07	86.10±0.312	70.66±0.110
EtOA	3.03±0.002	94.91±0.122	92.64	89.59±0.026	69.11±0.050
BuOH	2.49±0.006	91.69±0.293	82.82	91.08±0.435	71.37±0.169
Water	1.15±0.002	50±1.414	21.06	87.54±0.320	71.40±0.139

#### 4. Sephadex LH-20에 의한 분획물의 항산화 측정

브로콜리 새싹 추출물로부터 항산화 활성이 높았던 n-butanol 층을 이용하여 정제된 물질을 동정하기 위해 Sephadex LH-20, Methanol (100)조건에서 LH1 - LH5까지의 subfractions을 얻어 각종 생리활성 실험에 사용하였다.

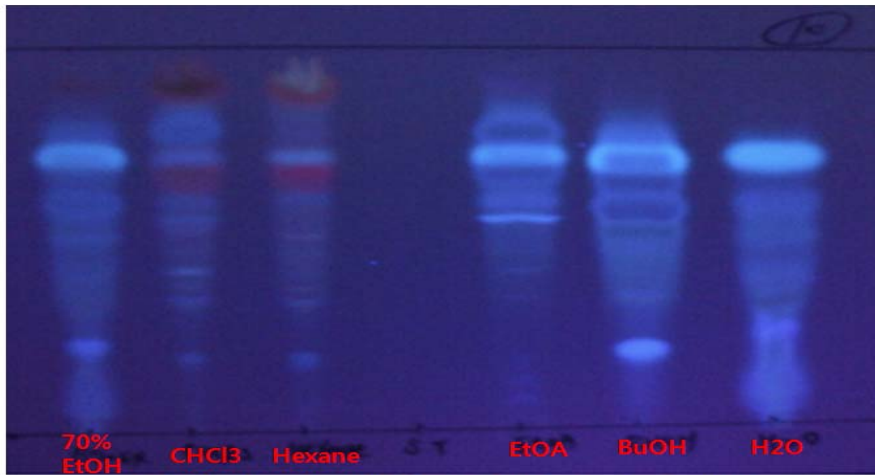
브로콜리 정제 추출물의 총 페놀함량을 측정한 결과, LH3 (3.27 mg/mL) > LH4 (3.23 mg/mL) > LH2 (2.66 mg/mL) > LH1 (2.29 mg/mL) > LH5 (2.03 mg/mL) 순으로 나타났고, SOD 유사활성은 LH2 (96.90%) > LH3 (95.59%) > LH1 (95.34%) > LH4 (94.90%) > LH5 (94.04%)의 활성을 보였으며, 전자공여능은 LH2 (90.70%) > LH3 (87.22%) > LH4 (83.43%) > LH1 (81.08%) > LH5 (64.19%)로 나타났고, Hydroxyl radical 소거능은 LH2 (96.76%) > LH3 (96.62%) > LH1 (96.45%) > LH4 (96.42%) LH5 (96.31%)의 소거능을 보였다. 실험결과 페놀화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있다는 보고와 비교하여 볼 때, 총 페놀화합물의 함량이 높은 LH3 정제 추출물이 대체적으로 뛰어난 항산화 효과를 보였다.

Table 17. Antioxidant activity contents of each fractions purified from glass column chromatogram in broccoli sprouts.

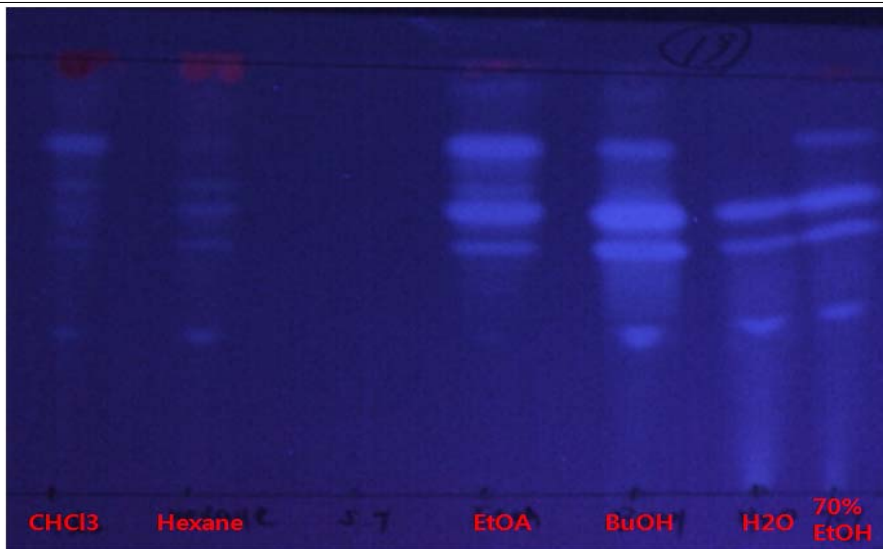
	Total phenolic acid contents (mg/mL)	SOD-liked activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
LH1	2.29±0.002	95.34±0.273	81.08	96.45±0.044
LH2	2.66±0.006	96.90±0.184	90.70	96.76±0.076
LH3	3.27±0.008	95.59±0.211	87.22	96.62±0.036
LH4	3.23±0.009	94.90±0.330	83.43	96.42±0.004
LH5	2.03±0.005	94.04±0.410	62.05	96.31±0.004

#### 5. TLC 분리

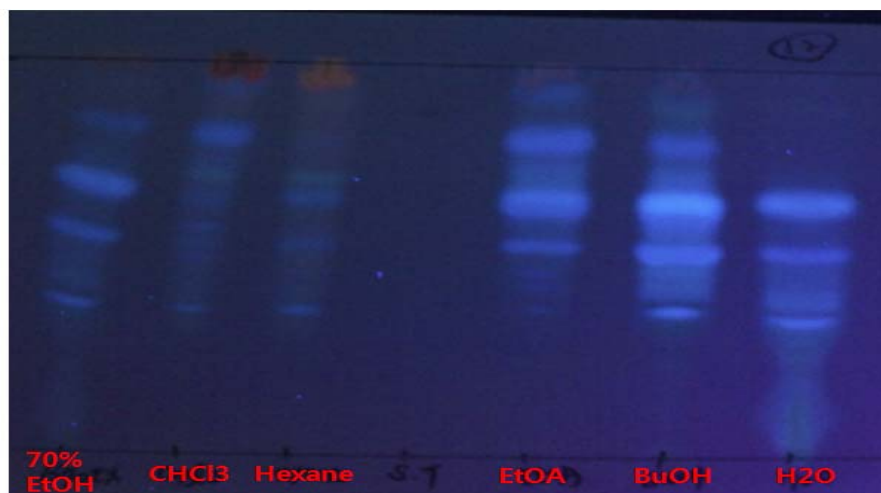
TLC 분석은 항산화 활성이 높았던 EtOA, BuOH 분획 추출물을 가지고 BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2, v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 0.5 v/v/v/v/v/v), CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH - 2 : 4 : 1 : 2 : 1, (v/v/v/v/v/v)을 전개 용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 각각 발색하여 spot을 확인 하였다. TLC 결과 모든 분획 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질을 확인할 수 있었다. 확인된 물질이 항산화 활성 및 헬리코박터-위궤양 개선에 효과가 있는 미지의 물질일 것으로 사료되어진다.



Mobile Phase (BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O – 4 : 1 : 2, v/v/v)



Mobile Phase (CHCl<sub>3</sub> : Hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH – 4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 0.5, v/v/v/v/v/v)



Mobile Phase (CHCl<sub>3</sub> : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH – 2 : 4 : 1 : 2 : 1, v/v/v/v/v)



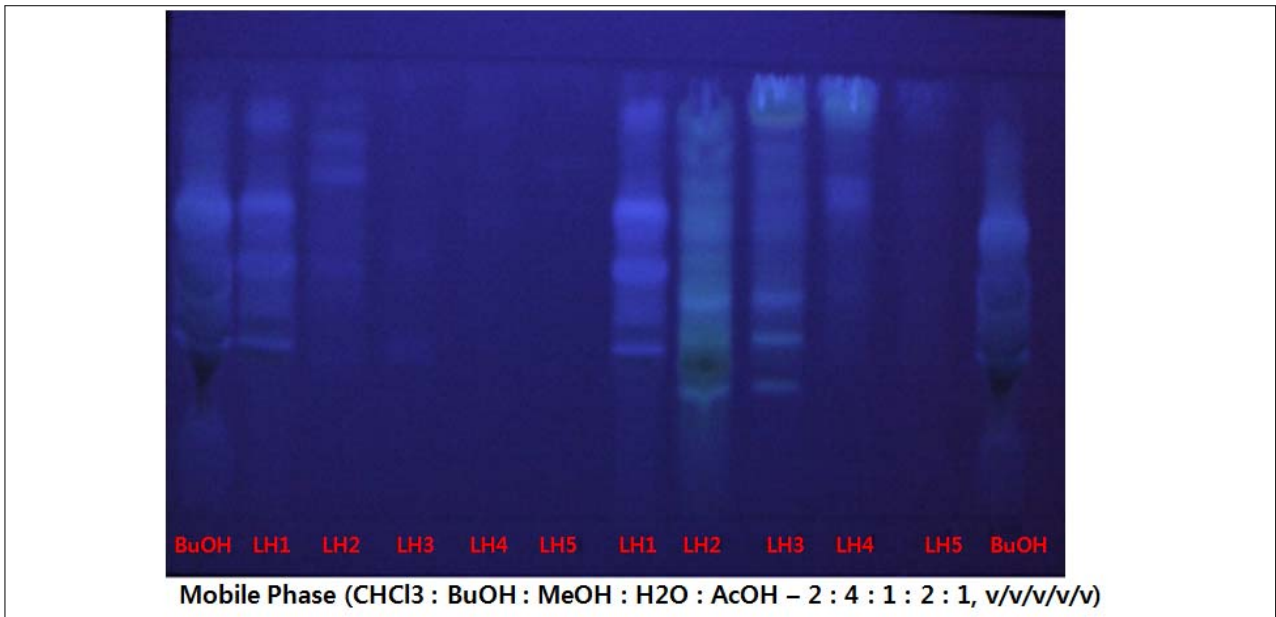
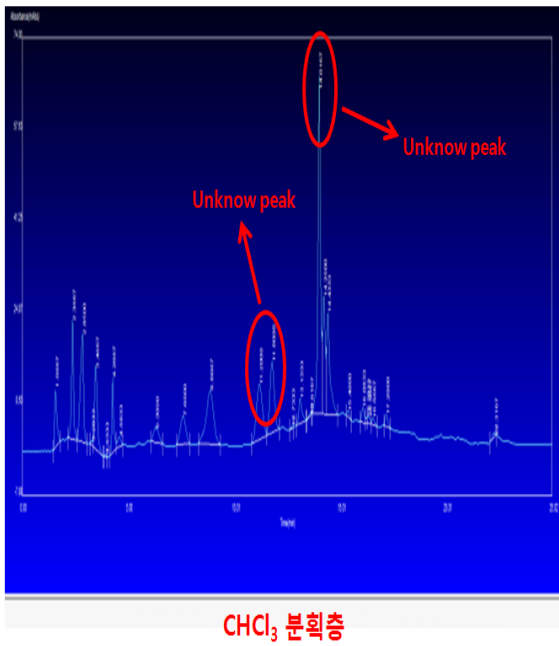


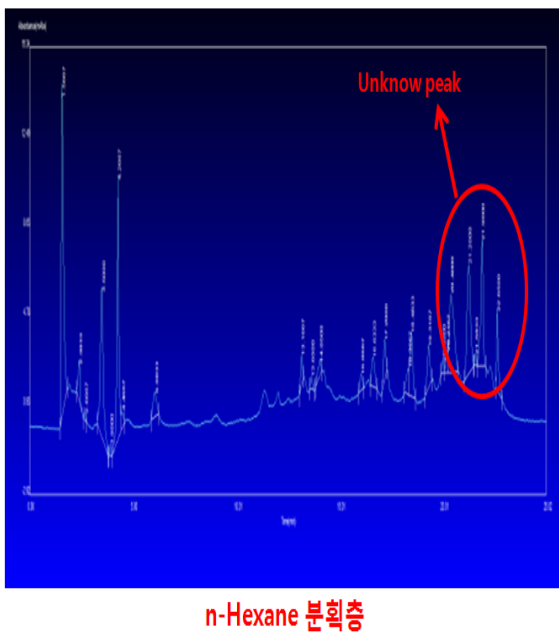
Fig. 4. TLC patten of isolated fractions from n-butanol extract of broccoli sprouts.

#### 6. HPLC 분석 및 Sulforaphane 함량 분석

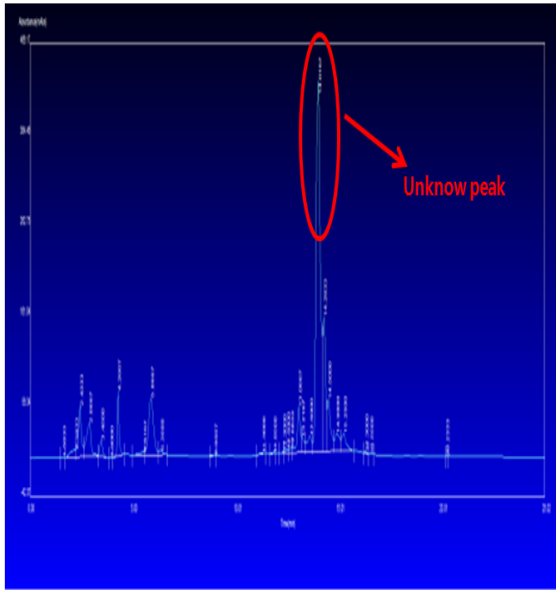
HPLC 분석 결과, 각 분획추출물에서 같은 시간대에 동일 피크가 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 이들 물질은 TLC 결과, 각 분획 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질과 동일할 것으로 추정되어진다. 현재 이물질을 분리·동정 중에 있으며, 좀 더 자세한 연구가 지속적으로 수행되어져야 할 것으로 사료된다.



Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min

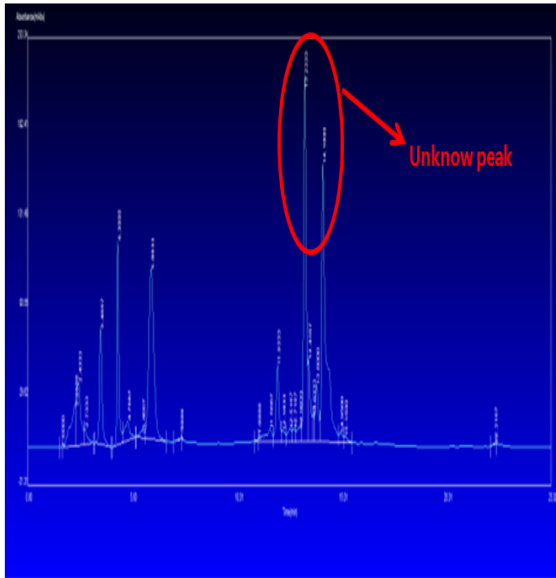


Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



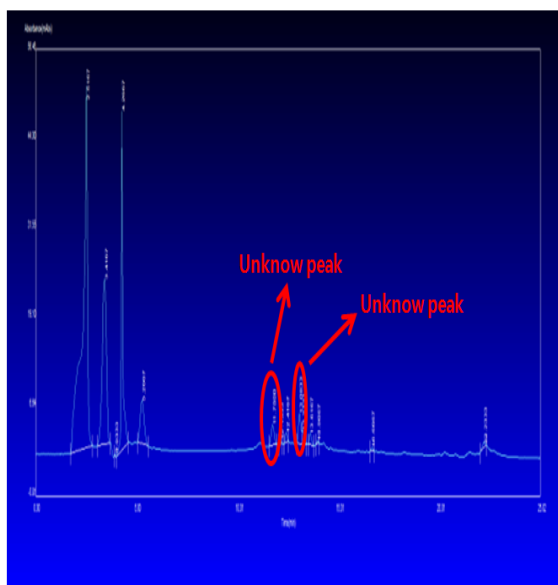
EtOA 분획층

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



BuOH 분획층

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



H<sub>2</sub>O분획층

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9×300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min

Fig. 5. HPLC analysis of each layer from broccoli sprouts.

브로콜리 새싹 추출물의 용매 분획별 설포라판 함량을 분석한 결과, CHCl<sub>3</sub> (56.76 mg/100g) > BuOH (49.16 mg/100g) > H<sub>2</sub>O (5.67 mg/100g) > n-hexane (2.18 mg/100g)의 함량을 나타내었다. 분석결과, 처리방법과 추출용매에 따라 유효성분인 설포라판의 용출 양에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 17. Sulforaphane contents of broccoli sprouts extract fractionated from each solution.

Samples	Sulforaphane (mg/100g)
CHCl <sub>3</sub>	56.79
n-Hexane	-
EtOA	2.18
BuOH	49.16
H <sub>2</sub> O	5.67

## 7. 기기분석

### 가. Compound 구조 분석

브로콜리 새싹 추출물을 chloroform, n-hexane, ethyl acetate, butanol 로 분획 후 활성이 좋았던 butanol 층을 이용하여, Sephadex LH-20, Methanol (0-100)조건에서 LH1 - LH5 까지의 subfractions을 얻어 TLC 전개 BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2, v/v/v) 후, UV 254 nm, 334 nm에서 확인 후 LH1-LH5 까지 분리 하였다.

또한, 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었던 D (Rf=0.65)를 HPLC ( $\mu$ -Bondapak C18 3.9 × 300 mm; flow rate 0.8 mL/min; inject vol., 20  $\mu$ L; detector, 254 nm)를 통해 Compound I을 분리·정제 하였다. Compound I은 무색 분말의 형태였고, silica gel TLC 상의 Rf 값은 0.65 (BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2, v/v/v)) 이었고, HPLC 상 11분대에서 검출 되었다. 또한, UV-vis absorbance spectrum은 226, 238(in methanol)에서 최대 흡수치를 나타냈다.

Positive ion에서 GC/MS상 분자량 측정 결과, 177.03의 분자량을 갖는 것으로 나타났다 (m/z ; 177.03 [M+H]<sup>+</sup>(Fig. 6). <sup>1</sup>H-NMR(in CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) 측정결과(Fig.7)는 1.90~1.99 ppm(4H, m), 2.60 ppm (3H, s), 2.67~2.80ppm (2H, m), 3.60ppm (2H, t, J=6.2Hz) 을 갖는 것으로 나타났다.

<sup>13</sup>C-NMR의 결과는 Fig. 8, Table 18과 같다. 이상의 결과를 종합하여 구조를 결정하였으며, C 6개, H 11개 그리고 NOS<sub>2</sub> 1개를 갖는 분자식 C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NOS<sub>2</sub> 분자량 177.03인 Isocyanate계 Sulforaphane 으로 동정 되었다 (Fig. 9).

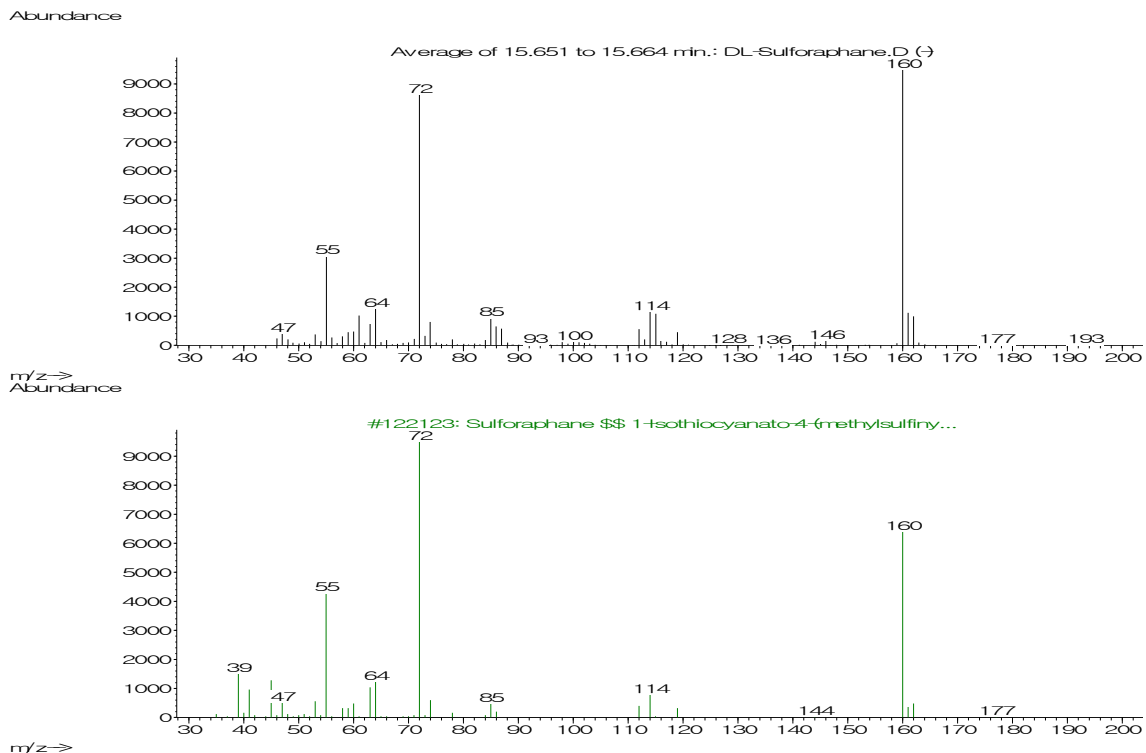


Fig. 6. GC/MS spectrum of Compound

$^1\text{H-NMR}$  (in  $\text{CHCl}_3\text{-d}^6$ )

1.90~1.99 (m, 4H) 2.60 (s, 3H)

2.67~2.80 (m, 2H) 3.60(t, 2H,  $J=6.2\text{Hz}$ )

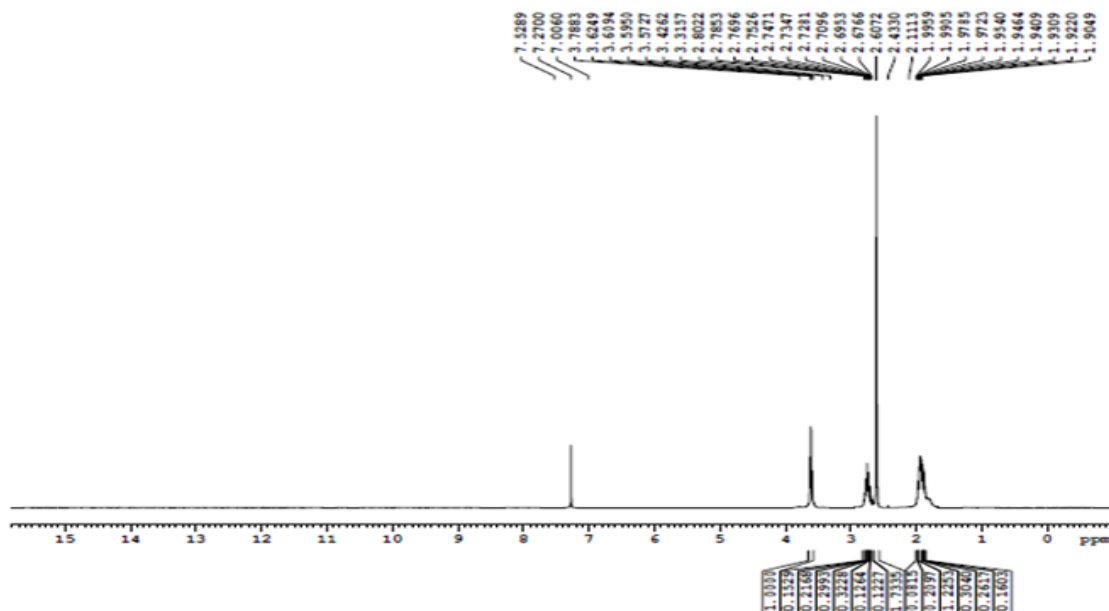


Fig. 7.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of Compound

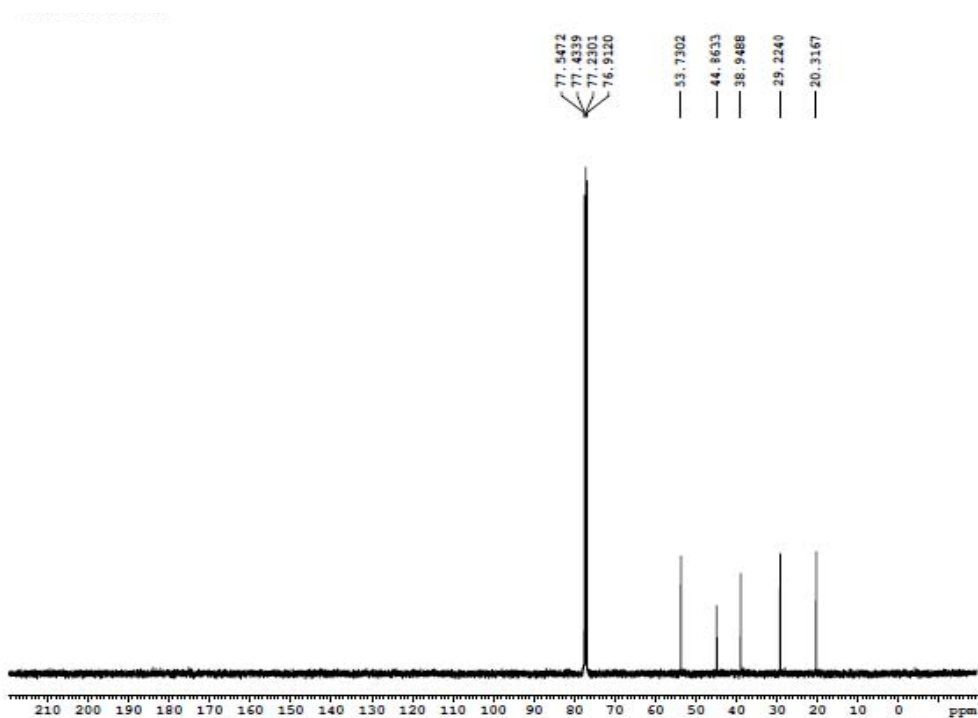


Fig. 8.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of Compound

Table 18.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift for Compound

Position	$\delta$ H, ppm	$\delta$ C, ppm
C-1	3.60(t, 2H, J=6.2Hz)	44.86
C-2	1.90~1.99 (m, 4H)	29.22
C-3		20.31
C-4	2.67~2.80 (m, 2H)	53.73
methyl	2.60 (s, 3H)	38.94

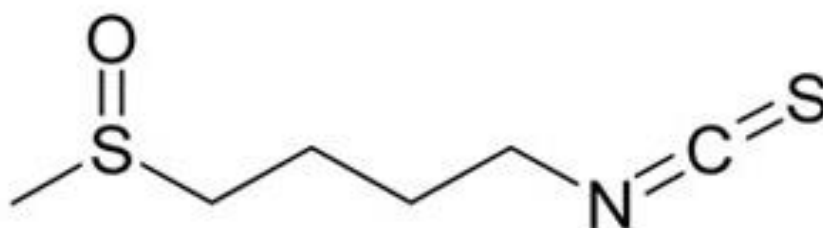


Fig. 9. Structure of Compound

Synonym : Sulforaphane(4-methylsulfinyl butane)

Chemical family : Isothiocyanato

Molecular formula :  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NOS}_2$

Molecular weight : 177.03

## 제 3 절 연구수행 결과

### 1. 브로콜리 새싹의 생산방법 및 대량생산체계 구축

#### 가. 원적외선 음이온수 장치(Dileka)를 이용하여 브로콜리 새싹을 생산하는 방법

원적외선 음이온수 장치를 이용하여 브로콜리 새싹을 생산하는 방법으로 디레카(Dileka) 물은 전자와 원적외선이 부여된 활성수로써, 디레카 장치는 수돗물에 포함된 염소를 불활성화하여, 안전한 물로 변환시키는 장치로서, 물의 기본 성분은 그대로 이지만, 피부에는 좋은 물로 바꾸어 줄 수 있다. 또한 미생물의 활동을 촉진하여 유익한 균은 활성화 하고, 유해한 균은 감소시키는 작용을 하며, 자연 미네랄도 자연스럽게 공급할 수 있는 장점을 갖고 있다. 수분 공급장치(디레카)는 길이 840mm, 접속부분내경 90mm, 콘덴서 내경 65mm, 외경 89mm, 중량 8.4kg의 장치로써 LED 광원을 12시간씩 조사하였고, 매 1시간 마다 2분씩 수분을 분사하였다.

#### 나. 브로콜리 최적 생육 조건 확립

브로콜리 새싹 재배에 사용된 광원은 LED 광원으로 430nm내지 460nm 파장 범위의 LED 광원을 사용하였으며, 파장범위는 엥겔만의 실험(Engelmann's experiment)에 의해 광합성에 적합한 것으로 밝혀진 파장범위를 이용하였다. LED 청색광원을 받아 2일(암조건), 4일 동안 하루에 12시간씩 조사시켰으며, 온도범위는 21~23℃, 습도는 45~60%로 조절하여 브로콜리 새싹을 재배 하였다. 이러한 결과 LED 광원에 따른 영양소 함량 및 유효성분 함량에도 큰 차이를 보여, 브로콜리 새싹의 성분을 향상시키기 위해 가장 적절한 수확 시기는 받아 후 4일째 LED 청색광원으로 재배하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

#### 다. LED 조명변화에 따른 성장정도 및 무게 변화 연구

브로콜리의 새싹 재배 시 LED 광질이 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 받아 후 4일째 백색광 처리구가 평균 6.1cm 인데 비해 청색광 처리구는 8.0cm, 적색광 처리구는 8.4cm를 나타내었다. 무게는 백색광 처리구가 평균 33.5mg, 적색광 처리구는 36.2mg, 청색광 처리구는 49.7mg을 나타내어 브로콜리의 새싹 재배 시 신장과 무게 촉진 측면에서는 청색광과 적색광을 조사하는 것이 좋을 것으로 사료된다.



Table 19. Shoot length of broccoli sprouts under the different LED color condition.

Day after seeding (day)	Shoot length (cm)		
	White	Red	Blue
4	6.1	8.4	8.0

Table 20. Total fresh weight of broccoli sprouts under the different LED color condition.

Day after seeding (day)	Total sprout fresh weight (mg/10plants)		
	White	Red	Blue
4	33.5	36.2	49.7

라. 브로콜리 새싹의 추출 최적화 방법 확립

(1) 브로콜리 새싹의 수율 최적화

수확한 브로콜리 새싹을 열풍건조기를 이용하여 40~60℃로 24시간 건조한 후 70% EtOH 용매로 40℃에서 12시간씩 3반복 추출하고 여과지에 거른 후 rotary evaporator(EYELAN-1000, Japan)를 이용하여 감압농축하여 용매를 완전히 제거시킨 후 동결 건조기를 이용하여 건조 후 각 추출물의 수율을 계산하였다. LED광원에 의한 브로콜리 새싹의 수율을 측정한 결과, 백색광 처리구 11.87%, 적색광 처리구 7.65%, 청색광 처리구 14.02%로 청색광 처리구에서 생 추출물에 비해 10배 이상의 수율을 얻을 수 있었다.

Table 21. The comparison of yield on raw materials and hot air drying.

Sample	Yield (%)
WRM	1.91
BRM	1.99
RRM	2.22
WHD	11.87
BHD	14.02
RHD	7.65

- \* WRM : white lighting raw materials
- \* BRM : blue lighting raw materials
- \* RRM : red lighting raw materials
- \* WHD : white lighting hot air drying
- \* BHD : blue lighting hot air drying
- \* RHD : red lighting hot air drying

(2) 브로콜리 새싹 추출물의 용매조건별 생리활성 효과

추출온도를 조절하여 용매를 달리한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화를 측정하였다. EtOH 용매를 20%, 50%, 70%, 100% 로 추출하여 실험한 결과는 다음과 같다. 총 페놀함량 측정 결과 브로콜리 새싹 70% EtOH 추출물에서  $1.259 \pm 0.014$  mg/mL 로 가장 높은 활성을 보였고, 100%, 50%, 20% 순으로 측정이 되었다. SOD 유사활성 측정 결과 추출물 모두가 60% 이상의 활성을 보였으며 70% EtOH 추출물이 92.89%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 100%, 50%, 20% 순으로 측정이 되었다. SOD 유사활성은 식물체 잎의 엽록소에서 일어나는 광합성 대사 시 카테킨 등의 폴리페놀 성분의 생성에 의해 다른 부위 보다 잎에 페놀, 플라보노이드 물질의 생성이 많고, 이 물질들은 페놀성 화합물, SOD 유사활성과 상관관계가 있다고 보고하고 있는데 이는 위 결과와 유사한 결과를 보였다. 전자공여능 결과 70% EtOH 42%, 50% EtOH 37.62%, 100% EtOH 36.56%, 20% 36.61%로 70% EtOH 활성이 가장 높게 측정이 되었다. 이는 총 페놀함량과 SOD 유사활성과 유사한 결과를 나타냈다. Hydroxyl radical 소거활성은 50% EtOH  $81.5 \pm 0.171\%$ , 100% EtOH  $81.14 \pm$

0.342%, 70% EtOH 80.89 ± 0.171%, 20% 80.41 ± 0.0001%로 4가지 추출물 모두 80% 이상의 높은 활성을 나타냈다. 이 결과 용매별 브로콜리 새싹의 항산화 결과 70% EtOH 추출물이 브로콜리 새싹 활성 면에서 적합한 용매조건이라 추정된다.

Table 22. Antioxdant activity of Broccoli Sprouts by different extracts methods

	Total phenolic acid (mg/ml)	SOD-likd activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
B.S 20%	1.175 ± 0.003	66.67 ± 0.000	36.61	80.41 ± 0.000
B.S 50%	1.184 ± 0.002	74.19 ± 0.000	37.62	81.5 ± 0.171
B.S 70%	1.259 ± 0.014	92.89 ± 0.134	42.00	80.89 ± 0.171
B.S 100%	1.223 ± 0.005	79.49 ± 0.000	36.56	81.14 ± 0.342

- \*B.S 20%: Broccoli Sprout extract of 20% EtOH
- \*B.S 50%: Broccoli Sprout extract of 50% EtOH
- \*B.S 70%: Broccoli Sprout extract of 70% EtOH
- \*B.S 100%: Broccoli Sprout extract of 100% EtOH

#### 마. 온도조건을 달리한 브로콜리 새싹 추출물의 항산화 효과

브로콜리 새싹 추출물의 온도조건별 항산화활성을 측정된 결과는 Table 10과 같다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하여 항산화 효과 등의 생리활성 기능을 나타낸다. 총 페놀함량 측정결과 red조명 40℃추출물에서 가장 높게 측정이 되었으며 60℃ 추출물보다 40℃추출물이 높은 페놀함량을 나타냈다.

SOD 유사활성 결과 40℃ 추출물의 경우 60% 이상 활성을 나타냈는데, 60℃ 추출물경우 40% 미만의 활성을 나타냈다. 호기성 생물체는 호흡대사 중 산소를 이용하는 과정에서 superoxide radical이 생성되며, 이는 생물체의 유기물과 결합하여 산화되고 산화물은 생명체에서 oxidative damage로 작용하여 생 체내 여러 가지 질병을 야기하므로 체내 는 SOD (superoxide dismutase)에 의한 효소적 기작 및 비효소적 기작에 의한 복합적 항산화 체제를 갖고 있다. 식물체 잎의 엽록소에서 일어나는 광합성 대사 시 카테킨 등의 폴리페놀 성분이 생성되고, 이 물질들은 항산화 능과 밀접한 상관관계가 있다고 보고 하였고, 페놀성 화합물이 SOD 유사활성을 갖는다고 보고된 바 있다. 브로콜리 새싹은 페놀성 화합물과 유사한 결과를 보였다. 짙은 자색이 탈색되는 정도를 지표로 나타내는 전자공여능은 DPPH

(1,1,-diphenol-2-picrylhydrazil) radical 소거법은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 항산화 능을 나타내는 척도로 알려져 있다. 전자공여능 측정결과 red 조명 40℃ 추출물이 59.37%로 가장 높게 측정 되었고, 60℃ 추출물 경우 40% 미만의 활성을 나타냈다.

활성산소종 중 지질산화를 일으키는데 중요한 역할을 하는 hydroxyl radical 소거활성 결과 blue 조명 40℃ 추출물이 62.38%, 60℃ 추출물이 40%미만의 활성을 나타냈다.

온도조건을 달리하여 항산화를 측정한 결과 40℃의 추출물이 총 페놀함량, SOD 유사활성, 전자공여능, hydroxyl radical 소거활성에서 높은 활성을 나타냈다. 이 결과 브로콜리 새싹의 항산화 활성은 40℃ 추출방법이 가장 좋은 추출방법이라 사료된다.

Table 23. Antioxdant activity of Broccoli Sprouts by different extracts methods

	Total phenolic acid (mg/ml)	SOD-liked activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
R_40	1.54±0.000	61.9±0.000	59.37	55.71±2.405
B_40	1.37±0.003	61.72±0.259	58.94	62.38±1.058
W_40	1.44±0.000	67.48±0.000	56.8	41.22±1.732
R_60	1.41±0.002	44.82±0.538	38.39	35.93±0.851
B_60	1.44±0.012	38.93±0.659	38.83	36.2±0.578
W_60	1.41±0.003	39.34±2.599	36.28	33.68±0.796

- \*R\_40: Red lighting Broccoli Sprout extract of 40℃
- \*B\_40: Blue lighting Broccoli Sprout extract of 40℃
- \*W\_40: white lighting Broccoli Sprout extract of 40℃
- \*R\_60: Red lighting Broccoli Sprout extract of 60℃
- \*B\_60: Blue lighting Broccoli Sprout extract of 60℃
- \*W\_60: white lighting Broccoli Sprout extract of 60℃

**바. 브로콜리 새싹의 수확시기별 항산화 효과**

새싹들은 같은 품종이라도 사용되는 물과 온도, 수확시기에 따라 영양성분에 큰 차이를 나타낼 수 있고, 특히 특수성분의 함량에 큰 차이를 나타낸다. 또한 새싹의 경우 바로 섭취하지 않으면 수분함량이 높아 저장이 어려우며 저장 기간 동안 중량감소나 부패가 일어나 새싹의 품질이 저하되는 경우가 발생한다. 따라서 새싹의 품질을 향상시키고 성분의 함량차이를 알아보기 위해 새싹을 수확시기를 달리하고 건조시켜 항산화 활성을 측정해 본 결과는 다음과 같다.

수확시기에 관련 없이 모든 브로콜리새싹들이 건조된 방법에서 더 높은 활성을 나타냈다.

4일차 수확한 광원별 브로콜리 새싹의 경우 Blue 조명을 쬐인 브로콜리활성이 높게 나타났으며, LED 조명을 쬐인 새싹의 활성이 White 조명 쬐인 새싹 보다 높게 나타났다. 또한 건조된 브로콜리 새싹이 생 브로콜리 새싹보다 높은 활성을 보였다.

5일차 수확한 브로콜리 새싹들은 건조된 브로콜리 새싹 활성이 생 브로콜리 새싹보다 높게 나타났으며, White 조명보다 LED 조명을 쬐인 브로콜리 새싹 활성이 높게 측정 되었다.

6일차 수확한 브로콜리 새싹의 활성은 4, 5일차보다 감소하는 경향을 보였으며, 광원과 건조 방법에 영향을 받는 것으로 나타났다.

브로콜리 새싹의 성분 향상시키기 위해 가장 적절한 수확 시기는 **발아 후 4일째**임을 알 수 있었다. 그리고 수확한 브로콜리 새싹을 **40℃에서 저온열풍건조** 시키는 것이 저장기간과 품질증가에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 24. Antioxdant activity of Broccoli Sprouts by harvest time

	Total phenolic acid (mg/ml)	SOD-liked activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
4DRRM	1.46±0.002	92.71±0.107	52.19	90.03±0.086
4DBRM	1.51±0.009	93.07±0.000	56.66	90.51±0.086
4DWRM	1.51±0.011	93.2±0.000	56.9	90.02±0.086
<b>4DRHD</b>	<b>1.49±0.018</b>	<b>92.47±0.000</b>	<b>63.13</b>	<b>90.51±0.257</b>
<b>4DBHD</b>	<b>1.53±0.011</b>	<b>93±0.000</b>	<b>66.97</b>	<b>90.57±0.171</b>
<b>4DWHD</b>	<b>1.47±0.005</b>	<b>94.04±0.036</b>	<b>65.3</b>	<b>90.27±0.086</b>
5DRRM	1.34±0.005	92.09±0.063	48.72	90.45±0.171
5DBRM	1.36±0.001	92.55±0.000	46.6	90.57±0.000
5DWRM	1.36±0.035	92.96±0.05	48.72	90.63±0.086
5DRHD	1.36±0.003	92.09±0.063	43.82	90.27±0.086
5DBHD	1.51±0.011	92.67±0.054	56.9	90.75±0.086
5DWHD	1.5±0.000	92.67±0.005	47.11	90.69±0.000
6DRRM	1.43±0.003	92.82±0.052	47.85	89.73±0.171
6DBRM	1.45±0.003	93.89±0.051	49.53	89.66±0.257
6DWRM	1.3±0.011	92.05±0.000	39.42	89.84±0.171
6DRHD	1.52±0.009	92.47±0.000	44.75	89.72±0.171
6DBHD	1.54±0.003	92.13±0.000	52.57	89.6±0.000
6DWHD	1.54±0.000	92.78±0.000	49.78	90.33±0.000
Sulforaphane		73.71±0.814	9.03	

\* 4,5,6D : 4, 5, 6 Day

\* WRM : white lighting raw materials

\* BRM : blue lighting raw materials

\* RRM : red lighting raw materials

\* WHD : white lighting hot air drying

\* BHD : blue lighting hot air drying

\* RHD : red lighting hot air drying

#### 사. 광원별 브로콜리 새싹 추출물의 건조방법별 항산화 효과

새싹들은 같은 품종이라도 사용되는 물과 온도, 수확시기에 따라 영양성분에 큰 차이를 나타낼 수 있고, 특히 특수성분의 함량에 큰 차이를 나타낸다. 또한 새싹의 경우 바로 섭취하지 않으면 수분함량이 높아 저장에 어려우며 저장 기간 동안 중량감소나 부패가 일어나 새싹의 품질이 저하되는 경우가 발생한다. 따라서 새싹의 품질을 향상시키고 성분의 함량차이를 알아보기 위해 새싹의 건조방법을 달리하여 항산화 활성을 측정해 본 결과는 다음과 같다.

건조방법을 달리하여 얻은 브로콜리 새싹 추출물의 총 페놀함량은 Table 25와 같다. FLR  $1.43 \pm 0.027\%$ , FLB  $1.61 \pm 0.016\%$ , FLW  $1.5 \pm 0.001\%$ , HDR  $1.47 \pm 0.005\%$ , HDB  $1.77 \pm 0.006\%$ , HDW  $1.56 \pm 0.001\%$ , FDR  $1.42 \pm 0.004\%$ , FDB  $1.52 \pm 0.007\%$ , FDW  $1.44 \pm 0.001\%$ 로 측정이 되었다. 열풍건조한 브로콜리 새싹의 페놀성 화합물이 가장 높게 측정이 되었으며, 광원별로 함량의 차이를 나타냈다. Blue 광원을 쬐인 브로콜리의 페놀 화합물이 다른 광원보다 높게 측정되었다.

superoxide와 반응하여 갈변물질을 나타내는 pyrogallol 자동산화 반응으로 SOD 유사활성능을 측정한 결과는 33.81-67.69%를 나타냈다. 열풍건조한 브로콜리 새싹이 동결건조 브로콜리 새싹보다 높은 활성을 보였다. SOD 유사활성 결과 페놀성 화합물과 비교하여 볼 때 Blue 광원을 쬐인 브로콜리 새싹이 다른 광원보다 높게 나타났다. 페놀성 화합물과 SOD 유사활성의 경우 식물체 잎의 엽록소에서 일어나는 광합성 대사 시 카테킨 등의 폴리페놀 성분의 생성에 의해 다른 부위보다 잎에 페놀 물질생성이 많고 이 물질들은 항산화능과 밀접한 상관관계가 있다고 보고하며 이는 위 결과와 유사한 결과를 보였다.

질은 자색이 탈색이 되는 정도를 지표로 나타내는 전자공여능은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 항산화 능을 나타내는 척도로 알려져 있다. 생잎 브로콜리 새싹의 경우 28%의 활성을 보였으며, 건조 브로콜리는 32%이상, 동결건조 브로콜리는 14%활성으로 건조한 브로콜리 새싹이 가장 높게 나타났다. 페놀성 화합물과 SOD 활성과 유사한 결과를 보였다.

hydroxyl radical 소거활성은 60%이상의 활성을 보였다. FLR  $63.21 \pm 0.772\%$ , FLB  $65.7 \pm 0.5918\%$ , FLW  $55.19 \pm 4.143\%$ , HDR  $66.70 \pm 0.000\%$ , HDB  $68.78 \pm 0.14\%$ , HDW  $67.79 \pm 0.14\%$ , FDR  $58.52 \pm 0.618\%$ , FDB  $62.37 \pm 2.136\%$ , FDW  $60.84 \pm 0.129\%$ 로 측정이 되었다. 건조방법별로 차이를 나타냈으며, Blue 광원을 쬐인 브로콜리가 높게 측정되었다.

Table 25. Antioxdant activity of Broccoli Sprouts by different drying methods

Sprout samples <sup>1)</sup>	Total phenolic acid (mg/ml)	SOD-likd activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
FLR	1.43±0.027	33.81±0.315	29.11	63.21±0.772
FLB	1.61±0.016	40.56±0.036	29.63	65.7±0.5918
FLW	1.5±0.001	39.6±0.3	28.72	55.19±4.143
HDR	1.47±0.005	59.63±0.524	32.02	66.70±0.000
HDB	1.77±0.006	61.8±0.375	46.29	68.78±0.14
HDW	1.56±0.001	30.25±0.067	38.12	67.79±0.14
FDR	1.42±0.004	43.86±0.032	14.13	58.52±0.618
FDB	1.52±0.007	55.03±0.083	16.53	62.37±2.136
FDW	1.44±0.001	50.77±0.174	14.41	60.84±0.129

<sup>1)</sup>See the Table 9.

아. LED광원에 따른 수확시기별 Sulforaphane 함량 분석

브로콜리 새싹의 sulforaphane 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과는 Table 26과 같다. 브로콜리 새싹의 최적 생육 조건은 발아 2일 후 4일차에 수확하는 것이 활성이나 설포라판 함량이 가장 높게 나타났으며, 그 이후에는 함량이 감소하는 경향을 보였다. 또한 살아있는 세포를 파괴시켜 성분이 최대한 추출되도록 저온 열풍건조한 후 설포라판의 함량을 측정한 결과 함량이 더 증폭되었다. LED 광원별 유효성분의 함량에도 큰 차이를 보였으며, blue광원이 조사된 브로콜리 새싹에서 유효성분인 설포라판 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 브로콜리의 유효성분인 설포라판 함량은 추출온도, 수확시기, 광원에 의한 영향을 받는 것으로 사료된다.



Table 26. Sulforaphane contents of broccoli sprout harvested at different colored lights.

Sample number	Sulforaphane (mg/100g)
4DWRM	121.36(0.012%)
4DBRM	394.45(0.039%)
4DRRM	117.91(0.012%)
4DWHD	386.05(0.039%)
4DBHD	642.40(0.064%)
4DRHD	380.38(0.038%)
5DWRM	25.79(0.003%)
5DBRM	269.21(0.027%)
5DRRM	6.73(0.001%)
5DWHD	309.71(0.031%)
5DBHD	412.35(0.041%)
5DRHD	329.33(0.033%)
5DRBHD	359.57(0.036%)
6DWRM	16.05(0.002%)
6DBRM	237.70(0.024%)
6DRRM	6.73(0.001%)
6DWHD	121.36(0.012%)
6DBHD	350.78(0.035%)
6DRHD	226.31(0.023%)

\* 4,5,6D : 4, 5, 6 Day

\* WRM : white lighting raw materials

\* BRM : blue lighting raw materials

\* RRM : red lighting raw materials

\* WHD : white lighting hot air drying

\* BHD : blue lighting hot air drying

\* RHD : red lighting hot air drying

자. Open column에 의한 브로콜리 새싹의 수율, 활성 및 설포라판 함량  
70% 에탄올 브로콜리 생 추출물을 다공성 입자를 가진 HP-20 resin (H = 26, Ø = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (0, 20, 40, 60, 80, 100%)로 용출한 결과 수율은 20% 에탄올 용출 분획물 (BHP-20)에서 높았지만, 유효성분인 sulforaphane의 함량은 40% 에탄

을 용출 분획물 (BHP-40)에서 가장 높은 함량을 보였으며 (Table 27), 각 추출물에 대한 pattern을 HPLC로 조사한 결과 4 종류 모두 유사한 양상을 보였다 (Fig. 10). 따라서 유효성분 함량 증대를 위한 조건은 HP-20 resin에 브로콜리 추출물을 흡착시킨 후 20% 에탄올로 불순물을 제거하고, 40% 에탄올을 이용하여 고 함량의 sulforaphane을 얻을 수 있었다. 타사에서 추출한 브로콜리(국내 S사, 국외 O사)와 비교한 경우 4~10배의 고 함량을 확인 할 수 있었다.

Table 27. Contant of broccoli sprouts yield and sulforaphane.

Samples	Yield (%)	Sulforaphane (mg/100g, %)
BHP-0	12	-
BHP-10	15	-
BHP-20	25	-
BHP-30	10	-
BHP-40	11	5,686 (0.57%)
BHP-50	8	1,512 (0.15%)
BHP-60	5	609 (0.06%)
BHP-70	5	-
BHP-80	2	-
BHP-90	4	-
BHP-100	7	-
S사	-	1,489 (0.15%)
O사	-	912 (0.09%)

브로콜리를 비롯한 십자화과 채소중의 sulforaphane 함량은 시중에서 구입한 여러 가지 십자화과 채소 중 sulforaphane 함량을 Table 28에 나타내었다. Table 28에서와 같이, 브로콜리에 가장 많이 함유되어 있었으며, 특히 식물공장 시스템을 이용하여 재배한 브로콜리 새싹 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 그 양은 0.01~0.06% 이었으며, 부분정제한 브로콜리 새싹 추출물에서는 10배 이상의 고 함유 sulforaphane을 얻을 수 있었다. 그 다음으로 많이 함유된 채소는 시중 브로콜리 0.008~0.06%, 순무 0.001~0.002%, 무청 0.001%, 자색 양배추 0.001~0.003%, 무 0.0005~0.0008%, 케일 0.0008%, 흰색 양배추 0.0007%, 콜리플라워 0.0005%, 배추 0.0003%, 청경채 0.00002% 이었으며, 무순, 갓, 돌산 갓 및 배추뿌리에는 sulforaphane 이 존재하지 않았다.

Table 28. Sulforaphane content of various cruciferous vegetables

Vegetables	Sulforaphane (mg/100g)
Broccoli sprouts (식물공장 시스템 활용 재배 시)	0.01~0.06%
Broccoli sprouts (식물공장 시스템 활용/정제 시)	0.57%
Broccoli	0.008~0.06%
Turnip	0.001~0.002%
Radish leaf	0.001%
Red cabbage	0.001~0.003%
Radish	0.0005~0.0008%
Kale	0.0008%
White cabbage	0.0007%
Cauliflower	0.0005%
Chinese cabbage	0.0003%
Chungkyungchae	0.00002%
Radish sprout	- <sup>1)</sup>
Mustard leaf	-
Mustard leaf(Dolsan)	-
Garlic	-
Green onion	-
Wild green onion	-
Leek	-
Chinese cabbage root	-

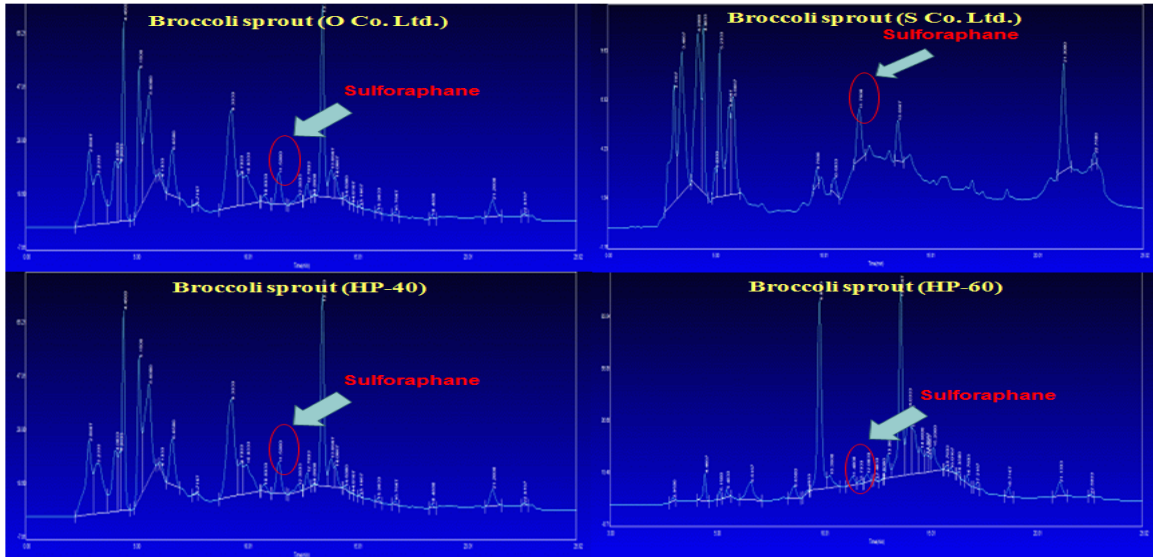


Fig. 10. The pattern of broccoli sprout by using HPLC system.

(1) 총 페놀성 화합물

부분 정제한 브로콜리 새싹 추출물의 총 페놀화합물은 BHP-40 (2.81 mg/ml)로 가장 높게 나타났으며, BHP-60 (1.64 mg/ml)로 가장 낮은 함량을 보였다. 페놀성 화합물은 식물 자원에 함유되어 있는 천연물질로서 다양한 구조와 생리활성 기능을 가지고 있다. 실험결과로 볼 때, 정제 및 추출용매에 의한 추출 수율과 페놀함량이 다르게 측정됨을 알 수 있었다.

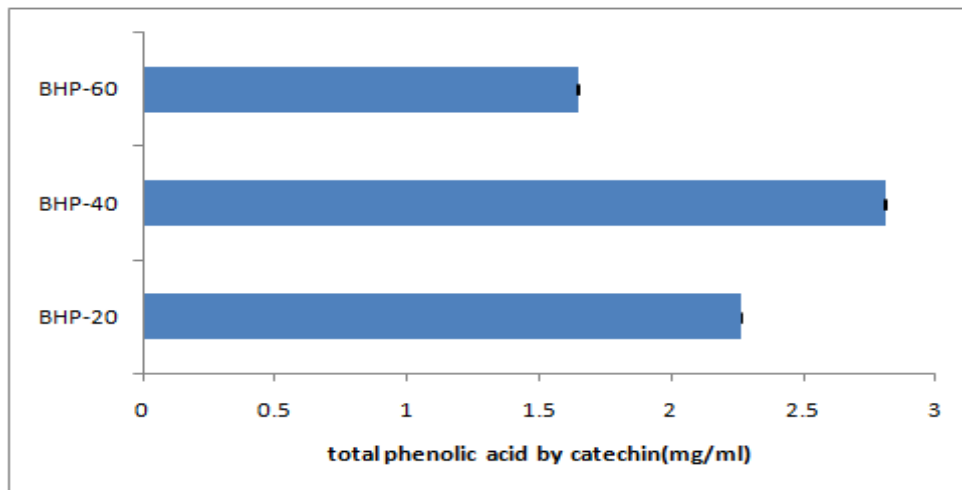


Fig. 11. Total phenolic acids contents of each fractions purified from HP-20 open column chromatogram in broccoli sprouts.

(2) SOD 유사활성

Superoxide dismutase는 세포내 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 촉매역할로 생체내의 항산화 효소 중 하나이며, SOD에 의하여 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase에 의하여 물 분자와 산소분자로 전환된다. SOD 유사활성은 BHP-40 정제 추출물의 활성이 92.79%로

가장 높았으며, BHP-20 정제 추출물 91.09%, BHP-60 정제 추출물 82.82% 순 이었다. 실험결과, 브로콜리 정제 추출물은 superoxide anion 제거능이 높은 물질을 함유하고 있음을 예상할 수 있다.

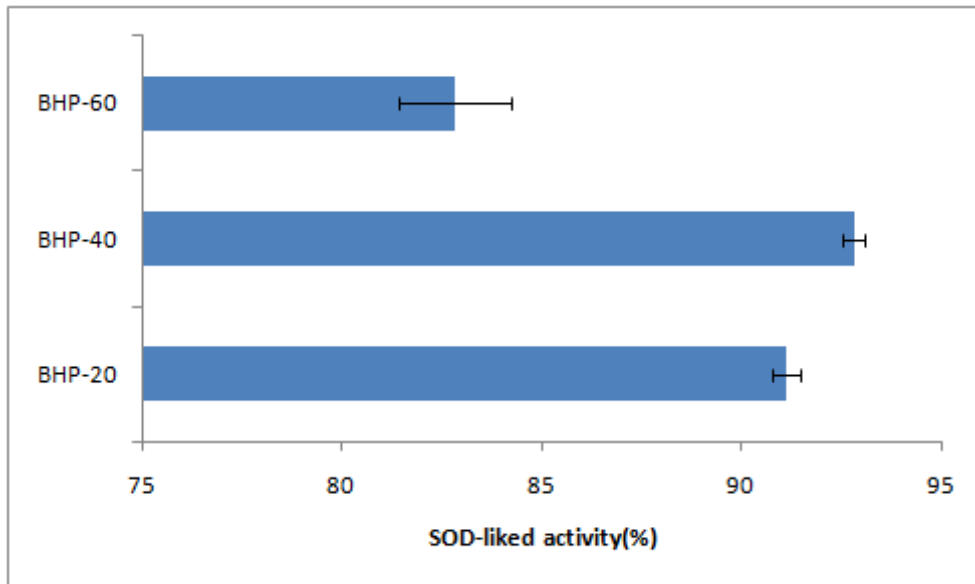


Fig. 12. SOD-liked activities of each fractions purified from HP-20 open column chromatogram in broccoli sprouts.

### (3) 전자공여능

인체 내의 free radical은 지질, 단백질 등과 결합하여 생체의 노화를 일으키는 물질이며, 이러한 free radical을 제거할 수 있는 천연물에 대한 연구가 끊임없이 이루어지고 있다. 특히 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) radical 소거법은 항산화 물질의 전자 공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 자색이 탈색되는 정도를 나타내는 지표로 하여 항산화능을 측정하는 방법이다. DPPH에 의한 전자공여능을 측정한 결과, BHP-40 정제추출물 87.27%, BHP-20 정제 추출물 75.11%, BHP-60 정제 추출물 42.97%를 나타내었다. 한국 약용 및 식물자원의 항산화성 식물탐색에 대한 결과에 의하면 포도씨와 음양곽을 제외한 식물자원이 20% 미만의 활성을 보고한 바와 비교하면, 브로콜리 정제 추출물은 높은 전자공여능을 보여 주고 있다.

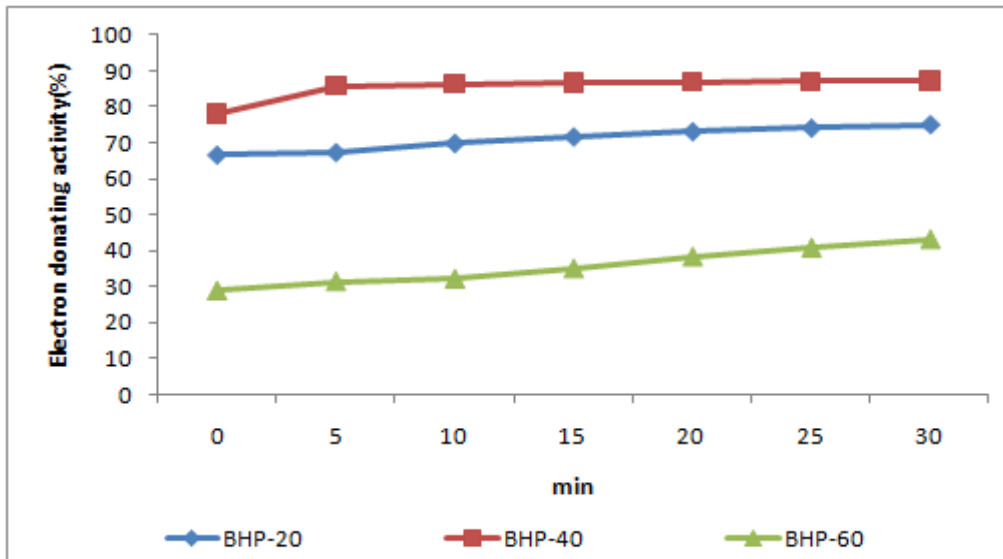


Fig. 13. Electron donating ability of each fractions purified from HP-20 open column chromatogram in broccoli sprouts.

#### (4) Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )은 활성산소 중 반응성이 매우 강하여 생체 산화에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 브로콜리 정제 추출물의 Hydroxyl radical 소거능은 BHP-40 정제 추출물 97.48%, BHP-20 정제 추출물 97.36%, BHP-60 정제 추출물 96.94%로, 한국산 약초 잎에 대한 항산화 효과를 검색한 결과, 삼나무, 삼주, 오갈피 잎들은 hydroxyl radical 소거능이 90% 이상이었다는 결과와 비교할 때, 브로콜리 정제 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 높거나 비슷한 결과를 나타내었다.

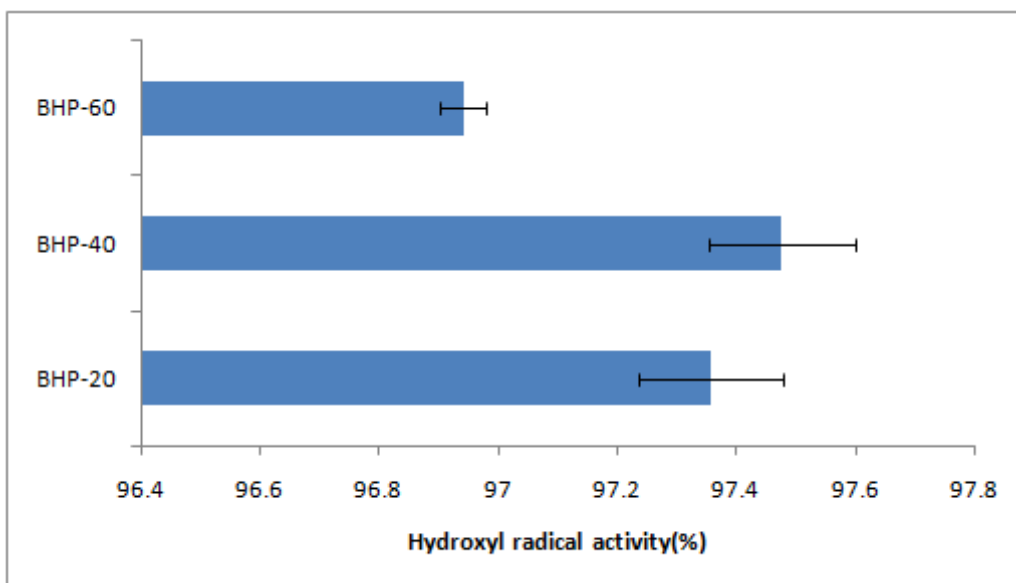


Fig. 14. Hydroxyl radical scavenging activity of each fractions purified from HP-20 open column chromatogram in broccoli sprouts.

(5) 항균활성 측정

브로콜리 정제 추출물을 2% 농도로 희석하여 paper disc agar diffusion 법을 이용하여 항균성을 측정한 결과, BHP-40 정제 추출물이 모든 균종에서 강한 항균력을 나타내었다. 그램 양성균주의 BHP-40정제 추출물은 14.4, 28.9mm의 활성 저해환을 나타내었고, 그램 음성 균주의 BHP-40정제 추출물은 22.5, 25.6mm의 활성 저해환을 보였다. 특히, *Staphylococcus aureus* 에 대해 28.9mm의 강한 항균활성환을 나타내었다. 그 외 BHP-20 정제 추출물, Sephadex LH-20, Silicagel fractionation에서는 항균력이 없었다. BHP-40 정제 추출물에서 항균활성이 높게 나타난 것은 브로콜리 정제 추출물에 의해 미생물 표층구조가 허물어져 균체성분이 유출되어 균 생육이 억제된 것으로 생각된다.

Table 29. Antibacterial activity of each fractions purified from HP-20 open column chromatogram in broccoli sprouts.

	Clear zone (mm <sup>2</sup> )			
	<i>B. Subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>
Blue-70	-	-	-	-
BHP-40	144	256	289	225

차. 브로콜리 항 헬리코박터 활성 유효성분 분리

*in vitro* 상에서 브로콜리 항헬리코박터 활성이 가장 우수한 BHP-20 분획물과 생리활성이 우수한 BHP-40 분획물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 open column chromatograph에 sephadex LH-20(H = 58, Ø = 1)을 4 x 50 cm까지 충전시키고, HP-20, HP-40 분획물중 2 g 을 loading하였으며, 전개용매는 HP-20은chloroform : Methanol (100 : 0 - 0 : 100), HP-40은 70% MeOH(100)을 사용하여 용출하였다. Sephadex LH-20 (H = 58, Ø = 1)을 순차적으로 진행하여 최종적으로 HP-20은 8개의 subfractions를 분리하였고, HP-40은 3개의 subfractions을 분리하여 활성이 가장 우수한 fraction으로부터 active compound를 분리정제하여 구조 분석을 실시하였다.



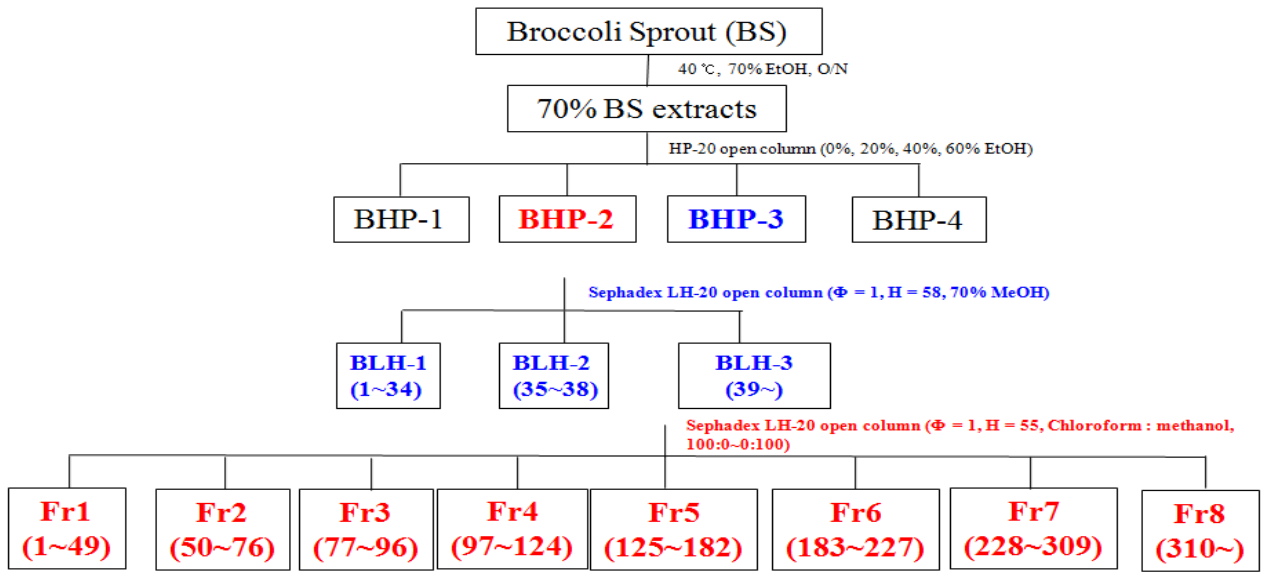


Fig. 27. The purification scheme of active compounds from broccoli sprout.

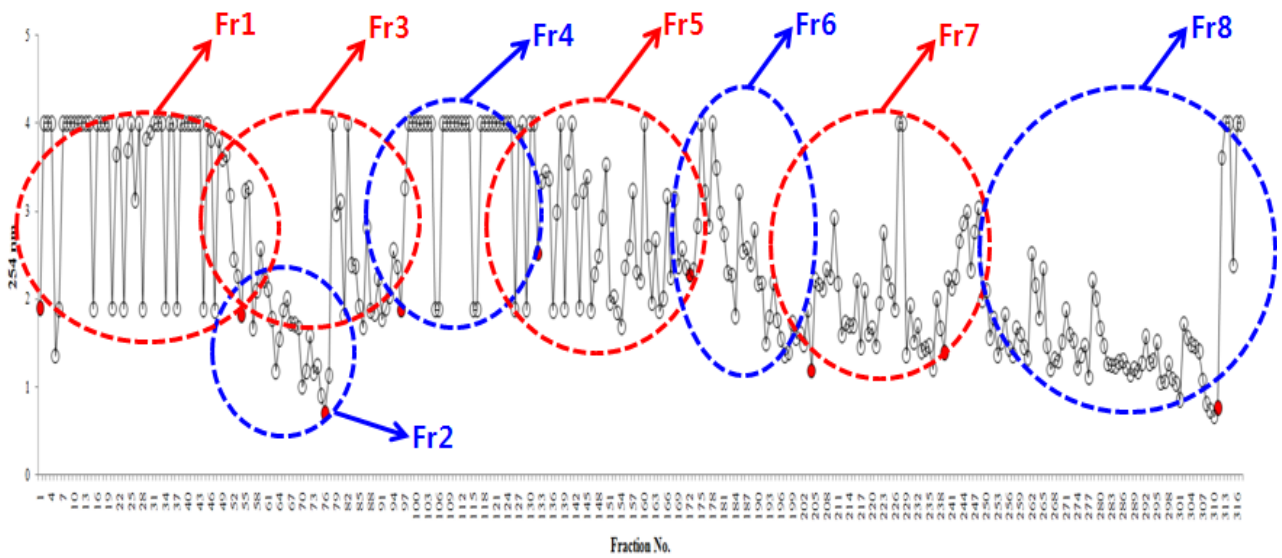


Fig. 15. The spectrum of LH-20 subfractions by using spectrophotometer at 254 nm.

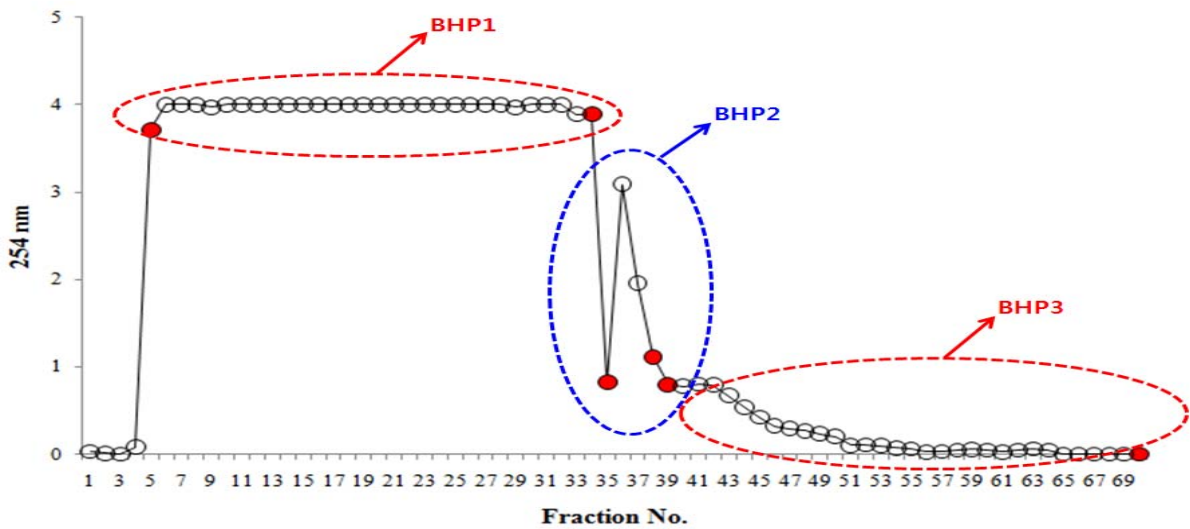


Fig. 16. The spectrum of LH-40 subfractions by using spectrophotometer at 254 nm.

#### 카. 활성성분의 생리활성 효과

##### (1) 총 페놀성 화합물 정량

폴리페놀 화합물 중 flavonoid는  $^1\text{O}_2$ 나  $\text{O}_2^-$ 와 반응하며 안정한 complex를 형성하여 이들의 소거작용을 가지고 있어 지질의 과산화에 대한 항산화제로 잘 알려져 있다. 브로콜리 새싹 추출물로부터 항헬리코박터 활성 및 항산화 활성이 높은 정제된 분획물을 동정하기 위해 HP-20, HP-40, 분획물을 Sephadex LH-20(H = 58,  $\emptyset$  = 1)을 이용하여 chloroform : Methanol (100 : 0 - 0 : 100)로 Fr1 - Fr8 까지의 물질, 70% MeOH(100)로 LH1 - LH3 까지의 물질을 얻어 각 subfractions별 페놀 함량을 측정한 결과, HP-20 정제물은 Fr5 (1.85 mg/mL) > Fr4 (1.71 mg/mL) > Fr1 (1.67 mg/mL) > Fr6 (1.54 mg/mL) > Fr2 (1.53 mg/mL) > Fr7 (1.43 mg/mL) > Fr3 (1.33 mg/mL) Fr8 (1.17 mg/mL) 순으로 나타났으며, HP-40 정제물은 LH1 (1.67 mg/mL) > LH3 (1.61 mg/mL) > LH2 (1.52 mg/mL)의 함량을 보였다. 페놀화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있다는 보고와 비교하여 볼 때, 총 페놀화합물이 함량이 높은 것이 뛰어난 항산화 효과를 갖고 있을 것으로 사료된다.

##### (2) SOD 유사활성

Superoxide anion의 활성을 억제 시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측정한 결과, HP-20 정제물의 SOD 유사활성도는 Fr1 (91.92%) > Fr3 (91.40%) > Fr4 (90.58%) > Fr2 (90.24%) > Fr5 (86.85%) > Fr8 (80.95%) > Fr6 (80.48%) > Fr7 (75.74%) 순으로 나타났으며, HP-40 정제물은 LH1 (94.59%) > LH3 (93.75%) > LH2 (92.23%)의 활성을 보였다. 식물체 잎의 엽록소에서 일어나는 광합성 대사 시 카테킨 등의 폴리페놀 성분이 생성되고, 이 물질들은 항산화 능과 밀접한 상관관계가 있다고 보고하였고, 페놀성 화합물이 SOD 유사활성을 갖는다고 보고된 연구결과와 일치하거나 약간 상이한

연구 결과를 보였으며, 이는 정제과정 중 용매 선정에 따라 용출되는 물질의 영향으로 활성의 차이가 나타난 것으로 사료된다.

### (3) 전자공여능

전자공여능의 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하고 있으며 토코페롤, 아스코르빈산, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원, radical이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이 정도를 항산화물질의 수소공여능으로 측정하는 방법이다. 이때의 DPPH의 거동은 hydroxyl radical과 유사하여 free radical 소거실험에 활용된다. DPPH와 브로콜리 HP-20 정제 분획물을 반응시켜 DPPH scavenger 활성을 측정한 결과, Fr5 (71.55%) > Fr6 (60.75%) > Fr7 (54.40%) Fr8 (46.25%) Fr1 (44.62%) Fr4 (43.69%) > Fr2 (42.95%) > Fr3 (30.07%) 순으로 Fr5에서 가장 높은 활성을 보였으며, HP-40 정제물은 LH1 (42.68%) > LH3 (36.52%) > LH2 (33.62%)로 나타났다.

### (4) Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical( $\cdot$ OH) 소거능은 2-deoxyribose oxidation method에 의해 측정하였다. Hydroxyl radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 브로콜리 HP-20 정제 분획물의 Hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과, Fr4 (95.70%) > Fr8 (95.61%) > Fr5 (95.50%) > Fr6 (95.30%) > Fr2 (95.16%) > Fr1 (95.12%) > Fr3 (95.02%) > Fr7 (94.97%) 순으로 나타났으며, HP-40 정제물은 LH2 (94.21%) > LH1 (94.07%) > LH3 (94.02%)의 활성을 보였다. 김 등의 한국산 약초 잎과 유 등의 포도부산물 결과와 비교하여 볼 때, 브로콜리 정제 분획물이 높은 수준의 hydroxyl radical 소거활성을 보이는 것으로 보아 항산화 활성이 높은 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 사료된다.

Table 30. Antioxidant activity contents of each fractions purified from glass column chromatogram in broccoli sprouts.

	Total phenolic acid (mg/ml)	SOD-liked activity	EDA (%)	Hydroxyl radical scavenging
(HP-20) Fr1	1.67±0.007	91.91±0.115	44.62	95.12±2.309
Fr2	1.53±0.003	90.24±0	42.95	95.16±1.692
Fr3	1.33±0	91.40±0.131	30.07	95.021±2.170
Fr4	1.71±0.003	90.58±0.470	43.69	95.70±1.908
Fr5	1.85±0.006	86.85±0.91	71.55	95.50±1.904
Fr6	1.54±0.002	80.48±0.67	60.75	95.31±1.489
Fr7	1.43±0.002	75.74±1.040	54.40	94.97±1.551
Fr8	1.17±0.003	80.95±0	46.25	95.61±2.456
(HP-40) LH1	1.67±0.013	94.59±0.207	42.68	94.07±0.414
LH2	1.52±0.006	92.23±0.107	33.62	94.21±0.060
LH3	1.61±0	93.75±0.138	36.52	94.02±0.060

#### 타. 활성물질의 TLC 패턴

TLC 분석은 항산화 활성이 높았던 HP-40, Fr1, Fr5, LH1 정제 추출물을 가지고 CHCl<sub>3</sub> : n-hexane : BuOH : MeOH : H<sub>2</sub>O : AcOH (4 : 2 : 2 : 2 : 1 : 1, v/v/v/v/v/v)을 전개용매로 TLC를 실시하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 각각 발색하여 spot을 확인 하였다. TLC 결과 Fr1, Fr5, LH1 정제 추출물에서 공통적으로 Rf치가 같은 동일선상의 물질을 확인할 수 있었고, HP-20, 40, 60 부분정제 추출물과, LH3에서 또 다른 형광의 물질을 확인 하였다. 확인된 물질이 항산화 활성 및 항헬리코박터 활성이 있는 미지의 물질일 것으로 사료되어진다.

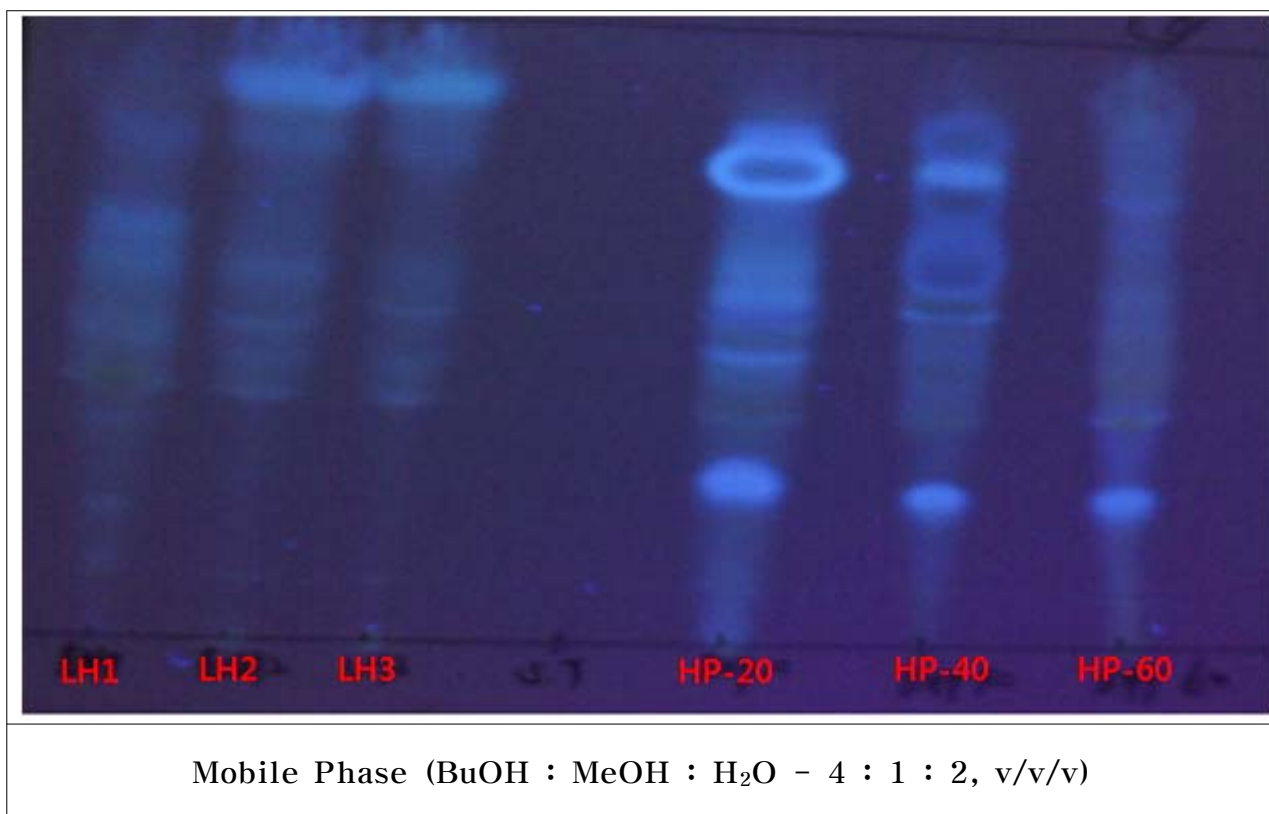


Fig. 17. TLC patten of isolated.

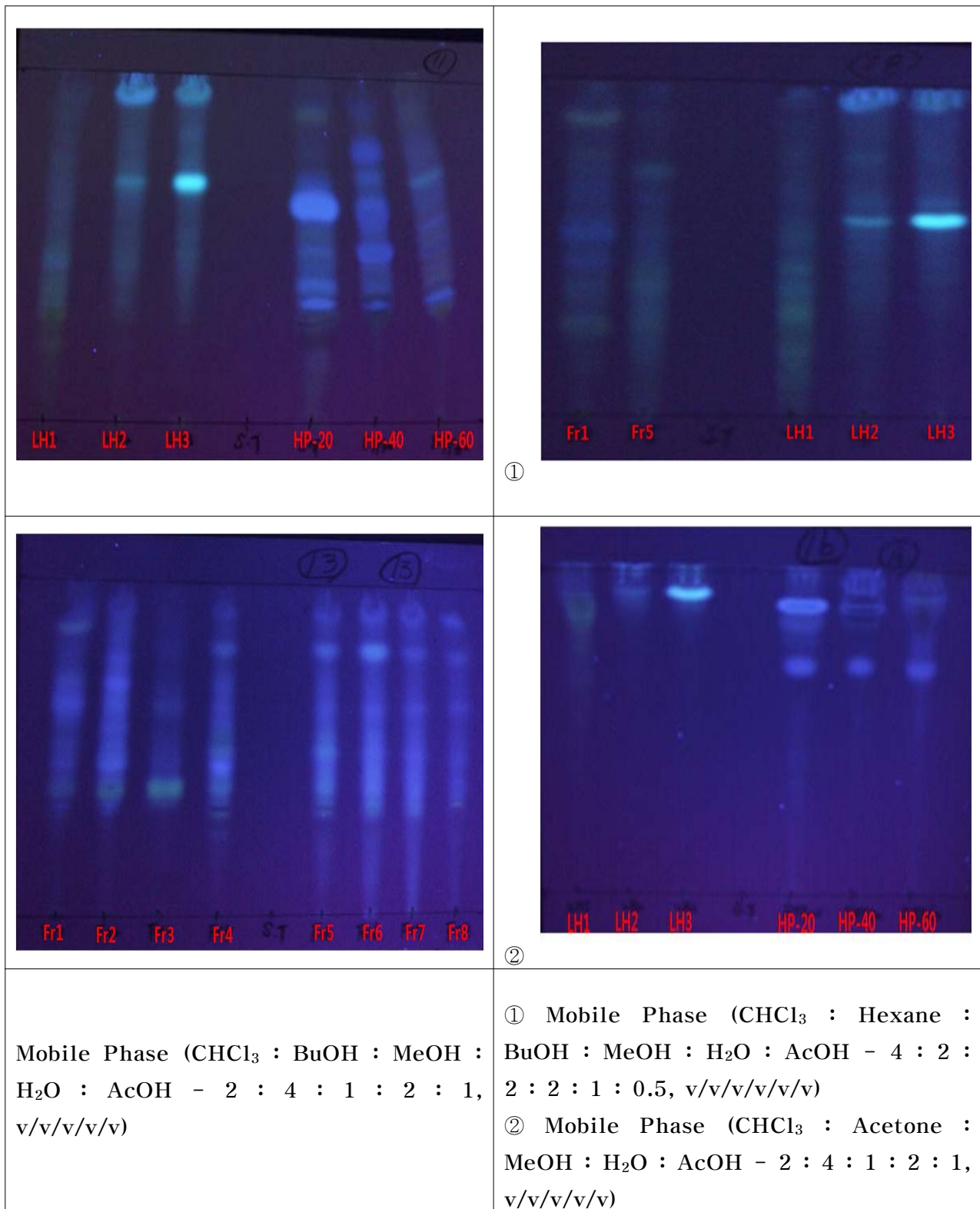


Fig. 18. TLC patten of isolated.

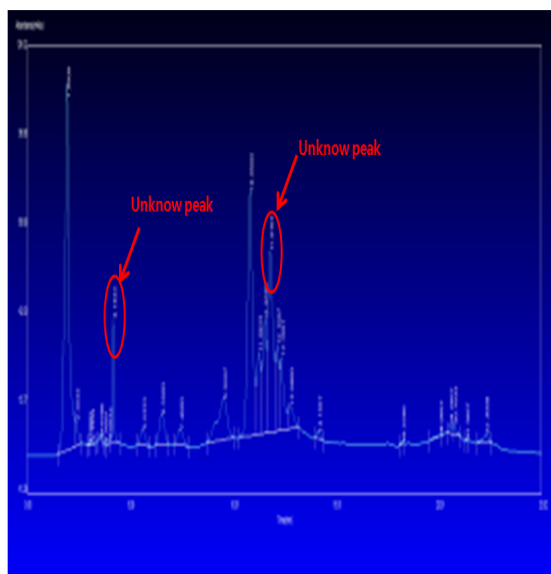
#### 파. HPLC 분석 및 설포라판 함량

TLC 전개 후 UV 254 nm, 334 nm 파장에서 확인 할 수 있었던 HP-20 , 40, 60 정제 추출물의 동일한 Rf(=0.65)를 HPLC ( $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300 mm; flow rate 0.8 ml/min;

inject vol., 10  $\mu$ L; detector, 254 nm)를 통해 분리·정제 하였다. 또한 LH-3의 정제추출물에서 확인된 다른 형광물질도 분리·정제 중이다.

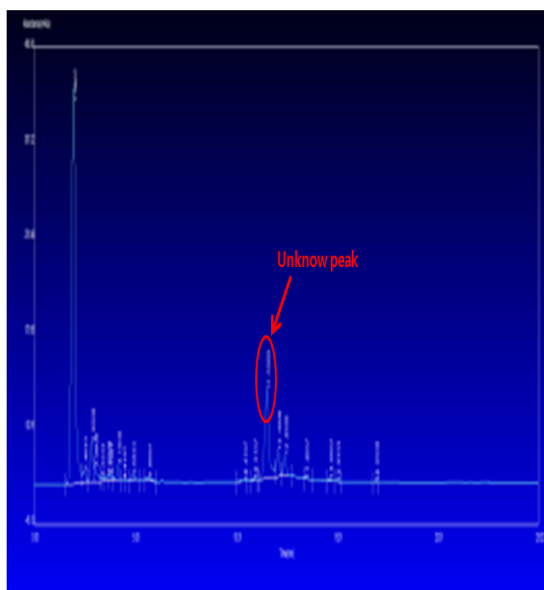
또한, 70% 에탄올 브로콜리 저온열풍건조 추출물을 다공성 입자를 가진 HP-20 resin (H = 26,  $\emptyset$  = 10)에 흡착시켜 에탄올 농도별 (20, 40 %)로 용출하고, Sephadex LH-20 (H = 58,  $\emptyset$  = 1)을 순차적으로 진행하여 최종적으로 HP-20은 8개의 subfractions를 분리하였고, HP-40은 3개의 subfractions를 분리하여 유효성분인 Sulforaphane 함량을 측정한 결과, HP-20은 Fr3 (240 mg/100g) > Fr1 (193 mg/100g) > Fr5 (130 mg/100g) 순으로 나타났으며, HP-40은 LH1 (168 mg/100g) > LH2 (135 mg/100g)의 함량을 보였다.

실험결과 HP-20의 경우, Sephadex LH-20 (H = 58,  $\emptyset$  = 1)으로 정제하기 전에는 설포라판이 검출되지 않았으나, 순차적인 용매에 의한 정제·추출로 설포라판이 용출되는 것을 확인할 수 있었으며, HP-40의 경우, 순차적으로 정제를 하면서 유효성분인 설포라판 함량이 감소하는 것으로 나타났다.



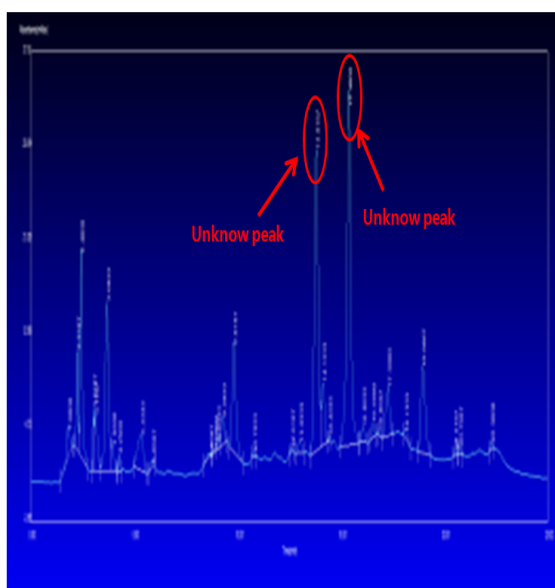
BHP-40

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



LH1

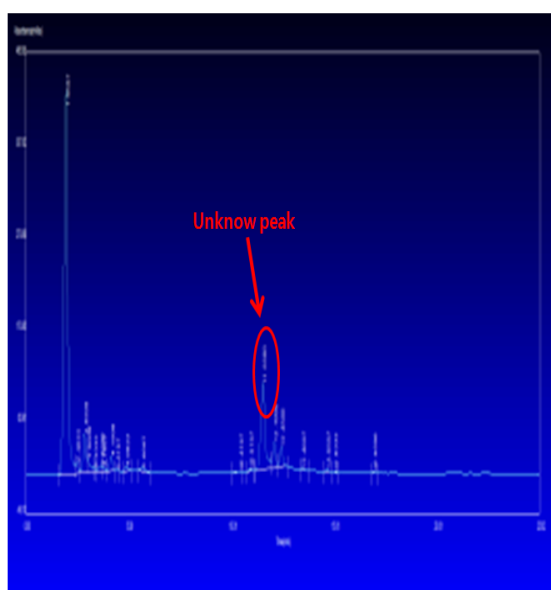
Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



LH3

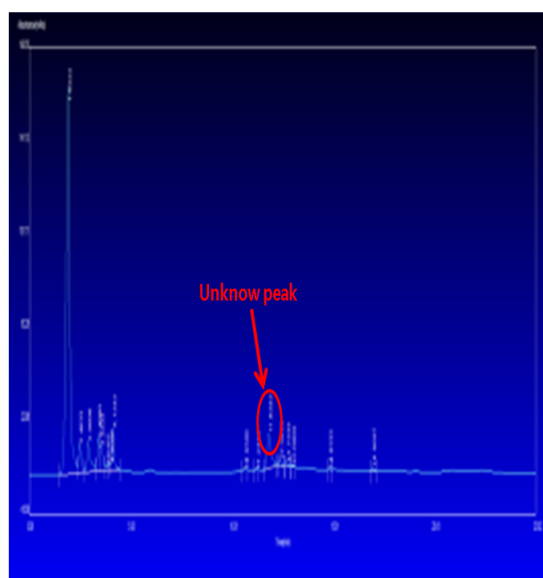
Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min





Fr1

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min



Fr5

Items	Conditions
Instrument	Young-Rin Associates
Column	$\beta$ -Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Mobile phase	Initial step - Acetonitrile / Water (20/80), 16min(Gradient) - Acetonitrile / Water (60/40)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min

Fig. 19. HPLC analysis of each layer from broccoli sprouts.

Table 31. Sulforaphane contents of each fractions purified from glass column chromatogram in broccoli sprouts.

Samples	Sulforaphane (mg/100g, %)
BHP-20, Fr1	193
BHP-20, Fr3	240
BHP-20, Fr5	130
BHP-40, LH1	168
BHP-40, LH2	135

#### 하. GC/MS 분석(기기분석)

Positive ion에서 GC/MS상 분자량 측정 결과, 175.10의 분자량을 갖는 것으로 나타났다 (m/z ; 175.10 [M+H]<sup>+</sup>(Fig. 20). <sup>1</sup>H-NMR(in CHCl<sub>3</sub>-d<sup>6</sup>) 측정결과(Fig. 21)는 1.61 ppm(-OH), 2.01 ppm(m, 2H), 2.88 ppm(t, 2H, J=7.44), 3.74 ppm(t, 2H, J=6.40), 6.98 ppm(s, 1H), 7.14 ppm(dd, 1H, J=7.20, 7.84), 7.22 ppm(dd, 1H, J=7.20, 8.04), 7.36 ppm(d, 1H, J=8.04), 7.64 ppm(d, 1H, J=7.84), 8.01 ppm(-NH) 을 갖는 것으로 나타났다.

<sup>13</sup>C-NMR의 결과는 Fig. 22, Table 31과 같다. 이상의 결과를 종합하여 구조를 결정하였으며, C 11개, H 13개 그리고 NO 1개를 갖는 분자식 C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO 분자량 175.10인 indole계 1H-Indole-3-propanol 로 동정 되었다 (Fig. 22).

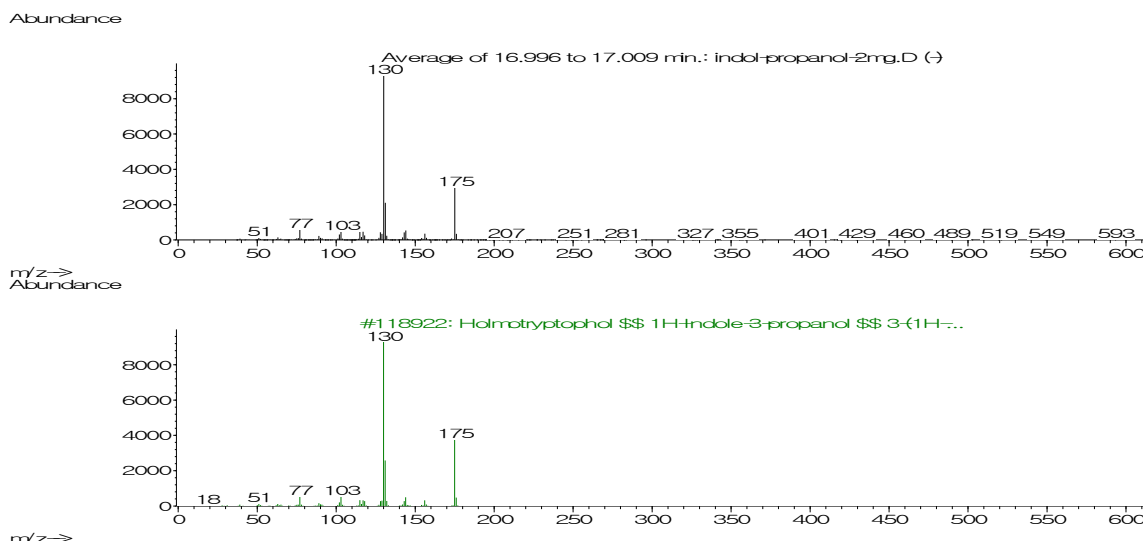


Fig. 20. GC/MS spectrum of Compound

1.61 ppm(-OH), 2.01 ppm(m, 2H), 2.88 ppm(t, 2H,  $J=7.44$ ), 3.74 ppm(t, 2H,  $J=6.40$ ), 6.98 ppm(s, 1H), 7.14 ppm(dd, 1H,  $J=7.20, 7.84$ ), 7.22 ppm(d, 1H,  $J=7.20, 8.04$ ), 7.36 ppm(d, 1H,  $J=8.04$ ), 7.64 ppm(d, 1H,  $J=7.84$ ), 8.01 ppm(-NH)

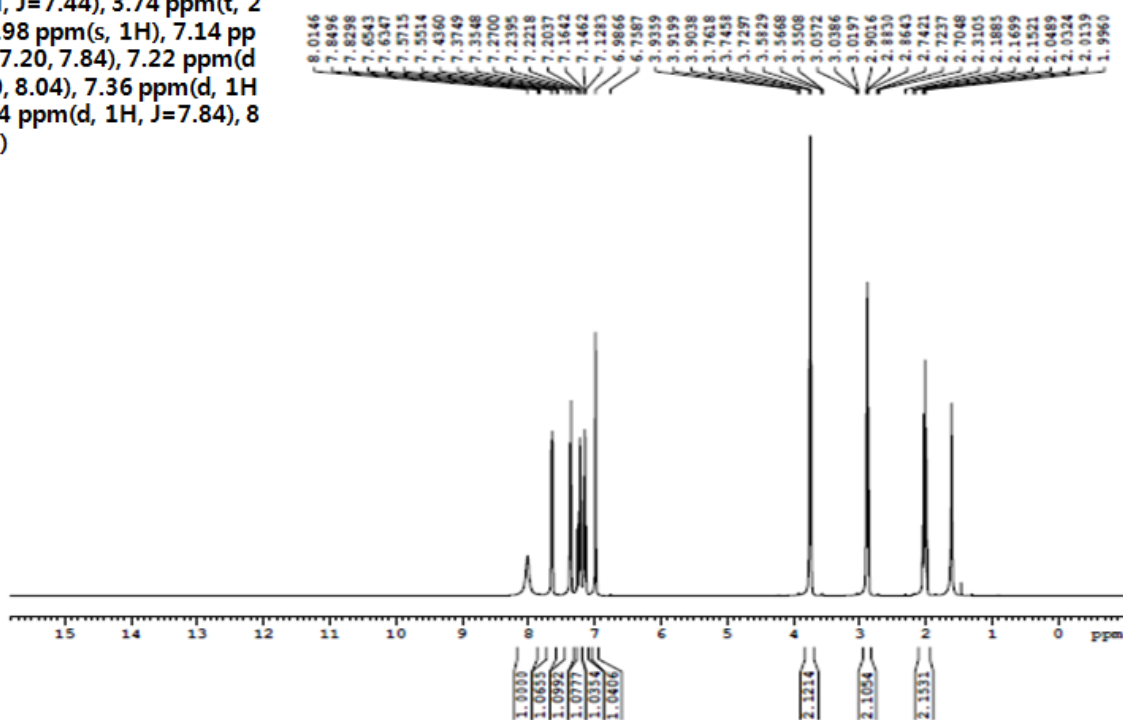


Fig. 21.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of Compound

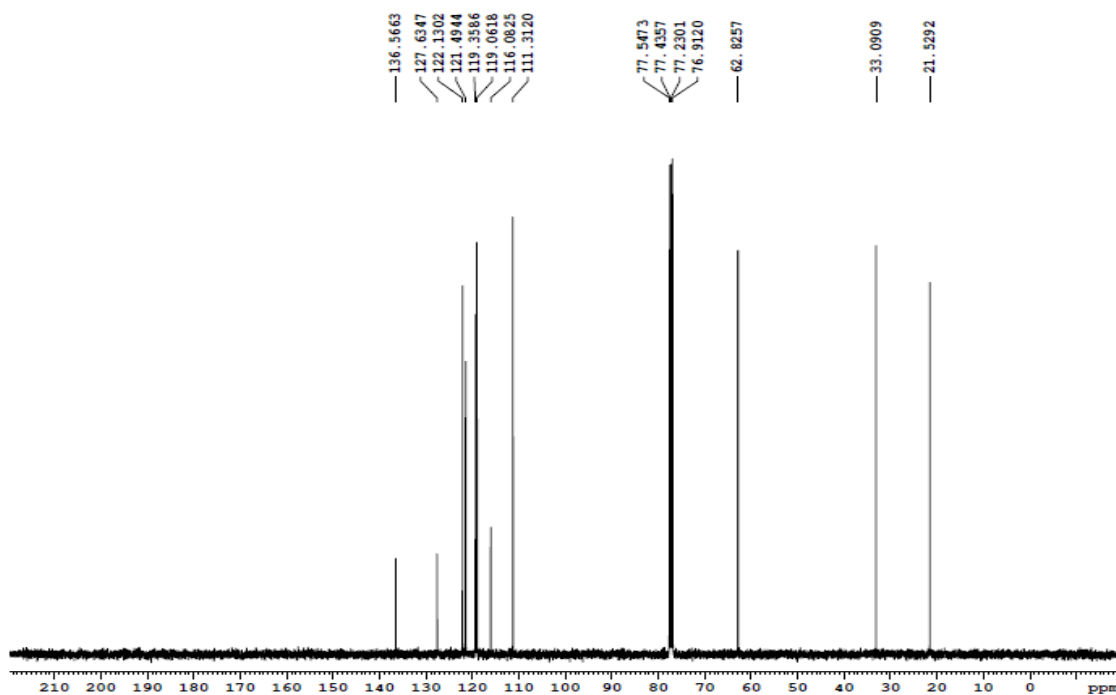


Fig. 22.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of Compound

Table 32.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift for Compound

Position	$\delta$ H, ppm	$\delta$ C, ppm
-NH	8.01	-
C-2	6.98(s, 1H)	122.13
C-3	-	116.08
C-4	7.64(d, 1H, J=7.84)	119.35
C-5	7.14(dd, 1H, J=7.20, 7.84)	121.49
C-6	7.22(dd, 1H, J=7.20, 8.04)	119.0
C-7	7.36(d, 1H, J=8.04)	111.31
C-8	-	127.63
C-9	-	136.56
C-10	2.88(t, 2H, J=7.44)	33.09
C-11	2.01(m, 2H)	21.52
C-12	3.74(t, 2H, J=6.40)	62.82
-OH	1.61	-

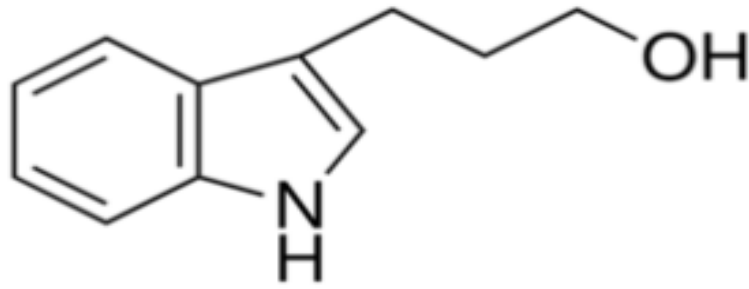


Fig. 23. Structure of Compound

Synonym : 3-(3-Hydroxypropyl)-1H-indole

Chemical family : Indoles

Molecular formula :  $C_{11}H_{13}NO$

Molecular weight : 175.10

## 2. 브로콜리 새싹 추출물의 항 헬리코박터 및 위궤양 개선 효능평가

### 가. *In vitro* *H. pylori* 항균효능

20BSE, 40BSE 및 70BSE의 브로콜리 새싹 추출물을 연속희석하여 *H. pylori*에 대한 항균효능을 평가한 결과, 20BSE에서는  $64 \mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서(Fig. 24), 40BSE에서는  $125 \mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서(Fig. 25), 그리고 70BSE에서는  $1,000 \mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서(Fig. 26) 완전한 균증식 억제효과가 확인되었다. 따라서 브로콜리 새싹 20BSE, 40BSE 및 70BSE의 MIC는 각각  $64$ ,  $125$  및  $1,000 \mu\text{g/mL}$ 로 20BSE > 40BSE > 70BSE의 순으로 *in vitro* 항균효능이 우수하였다.

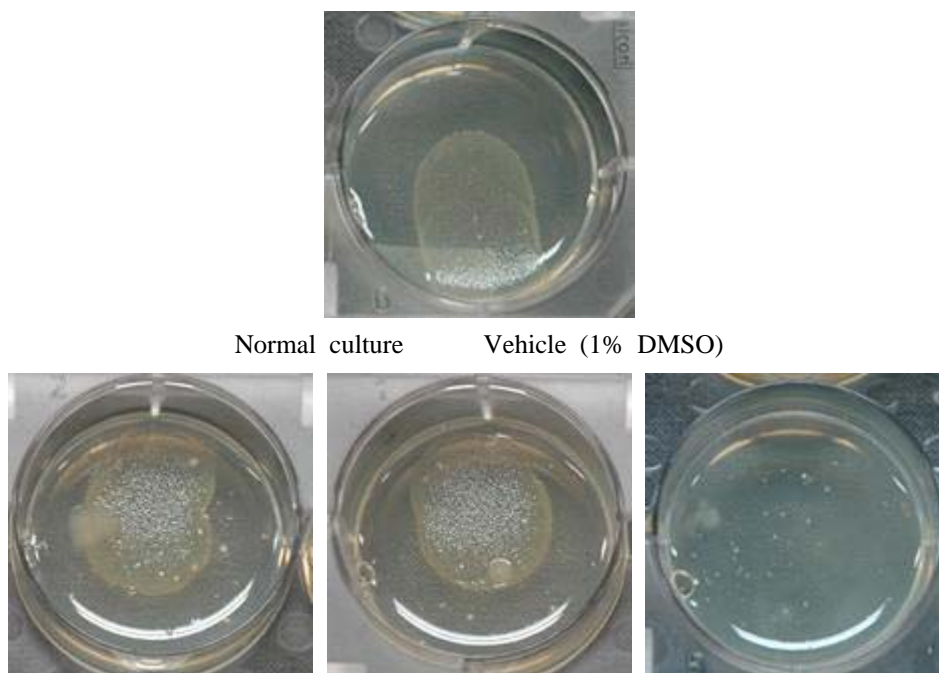


Fig. 24. Inhibition by 20% ethanol extract of broccoli sprout (20BSE) in Agar-dilution assay. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined to be 64  $\mu\text{g/mL}$ .

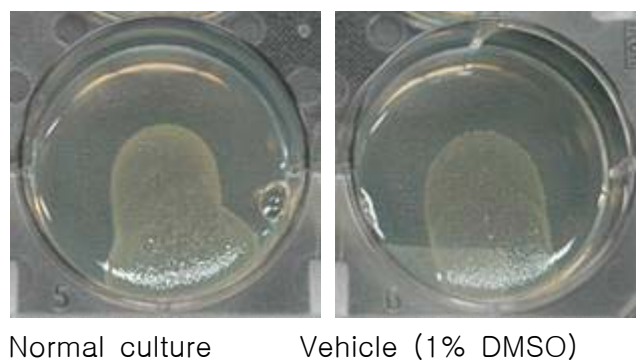


Fig. 25. Inhibition by 40% ethanol extract of broccoli sprout (40BSE) in Agar-dilution assay. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined to be 125  $\mu\text{g/mL}$ .

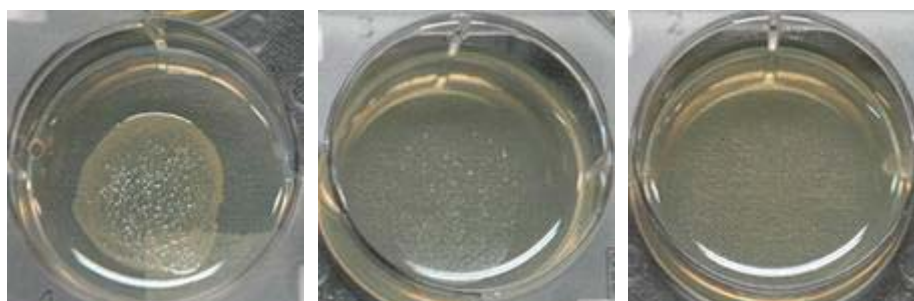
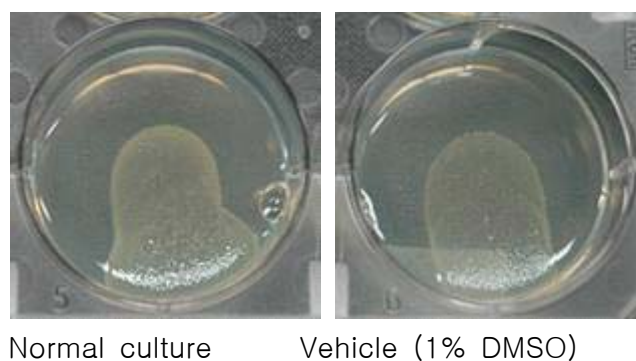


Fig. 26. Inhibition by 70% ethanol extract of broccoli sprout (70BSE) in Agar-dilution assay. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined to be 1,000  $\mu\text{g/mL}$ .

나. *In vitro* urease 억제효능

20BSE, 40BSE 및 70BSE의 에탄올로 추출한 브로콜리 새싹 추출물을 연속희석하여 *H. pylori* 의 urease에 대한 억제효능을 평가한 결과, 20BSE에서는  $y = -0.2025x + 3.2563$  ( $R^2 = 0.9135$ ) (Fig. 27), 40BSE에서는  $y = -0.1517x + 3.0539$  ( $R^2 = 0.9068$ ) (Fig. 28), 그리고 70BSE에서는  $y = -0.0569x + 2.7155$  ( $R^2 = 0.7474$ ) (Fig. 29)의 억제곡선을 나타내었다. 따라서 브로콜리 새싹 20BSE, 40BSE 및 70BSE의 IC<sub>50</sub>은 각각 350, 700 및 >2,000  $\mu\text{g/mL}$ 로 20BSE > 40BSE > 70BSE의 순으로 효소억제력이 높았다.

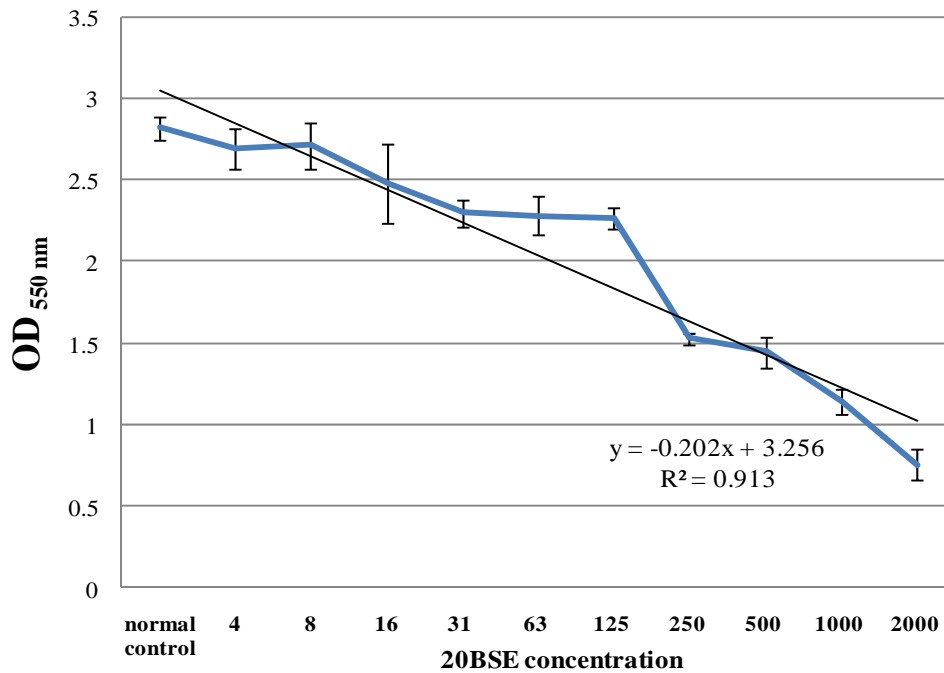


Fig. 27. Inhibition by 20%ethanol extract of broccoli sprout (20BSE). Median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined to be 350  $\mu\text{g/mL}$ .



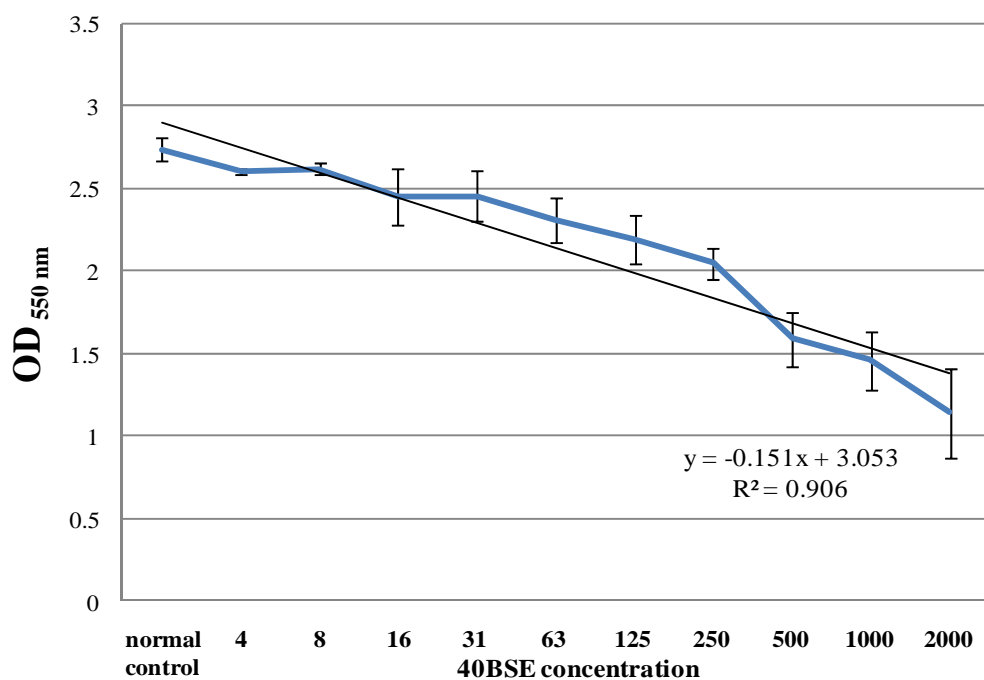


Fig. 28. Inhibition by 40% ethanol extract of broccoli sprout (40BSE). Median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was determined to be 700  $\mu\text{g/mL}$ .

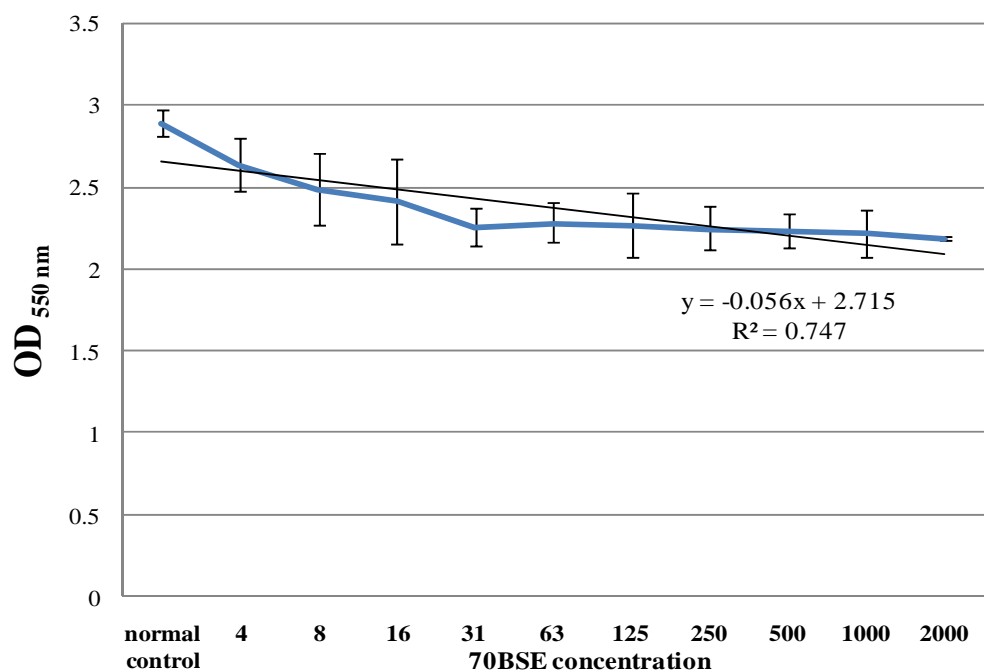


Fig. 29. Inhibition by 70% ethanol extract of broccoli sprout (70BSE). Median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was determined to be higher than 2,000  $\mu\text{g/mL}$ .

다. *In vivo* *H.pylori* 균체 제거효능

7일간 1일 2회씩 3단계 용량의 시험물질을 경구로 투여한 결과, 100 mg/kg의 40BSE 투여군에서 일시적인 체중감소가 나타났으나 유의하지 않았고, 부검 후 주요 장기의 중량에서 비장의 중량이 약간 높았지만 의미가 없었다(data not shown). 마우스의 위점막으로부터 *H. pylori* 감염 여부를 urease test를 응용한 CLO test kit로 분석한 결과, 용매대조군에서는 한 마리에서 약한 반응이 나타났지만 100% (6/6)의 의 동물이 양성반응 보였다(Table 33). 반면, 10, 30 및 100 mg/kg의 20BSE 투여군에서는 각각 50% (3/6), 66.7% (4/6) 및 33.3% (2/6)만이 양성반응을 보였으며, 반응도 상대적으로 미약하였다. 40BSE는 가장 우수하여 10, 30 및 100 mg/kg에서 각각 16.7% (1/6), 33.3% (2/6) 및 16.7% (1/6)가 양성반응을 보여 주어 효과적으로 균체가 제거되는 것으로 여겨졌다. 이에 비해 70BSE 투여군에서는 10, 30 및 100 mg/kg에서 각각 50% (3/6), 33.3% (2/6) 및 33.3% (2/6)가 양성반응을 보여 주었다. 비교물질과의 상대적인 비교에서 100 mg/kg의 40BSE는 임상에서 사용되고 있는 30 mg/kg의 pantoprazole과 유사한 효과를 보여 주었다.

Table 33. Reactivity in CLO test on the gastric mucosa of mice infected with *H. pylori* followed by treatment with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (30 mg/kg)

Treatment (mg/kg)	1	2	3	4	5	6	Positive ratio
Vehicle control	●	●	●	●	●	●	6/6
+20BSE (10)	◐	◐	◐	○	○	○	3/6
+20BSE (30)	●	◐	◐	◐	○	○	4/6
+20BSE (100)	●	◐	○	○	○	○	2/6
+40BSE (10)	●	○	○	○	○	○	1/6
+40BSE (30)	●	◐	○	○	○	○	2/6
+40BSE (100)	◐	○	○	○	○	○	1/6
+70BSE (10)	●	◐	◐	○	○	○	3/6
+70BSE (30)	●	◐	○	○	○	○	2/6
+70BSE (100)	◐	◐	○	○	○	○	2/6
+PTZ (30)	◐	○	○	○	○	○	1/6

Broccoli sprout was extracted with 20, 40 or 70% ethanol. ○, negative; ◐, partially positive; ● positive.

하지만 CLO kit를 이용한 *H. pylori* 검출은 음식물을 섭취하여 위 내 산도가 떨어졌을 때 생존할 수 있는 다른 urease 생성균이나 사멸한 *H. pylori*로부터 유래한 urease에 의해서도 반응이 나타날 수 있어 Giemsa 염색을 통해 균체를 확인하였다. 그 결과, CLO kit와 감염비율에 있어 약간의 차이는 있었지만 유사한 양상을 보여 주었다. 즉, 용매대조군에서는 100% (6/6)의 동물에서 균체가 확인되었고, 10, 30 및 100 mg/kg의 20BSE 투여군에서는 각각 50% (3/6), 66.7% (4/6) 및 50% (3/6)의 동물에서 감염이 확인되었다(Table 34 및 Fig. 30). 40BSE 투여군에서는 10, 30 및 100 mg/kg에서 각각 50% (3/6), 33.3% (2/6) 및 16.7% (1/6), 100BSE 투여군에서는 10, 30 및 100 mg/kg에서 각각 50% (3/6), 33.3% (2/6) 및 33.3% (2/6)에서 균체가 확인되어 전체적으로 40BSE가 가장 우수하였다. CLO kit를 활용한 검출에서처럼, 위점막에서의 균체확인법에서도 비교물질과의 상대적인 비교에서 100 mg/kg의 40BSE가 30 mg/kg pantoprazole의 효과와 유사한 것으로 나타났다.

Table 34. Histological identification of bacteria in the gastric mucosa from mice infected with *H. pylori* followed by treatment with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (30 mg/kg)

Treatment (mg/kg)	1	2	3	4	5	6	Positive ratio
Vehicle control	+	+	+	+	+	+	6/6
+20BSE (10)	+	+	+	-	-	-	3/6
+20BSE (30)	+	+	+	+	-	-	4/6
+20BSE (100)	+	+	+	-	-	-	3/6
+40BSE (10)	+	+	+	-	-	-	3/6
+40BSE (30)	+	+	-	-	-	ND	2/5
+40BSE (100)	+	-	-	-	-	-	1/6
+70BSE (10)	+	+	+	-	-	-	3/6
+70BSE (30)	+	+	-	-	-	-	2/6
+70BSE (100)	+	+	-	-	-	-	2/6
+PTZ (30)	+	-	-	-	-	-	1/6

Broccoli sprout was extracted with 20, 40 or 70% ethanol. ND, not determined.

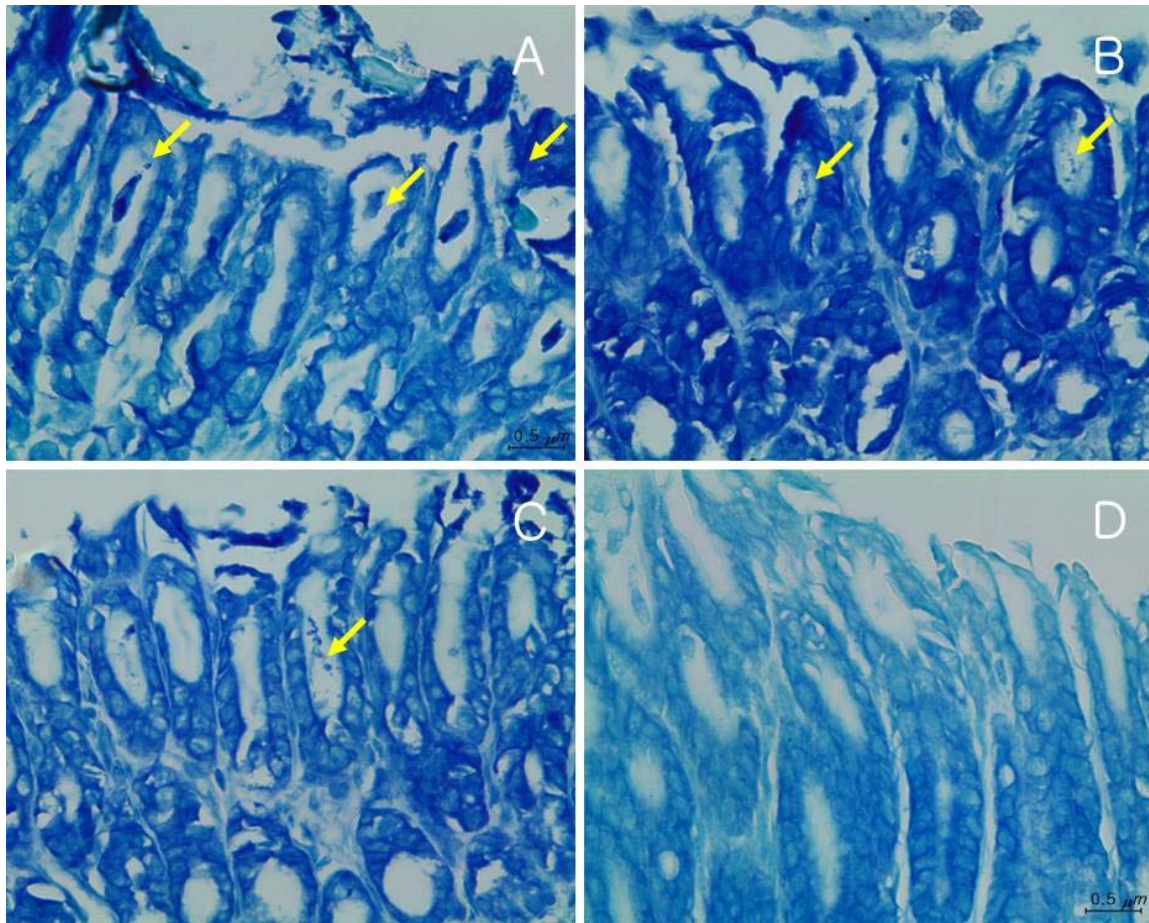


Fig. 30. Representative histological identification of bacteria in the gastric mucosa from mice infected with *H. pylori* SS1 (arrows). A, vehicle; B, 30 mg/kg 20BSE C, 100 mg/kg 40BSE D, 30 mg/kg pantoprazole.

*H. pylori* 균체 제거가 위점막 손상의 완화에 도움이 되는지를 확인하기 위해 위점막을 확대경으로 관찰한 결과, 용매대조군의 위점막은 국소적으로 충·출혈 소견을 보여 주었다(Fig. 31A). 한편, 중간용량(30 mg/kg)의 20BSE를 투여한 군에서도 유사한 병변이 관찰되었지만(Fig. 31B), 고용량(100 mg/kg)의 40BSE (Fig. 31C)나 30 mg/kg의 pantoprazole (Fig. 31D)을 투여한 동물에서는 전혀 이상소견이 나타나지 않았다. 하지만 이러한 병변은 시험물질의 투여와 상관없이 *H. pylori* 균체의 유무와 상관성을 보이는 것으로 확인되었다.

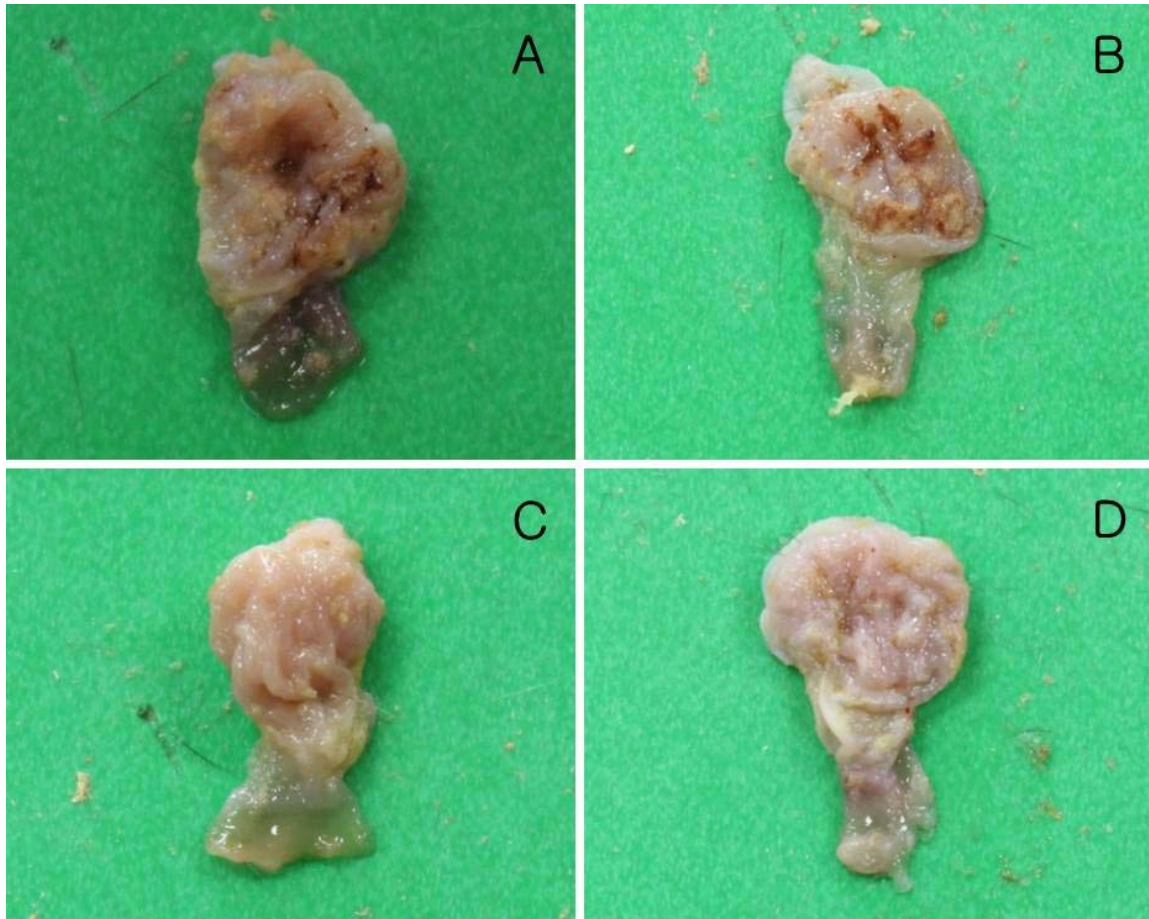


Fig. 31. Representative findings of the gastric mucosa from mice infected with *H. pylori*. A, vehicle; B, 30 mg/kg 20BSE; C, 100 mg/kg 40BSE; D, 30 mg/kg pantoprazole.

#### 라. *In vitro* 위액분비 억제

BSE가 *H. pylori* 감염에 따른 위점막 손상을 효과적으로 억제함에 따라 위산과다로 인한 위염 및 위궤양에도 유효한지를 규명하기 위해 유문부 결찰모델에서의 위산분비 및 위궤양 억제효과를 평가하였다. 랫드의 유문부를 결찰한 후 6시간만에 위액량이 약 11.43 mL 저류되었다(Fig. 32). 이러한 위액분비는 시험물질인 BSE (10-100 mg/kg)와 pantoprazole (30 mg/kg) 투여에도 변하지 않았다. 한편, 용매만을 투여한 동물의 위액 pH는 1.37이었으며, free HCl은 91.0 mmol/L, total acidity는 120.3 mmol/L HCl을 나타냈다(Fig. 33-35 및 Table 35). 이러한 위액의 산도에 대해 모든 종류 및 용량의 BSE는 전혀 영향을 미치지 않았다. 반면, 비교물질인 pantoprazole (30 mg/kg)은 pH를 2.59로 크게 높였으며, free HCl을 32.3 mmol/L로, acidity를 67.3 mmol/L HCl으로 유의하게 낮추어 강력한 proton pump inhibitor로서의 효능을 보여 주었다. 따라서 시험물질인 BSE는 pantoprazole과 달리 proton pump에는 영향을 미치지 않음이 밝혀졌다.

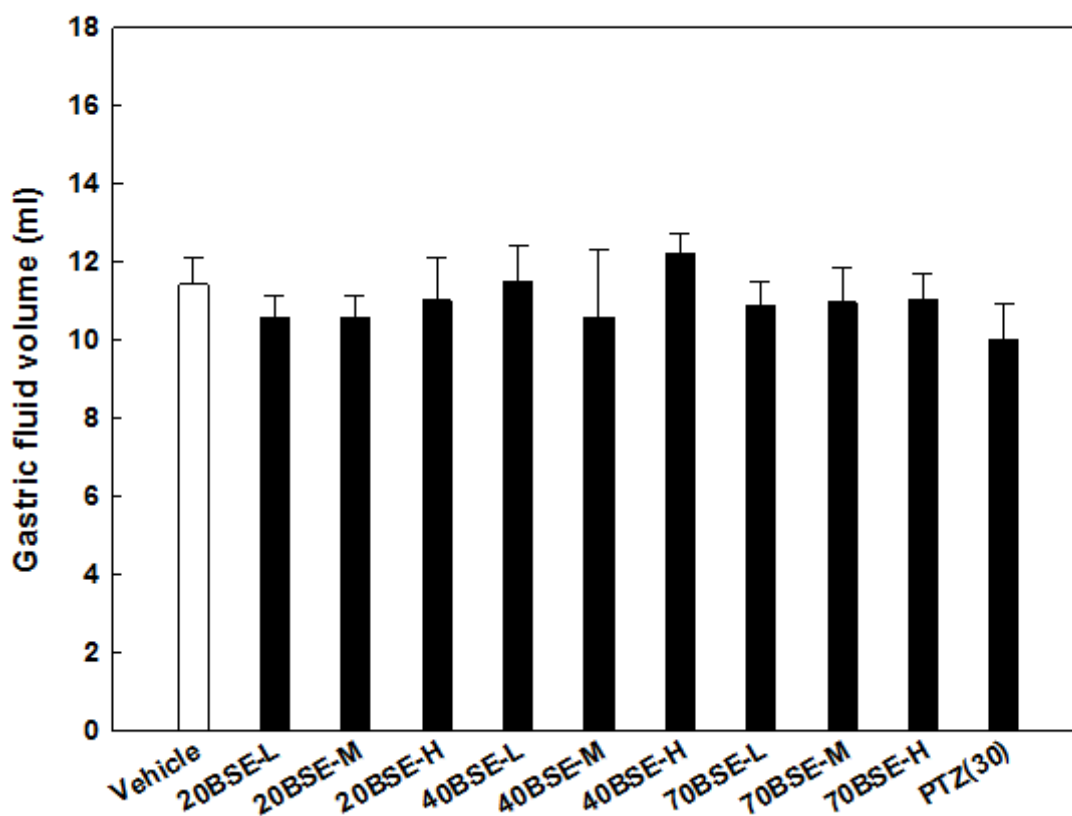


Fig. 32. Volume of gastric fluid collected 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.

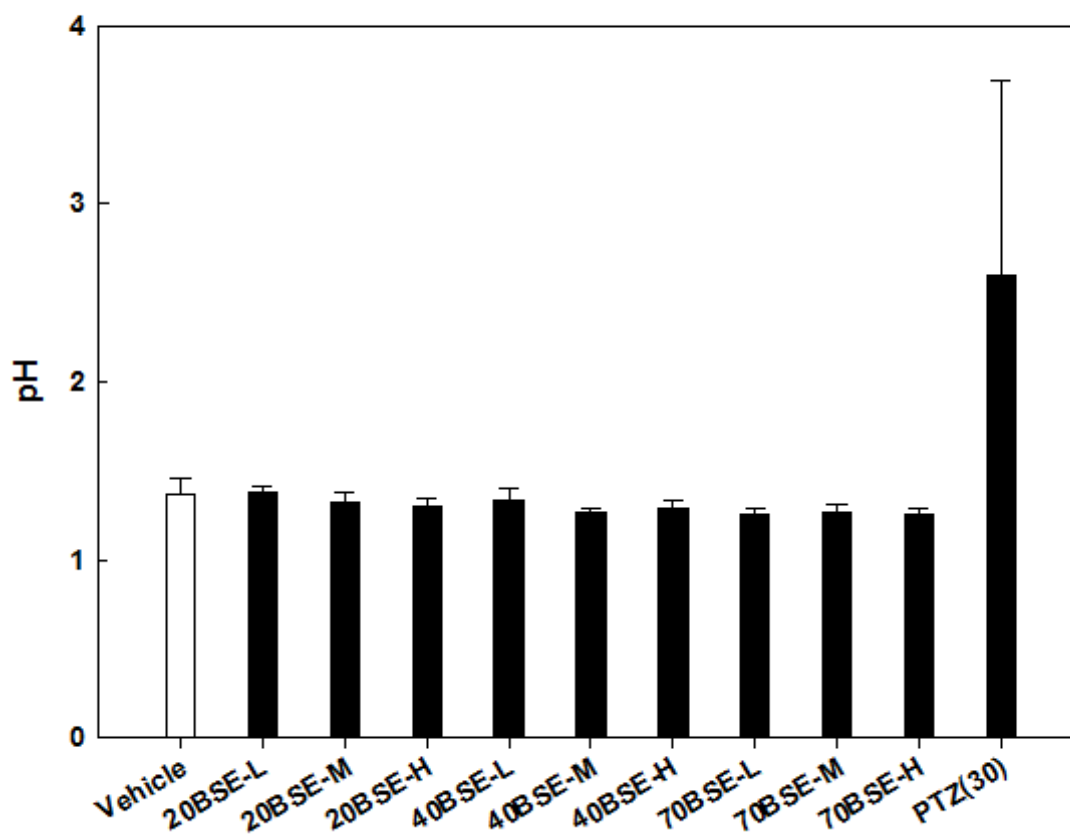


Fig. 33. pH of gastric juice collected 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.

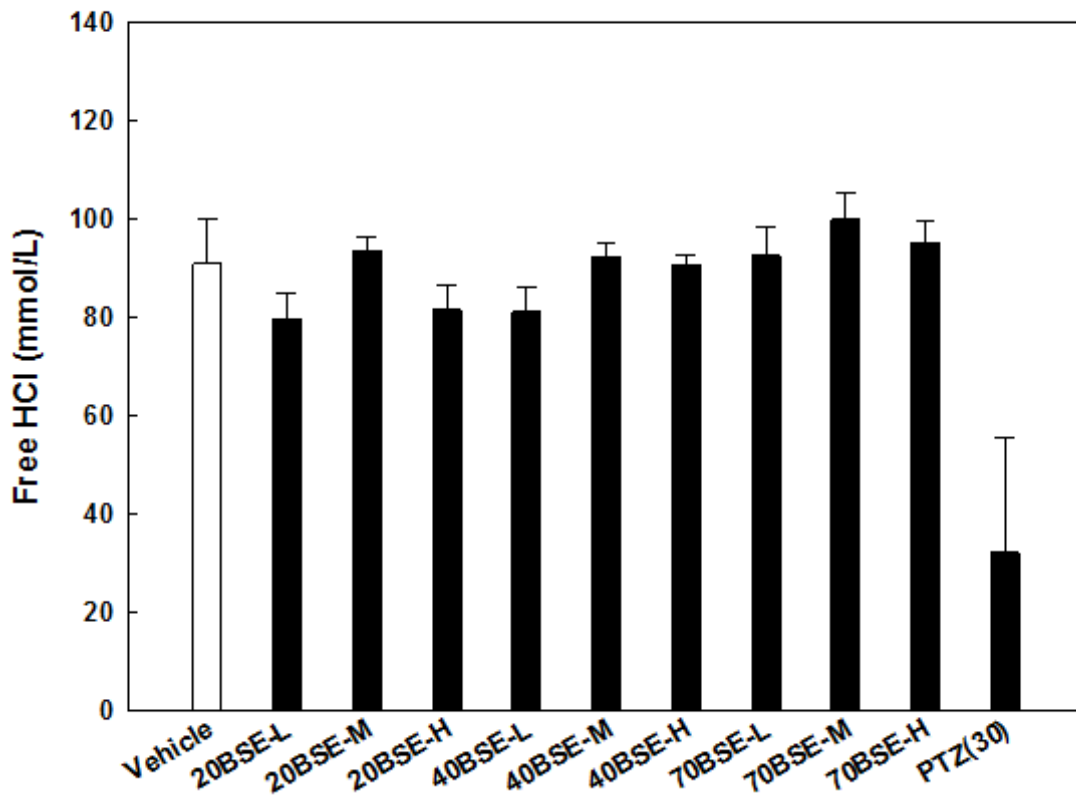


Fig. 34. Free HCl concentration in the gastric juice collected 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.



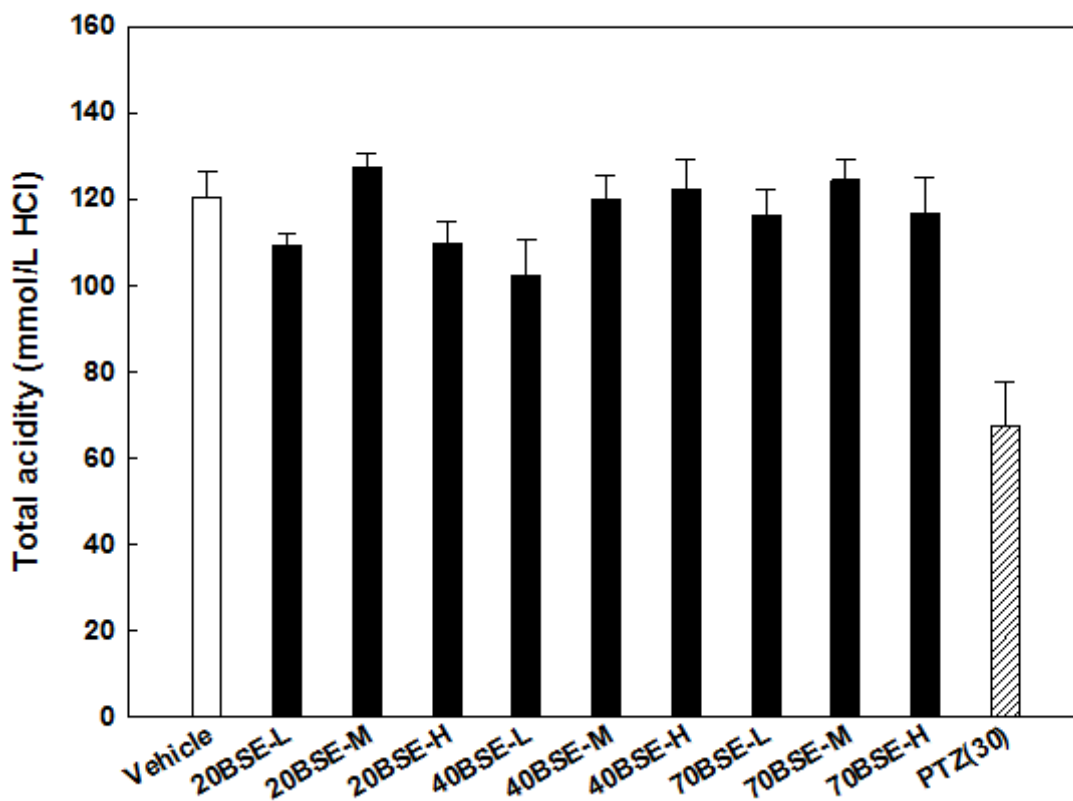


Fig. 35. Total acidity of gastric juice collected 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.

Table 35. Volume and acidity of gastric juice collected 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole(30 mg/kg)

Treatment (mg/kg)	Gastric fluid volume (mL)	pH	Free HCl (mmol/L)	Total acidity (mmol/L HCl)
Vehicle	11,43±0,69	1,37±0,09	91,0±9,2	120,3±5,9
+20BSE (10)	10,57±0,56	1,38±0,03	79,7±5,4	109,3±2,5
+20BSE (30)	10,60±0,54	1,32±0,05	93,7±2,8	127,3±3,1
+20BSE (100)	11,02±1,10	1,31±0,04	81,7±5,3	109,7±5,3
+40BSE (10)	11,52±0,88	1,34±0,06	81,3±5,1	102,3±8,1
+40BSE (30)	10,61±1,70	1,27±0,02	92,3±2,8	120,0±5,3
+40BSE (100)	12,23±0,48	1,29±0,04	90,7±2,0	122,3±6,7
+70BSE (10)	10,89±0,62	1,26±0,03	92,7±5,6	116,3±5,8
+70BSE (30)	10,97±0,92	1,27±0,04	100,0±5,3	124,3±5,0
+70BSE (100)	11,07±0,64	1,26±0,03	95,2±4,4	116,8±8,1
+Pantoprazole (30)	10,03±0,93	2,59±1,10	32,3±23,4*	67,3±10,3*

Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol. \*Significantly different with control (P <0.05).

6시간 동안의 pylorus ligation 결과, 용매대조군에서는 ulcer index 약 3.5 mm의 궤양이 유발되었다(Fig. 36). 이러한 위궤양에 대해 20BSE는 10 mg/kg에서는 방어효과를 나타내지 못하였으나, 30-100 mg/kg에서는 대조군의 절반 수준으로 위궤양을 완화시켰다. 이에 비해 40BSE는 더 좋은 효능을 보여 주었는데, 10-30 mg/kg에서는 약 50%, 100 mg/kg에서는 약 70%의 억제효과를 나타내었다. 한편, 70BSE는 가장 강력하게 위궤양을 완화시켰는 바, 10-100 mg/kg에서 75-90%의 탁월한 억제효과를 발휘하였다. 특히 100 mg/kg 70BSE는 시판제품인 pantoprazole (30 mg/kg)에 버금가는 효능을 보여 주었다.

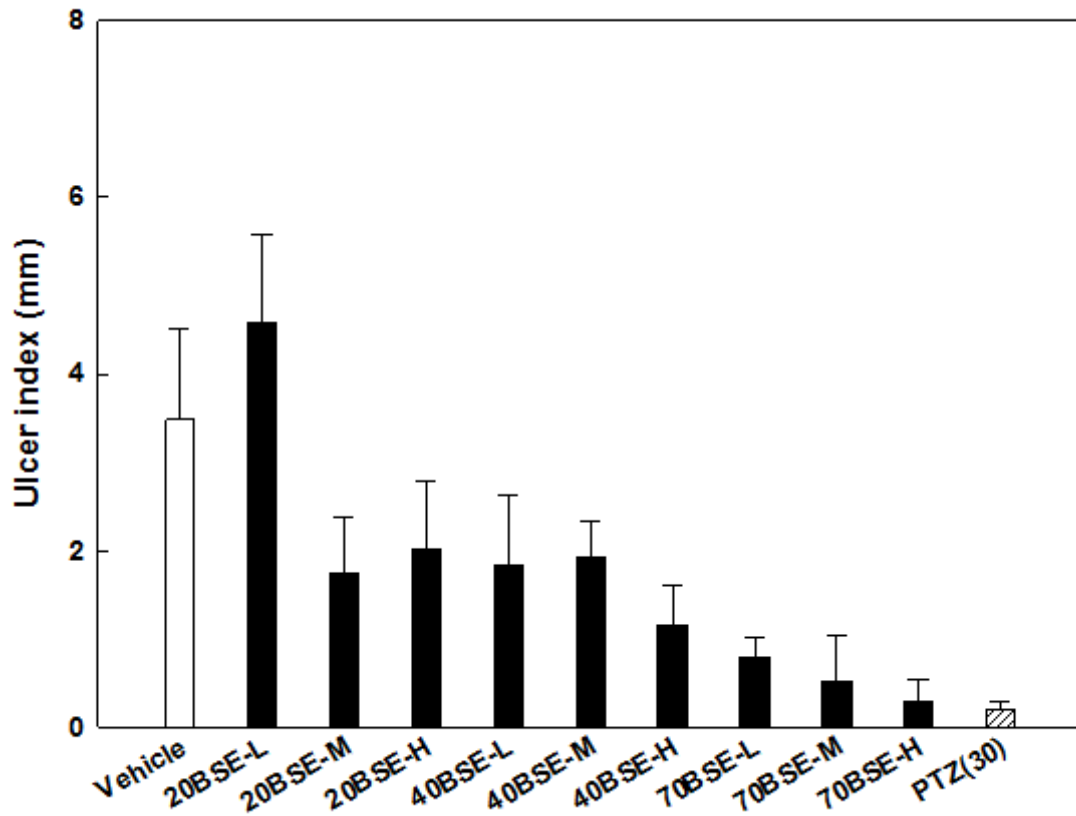


Fig. 36. Ulcer index of the gastric mucosa 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.

Two-step scoring system을 이용한 조직병리학적 위점막 손상 평가에서 용매대조군의 손상지표는 평균 4.0에 이르렀다(Fig. 37). 이러한 위산분비에 따른 위점막 손상에 대해 모든 용량(10-100 mg/kg)의 20BSE와 40BSE는 효과를 나타내지 못한 데 비해, 70BSE는 용량의존적 방어효과를 보여 주었다. 특히 100 mg/kg의 70BSE는 비교물질인 30 mg/kg의 pantoprazole과 동일한 효과를 나타냈다.

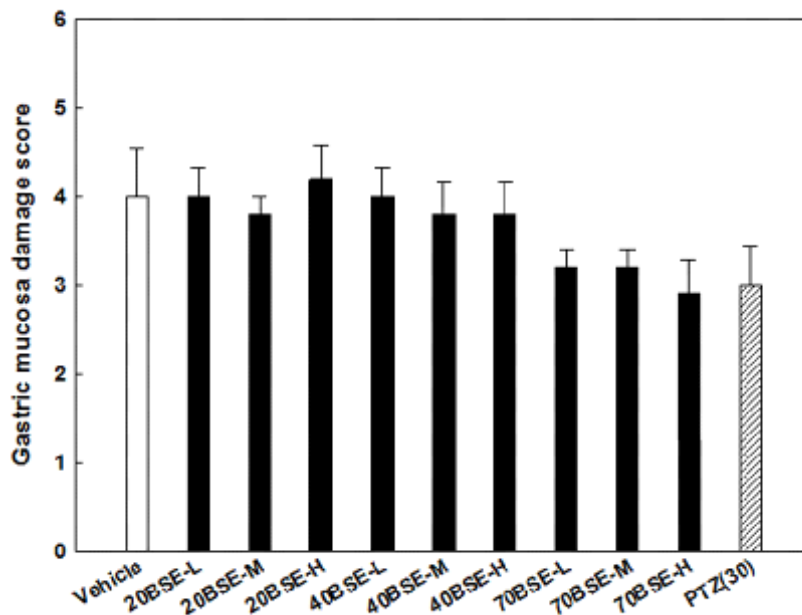


Fig. 37. Gastric mucosal damage 6 hours after pylorus ligation in rats treated with broccoli sprout extract (BSE, 10-100 mg/kg) or pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg). Broccoli sprout was extracted with 20%, 40% or 70% ethanol.

본 연구로부터 브로콜리 새싹 추출물이 *H. pylori* 균에 대한 직접적인 항균효능을 가지고 있음이 입증되었다. 이러한 효과는 추출용매인 에탄올의 농도를 1차 추출에서 70%로 했다가 2차 추출에서 20%로 낮추었을 때 가장 높아서 일부 수용성 성분이 주요 항균활성을 나타낼 것으로 판단된다. *H. pylori*는 urease라는 효소를 분비하여 위내 산성 환경에서 생존하며, 위점막을 침습하여 위염과 위궤양을 유발하고 만성적으로 위암 발생에 기여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 urease 억제활성 역시 20% 에탄올 추출물에서 높게 나타나 브로콜리 새싹 추출물의 항균효능이 일부 urease 억제에 따른 균체의 에너지 대사와 관련 있는 것으로 여겨진다. 하지만 20BSE의 경우 urease 억제는  $350 \mu\text{g/mL}$ 에서 IC50를 보이는 데 비해, 항균활성은  $64 \mu\text{g/mL}$ 에서 MIC를 나타냄으로써 urease 억제가 항균활성에 크게 기여하지는 못하는 것으로 판단되어 다른 항균기전에 대한 연구가 요구된다. 한편, 마우스 감염모델에서 위점막 생검조직에 대한 CLO kit 검출법과 현미경을 이용한 직접적인 균체확인 결과, 20%, 40% 및 70% 에탄올 추출물 모두 균체제거 효과를 보여 주었는데, 40BSE가 20BSE와 70BSE에 비해 다소 우수하였으며, 특히 100 mg/kg의 40BSE는 30 mg/kg의 pantoprazole과 유사한 효능을 보여 주었다. 이러한 추출용매 에탄올의 농도에 따른 in vivo 균체제거 효능은 in vitro 항균효능과 차이를 보임으로써 균체제거 효과가 단순히 항균 효과에만 기인하지 않음을 시사한다. 특히 위산분비에 대한 영향에 있어서 브로콜리 새싹 추출물은 위액량, pH, free HCl 및 total acidity에 전혀 영향을 미치지 않음으로써 proton pump inhibitor인 pantoprazole과는 다른 기전을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 흥미롭

제도, BSE는 위산분비에 영향을 미치지 않음에도 위산과다로 인한 위궤양을 탁월하게 예방하였는데, *in vitro* 항균효능이 탁월한 20BSE나 *in vivo* 군체제거 효과가 뛰어난 40BSE보다 70BSE가 더 우수하였다. 이는 20BSE가 직접적인 항균효능을, 40BSE가 군체의 위점막 침투 억제효과를, 그리고 70BSE가 위점막 보호효과를 나타내는 서로 다른 기전을 가지고 있음을 의미한다. 위염과 위궤양에 관련하는 *H. pylori*의 치료에는 proton-pump inhibitors (pantoprazole, omeprazole, lansoprazole 등)와 항생제 (clarithromycin, metronidazole, amoxicillin 등)으로 구성되는 triple therapy가 이루어지고 있다. 그러나, 이러한 triple therapy에 사용되는 항생제는 박테리아의 내성을 증가시켜 치료율을 점차 감소시킨다. 브로콜리, 특히 브로콜리 새싹에 많이 함유된 sulforaphane 및 그 유도체는 *H. pylori*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus* 등과 같은 bacteria나 fungi에 강력한 항균 및 항 곰팡이 효능을 지니고 있으며, 내성을 가진 균에 대해서도 그 효과가 보고되고 있다. 하지만 본 연구에서 나타난 브로콜리 새싹 에탄올 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균효능은 정제된 sulforaphane이나 그 유도체에 비해 미약한 수준이었던 바, 이는 추출방법 및 용매에 따라 그 차이가 심하기 때문으로 생각된다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 사용한 브로콜리 새싹 에탄올 추출물은 100 mg/kg에서 기존의 시판품인 30 mg/kg pantoprazole에 버금가는 *in vivo* 군체제거 및 위염/위궤양 개선효능을 보여 주었다. 흥미롭게도 용매인 에탄올의 농도가 20%, 40% 및 70%로 달라짐에 따라 *in vitro* 항균효능, *in vivo* 군체 제거효능 및 *in vivo* 위점막 보호효능 등에 차이가 있었는데, 브로콜리 새싹 에탄올 추출물은 위의 3가지 기전을 통해 복합적인 효능을 발휘하는 것으로 판단된다.

## 2. 기전별 위궤양 개선 효능 평가

### 가. Alcohol-induced gastric ulcer에 대한 개선 효능

48시간동안 절식시킨 랫드에 ethanol (EtOH, 3 ml/kg)을 경구 투여한 다음 2시간이 경과한 후에 위를 적출하여 분석한 결과, vehicle만을 투여한 대조군에서는 심각한 위궤양(출혈병변)이 관찰되었으며, 위궤양지수(ulcer index)로 환산하였을 때  $53.3 \pm 7.9$  mm를 나타내었다(Fig 38A & 39). 이에 반해 브로콜리 새싹 추출물 40BSE를 위궤양 유도 30분 전에 투여한 경우에는 30 mg/kg에서  $15.6 \pm 7.3$  mm, 100 mg/kg에서  $6.7 \pm 5.0$  mm, 300 mg/kg에서  $1.7 \pm 0.8$  mm로 대조군에 비해 각각 70.7%, 87.4% 및 96.8%의 억제율을 보여 농도의존적인 위보호 효과가 확인되었다(Fig 38B, 38C & 39). 70BSE 투여군에서도 30 mg/kg에서  $45.2 \pm 7.6$  mm (15.2%), 100 mg/kg에서  $24.6 \pm 6.8$  mm (53.8%), 300 mg/kg에서  $1.1 \pm 0.8$  mm (97.9%)로 농도의존적인 위보호 효과가 확인되었다(Fig 38D & 39). 또한, J-BSE 투여한 군은 농도의존적이지는 않으나, 30 mg/kg에서  $25.5 \pm 3.5$  mm, 300 mg/kg에서  $31.2 \pm 6.7$  mm로 각각 52.2%와 41.5%의 억제효과를 나타냈으며(Fig 38E & 39), pantoprazole (PTZ, 30 mg/kg)을 투여한 비교물질군에서

도  $22.5 \pm 5.3$  mm (57.8%)로 보호효과가 확인되었다(Fig 38F & 39). 이러한 위궤양 병변에 대한 방어효과에 있어서 40BSE는 저용량(30 mg/kg)에서부터 탁월한 효과를 보인데 비해 70BSE는 용량-반응 관계가 가파르게 나타났으며, J-BSE는 용량별 차이가 별로 없이 효과가 상대적으로 약하였다.

위궤양에 따르는 혈관 누출량(vascular leakage)을 정량적으로 제시하기 위해 누출된 Evan's blue를 용출시켜 측정된 결과 정상동물에 비해 ethanol 노출시 약 2.5배 증가하였다(Fig 40). 이러한 혈관 누출반응이 BSE와 PTZ 투여군에서는 위궤양 병변지수와 유사한 경향으로 개선되었는데, 100 mg/kg과 300 mg/kg의 40BSE와 70BSE, 그리고 30 mg/kg PTZ 투여군에서 유의한 감소효과가 확인되었다.

한편, BSE의 위궤양 개선효과가 위점액 보호에 의한 것인지를 확인하기 위해 mucus-bound Alcian blue를 용출시켜 mucus contents를 측정된 결과, ethanol 노출에 의해 위점액량이 35.3% 수준으로 크게 줄어들었다(Fig 41). 이러한 점액량 감소에 대해 40BSE는 용량의존적으로 회복효과를 나타낸 반면, 70BSE와 PTZ는 거의 효과를 발휘하지 못하였으며, J-BSE는 중간용량(100 mg/kg)에서만 유의적인 효능을 나타냈다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, 알콜성 위궤양 개선에 있어 브로콜리 새싹 추출물은 40BSE > 70BSE > J-BSE의 순으로 우수한 것으로 확인되었는 바, 40BSE는 70BSE나 J-BSE와 상당히 다른 성분을 함유하고 있는 것으로 여겨지며, PTZ와 다른 기전으로 작용하는 것으로 추정된다.

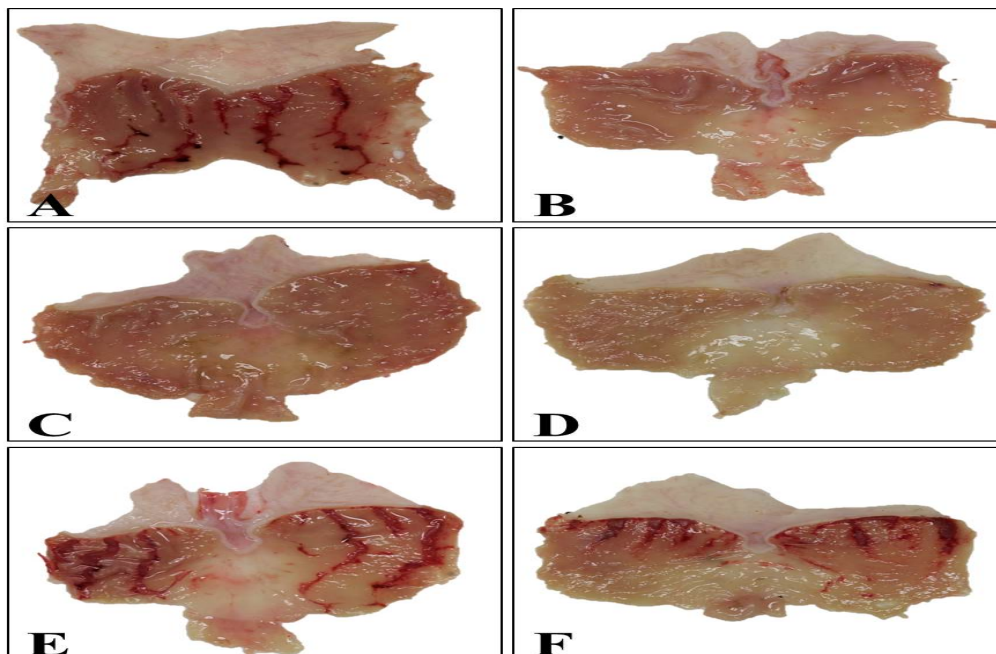


Fig. 38. Representative findings of gastric ulcer induced by ethanol (3 ml/kg). A, vehicle; B, 100 mg/kg 40BSE; C, 300 mg/kg 40BSE; D, 300 mg/kg 70BSE; E, 300 mg/kg J-BSE; F, 30 mg/kg pantoprazole.

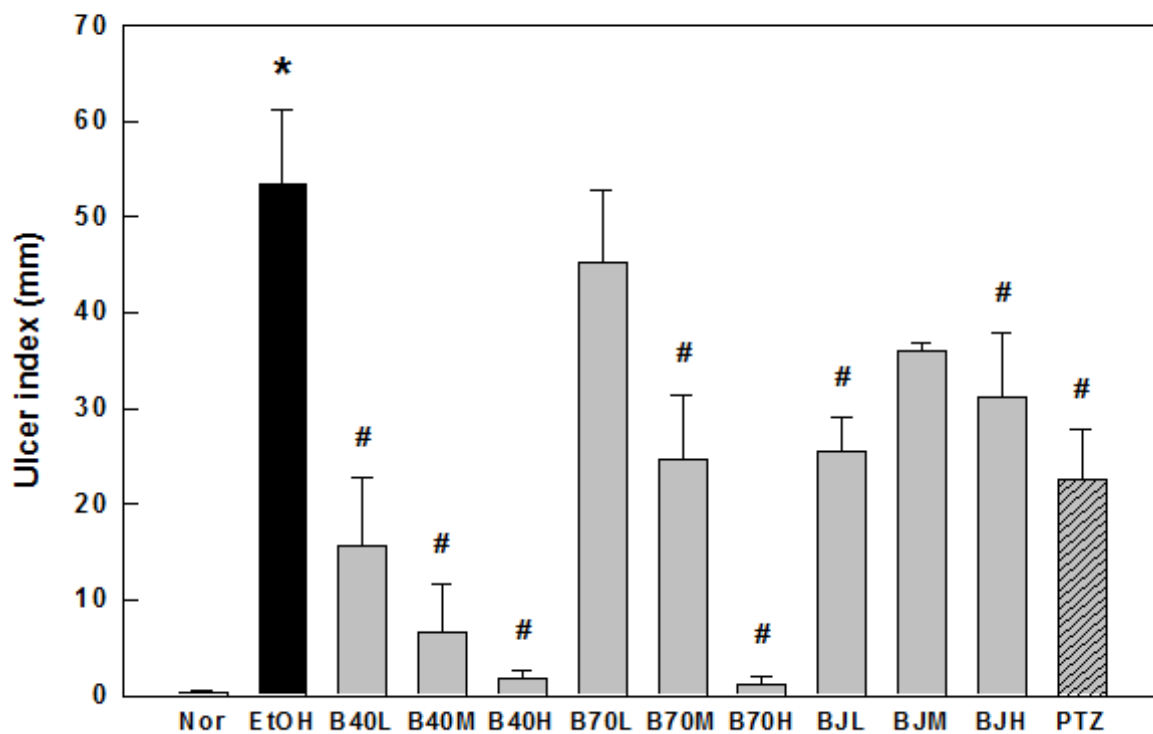


Fig. 39. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the gastric ulcer induced by ethanol (3 ml/kg). Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

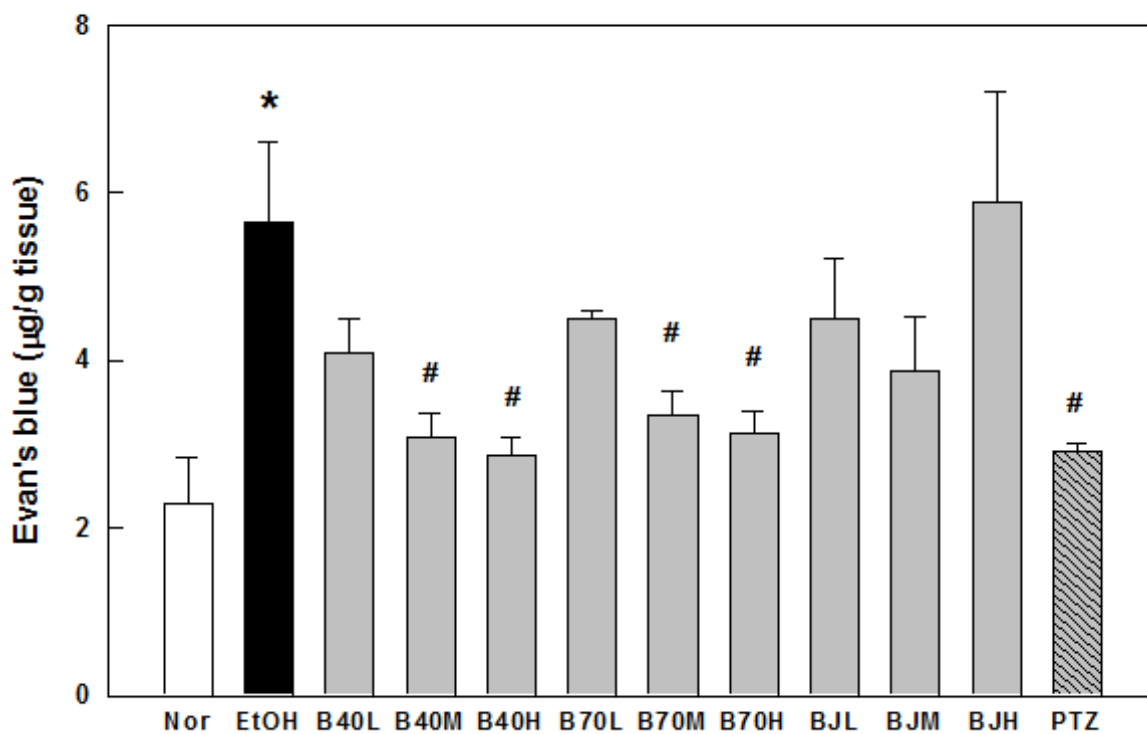


Fig. 40. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the gastric vascular leakage induced by ethanol (3 ml/kg). Nor, normal; Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.



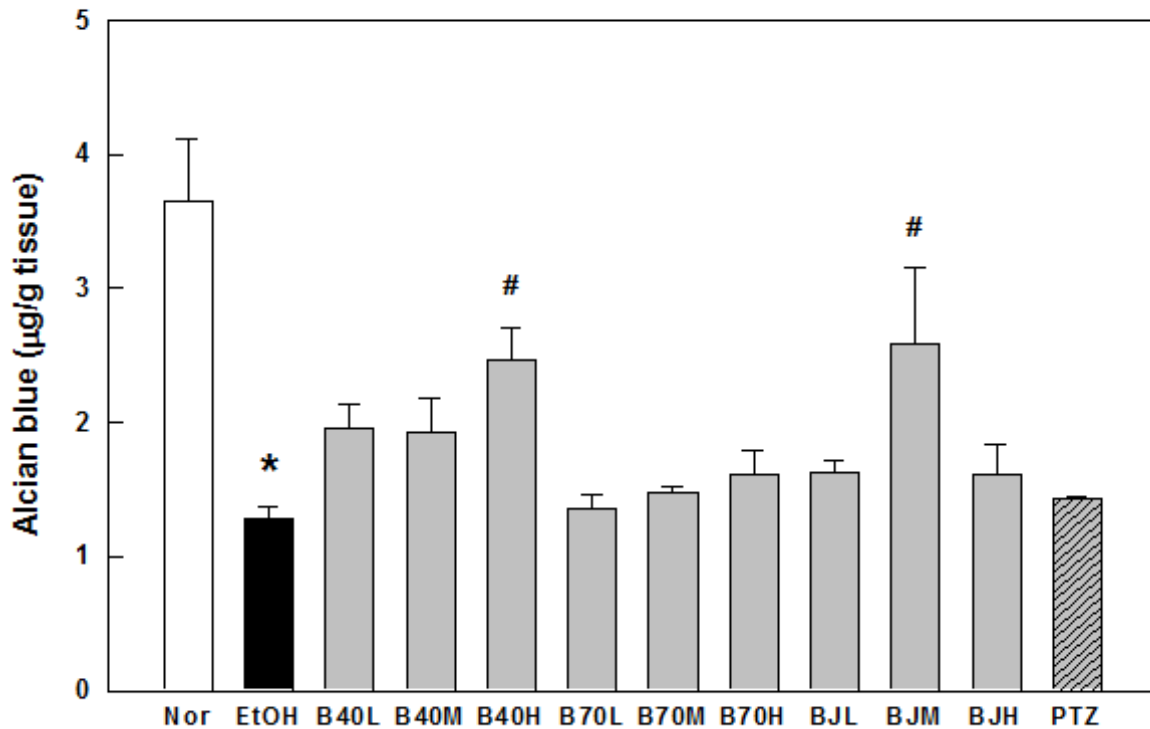


Fig. 41. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the mucus content in the ulcerated stomachs treated with ethanol (3 ml/kg). Nor, normal; Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

#### 나. Indomethacin-induced gastric ulcer에 대한 개선 효능

48시간동안 절식시킨 랫드에 indomethacin (Indo, 25 mg/kg)을 복강 내로 투여한 다음 6시간이 경과한 후에 위를 적출하여 분석한 결과, vehicle 만을 투여한 대조군에서는 심각한 위궤양(출혈병변)이 관찰되었으며, 위궤양지수(ulcer index)로 환산하였을 때  $24.3 \pm 6.7$  mm를 나타내었다(Fig 42A & 43). 이에 반해 브로콜리 새싹 추출물 40BSE를 위궤양 유도 30분 전에 투여한 경우에는 30 mg/kg에서  $9.2 \pm 2.4$  mm, 100 mg/kg에서  $9.9 \pm 2.1$  mm, 300 mg/kg에서  $15.0 \pm 2.5$  mm로 대조군에 비해 각각 62.1%, 59.3% 및 38.3%의 억제율을 보여 30-100 mg/kg에서 유의한 위보호 효과가 확인되었다(Fig 42B & 43). 이에 비해 70BSE 투여군에서는 30 mg/kg에서  $7.2 \pm 2.3$  mm (70.4%), 100 mg/kg에서  $5.5 \pm 0.8$  mm (77.4%), 300 mg/kg에서  $5.5 \pm 1.5$  mm (77.4%)로 모든 농도에서 유의적인 위궤양 억제효능이 확인되었다(Fig 42C, 42D & 43). 한편, J-BSE 투여군에서는 30 mg/kg에서  $9.9 \pm 3.6$  mm (59.3%), 100 mg/kg 에서  $5.5 \pm 1.2$  mm (77.4%), 300

mg/kg에서  $6.0 \pm 1.1$  mm (77.3%)으로 100 mg/kg 이상의 농도에서 75%가 넘는 우수한 억제효과를 나타냈다(Fig 42E & 43). 비교물질군인 PTZ (30 mg/kg) 투여군은  $0.1 \pm 0.1$  mm로 위궤양 출혈병변을 거의 완전하게 억제하였다(Fig 42F & 43).

위궤양에 따르는 혈관 누출량(vascular leakage)을 정량적으로 제시하기 위해 누출된 Evan's blue를 용출시켜 측정한 결과 정상동물에 비해 indomethacin 노출시 약 3.6배 증가하였다(Fig 44). 이러한 혈관 누출반응이 BSE와 PTZ 투여군에서는 위궤양 병변지수와 유사한 경향으로 개선되었는데, 40BSE는 오히려 낮은 용량(30-100 mg/kg)에서 70BSE은 전 용량(30-300 mg/kg)에서, 그리고 J-BSE는 용량이 증가할수록(100-300 mg/kg) 효과적이었으며, PTZ (30 mg/kg)가 가장 우수하였다.

한편, 위점액 보호효과를 확인하기 위해 alcian blue를 용출시켜 mucus contents를 측정한 결과, indomethacin 노출에 의해 위점액이 약 23% 감소하였다(Fig 45). 이러한 점액량 감소에 대해 PTZ 투여군에서는 정상동물과 비슷한 수준으로 회복되었다. 또한 J-BSE 투여군에서도 농도 의존적으로 점액량이 회복되는 경향을 보여 주었다. 이에 반해 위궤양지수에 있어 모든 용량에서 유의한 보호효과를 보인 40BSE와 70BSE는 유의한 효과를 보여 주지 못함으로써 PTZ이나 J-BSE와는 다른 기전으로 위보호 효과를 나타내는 것으로 추정되었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, indomethacin으로 유발된 위궤양 개선에 있어 PTZ > 70BSE = J-BSE > 40BSE의 순으로 위궤양 및 혈관누출을 개선시켜 주는 것으로 확인되었다.

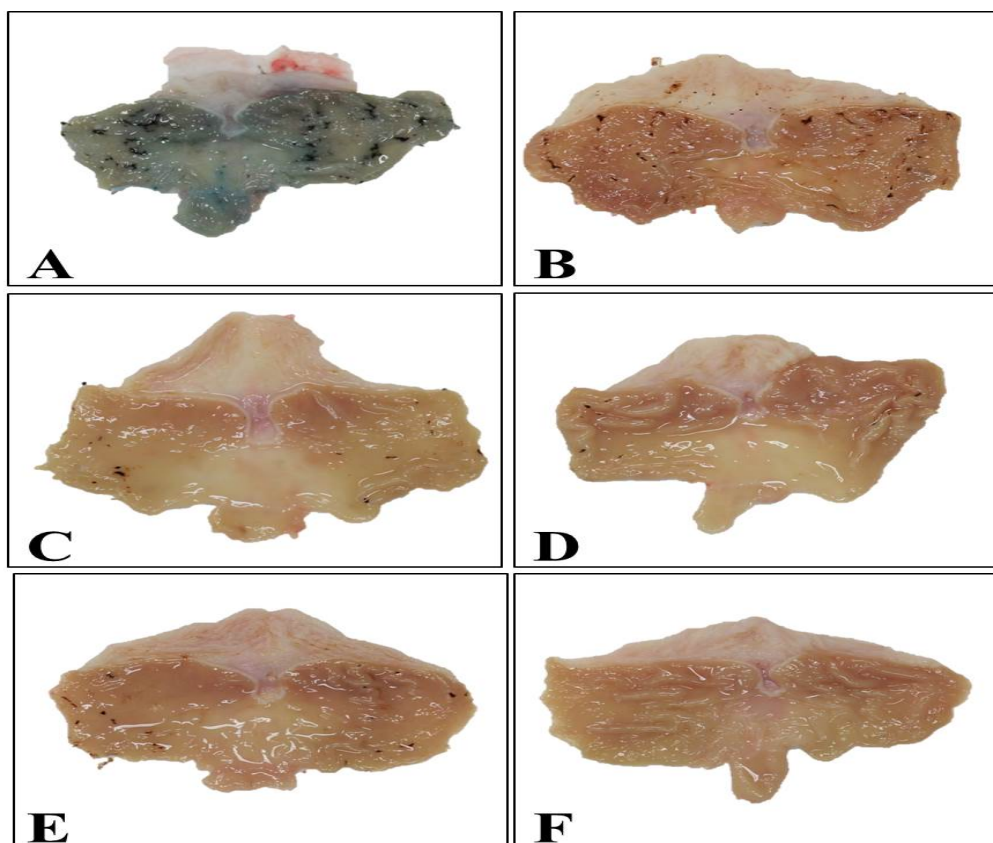


Fig. 42. Representative findings of gastric ulcer induced by indomethacin (25 mg/kg). A, vehicle; B, 300 mg/kg 40BSE; C, 100 mg/kg 70BSE; D, 300 mg/kg 70BSE; E, 300 mg/kg J-BSE; F, 30 mg/kg pantoprazole.

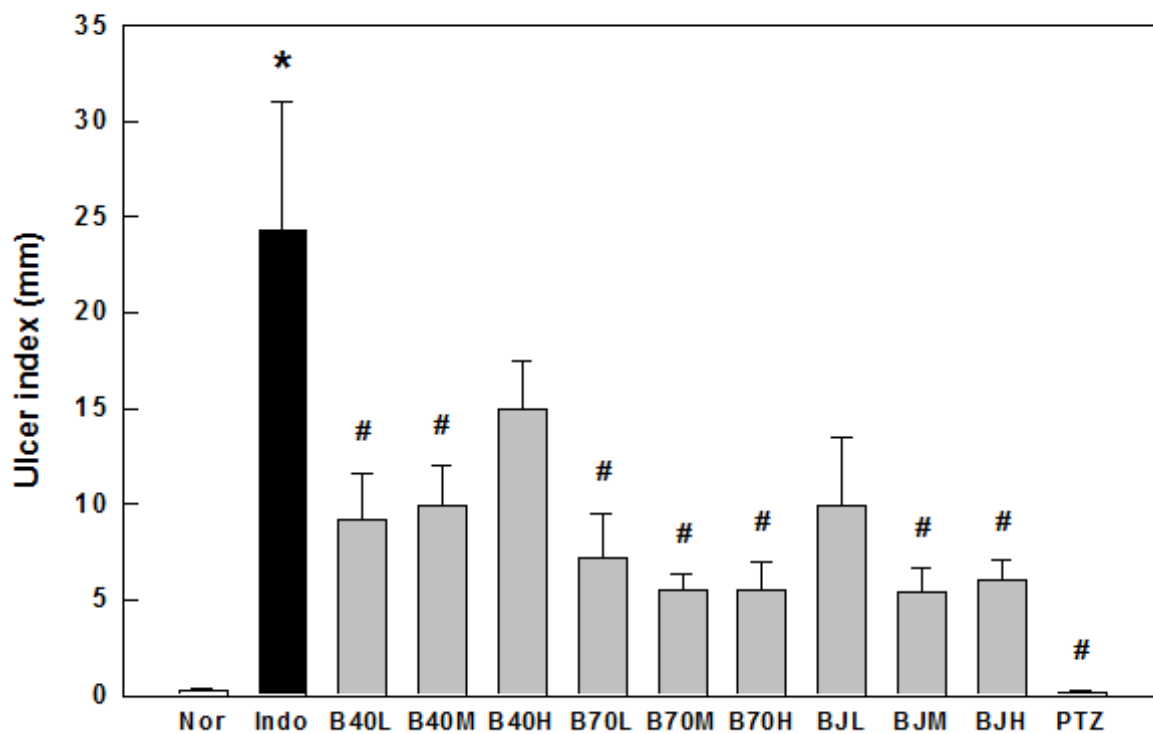


Fig. 43. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the gastric ulcer induced by indomethacin (25 mg/kg). Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

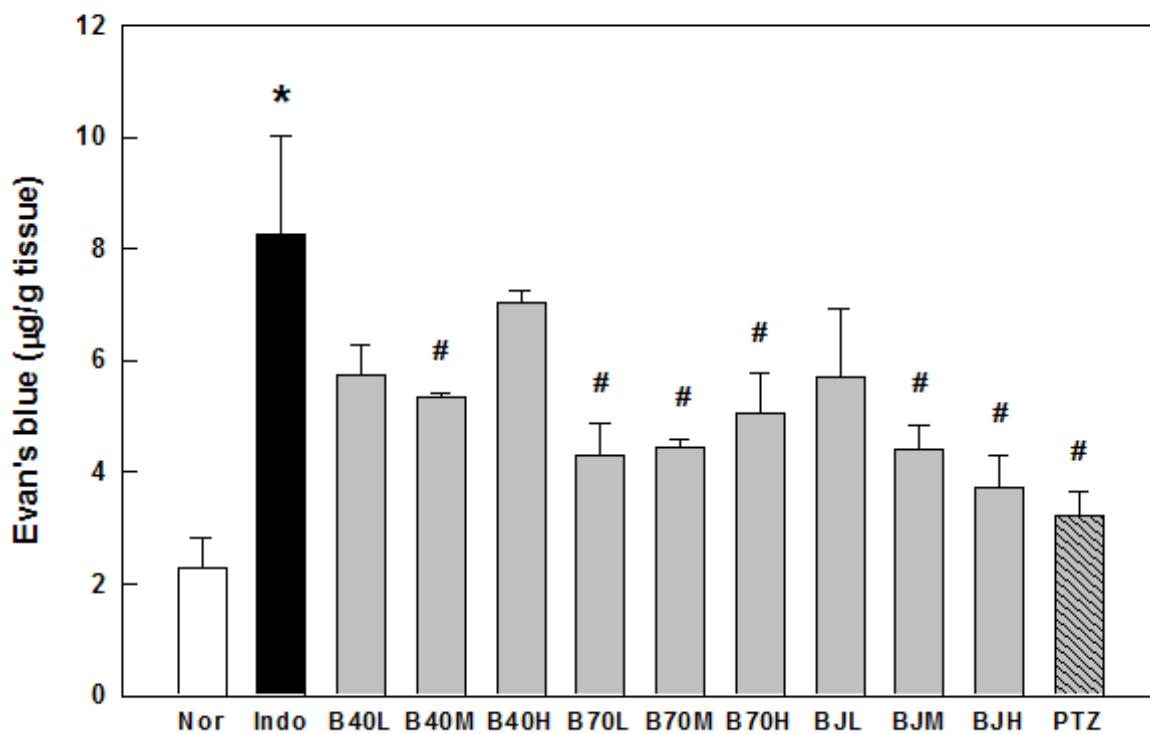


Fig. 44. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the gastric vascular leakage induced by indomethacin (25 mg/kg). Nor, normal; Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

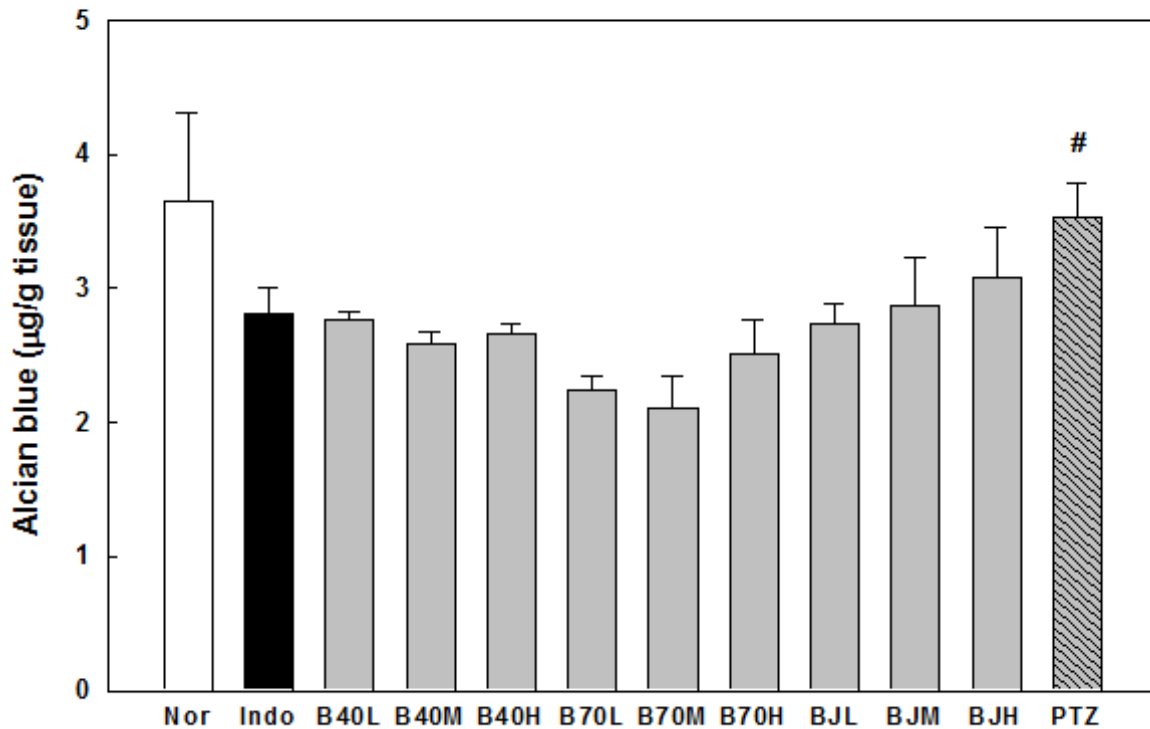


Fig 45. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the mucus content in the ulcerated stomachs treated with induced by indomethacin (25 mg/kg). Nor, normal; Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

#### 다. WIRS-induced gastric ulcer에 대한 개선 효능

48시간동안 절식시킨 랫드를 22℃의 수조에 xiphoid process까지 침수시키는 스트레스성 위궤양을 유도하고 7시간이 경과한 후에 위를 적출하여 분석한 결과, vehicle만을 투여한 대조군에서는 심각한 위궤양(출혈병변)이 관찰되었으며, 위궤양지수(ulcer index)로 환산하였을 때  $13.1 \pm 2.1$  mm를 나타내었다(Fig 46A & 47). 그러나 브로콜리 새싹 추출물 40BSE를 위궤양 유도 30분 전에 투여한 경우에는 30 mg/kg에서  $6.6 \pm 1.4$  mm, 100 mg/kg에서  $7.0 \pm 0.6$  mm, 300 mg/kg에서  $10.9 \pm 2.3$  mm로 위궤양에 대한 억제율이 각각 49.6%, 46.6% 및 16.8%로 낮은 용량(30-100 mg/kg)에서 효과적이었다(Fig 46B & 47). 이에 비해, 70BSE 투여군에서는 30 mg/kg에서  $4.6 \pm 0.8$  mm (64.9%), 100 mg/kg에서  $4.8 \pm 1.2$  mm (63.4%), 300 mg/kg에서  $12.0 \pm 2.6$  mm (8.4%)로 고용량에서는 전혀 효과가 나타나지 않았으나 100 mg/kg 이하의 용량에서는 40BSE에 비해 더 우수한 효능이 확인되었다(Fig 46C, 46D & 47). 반면, J-BSE 투여군에서는 30 mg/kg

에서  $10.5 \pm 0.5$  mm (19.8%), 100 mg/kg에서  $9.8 \pm 2.5$  mm (25.2%), 300 mg/kg에서  $6.9 \pm 2.8$  mm (47.3%)로 낮은 억제율을 나타내었다(Fig 46E & 47). 비교물질군인 PTZ (30 mg/kg)은 위궤양 지수를  $0.2 \pm 0.2$  mm로 낮추어 거의 완전한 개선효과를 보여주었다(Fig 46F & 47).

위궤양에 따르는 혈관 누출량(vascular leakage)을 정량적으로 제시하기 위해 누출된 Evan's blue를 용출시켜 측정한 결과 정상동물에 비해 WIRS 스트레스에 의해 약 24% 증가하였다(Fig 48). 이러한 혈관 누출반응은 PTZ 투여군에서만 개선되는 경향을 나타냈으며 BSE 투여로는 의미있는 효과가 얻어지지 않았다. 한편, 스트레스에 의한 위점액량의 변화는 미미하였으며, BSE나 PTZ 투여로도 변화가 없었다(data not shown).

이러한 결과를 종합해 볼 때, WIRS로 유발된 스트레스성 위궤양 개선에 있어 PTZ > 70BSE = 40BSE > J-BSE의 순으로 우수한 것으로 확인되었으며, J-BSE의 효과는 미미하였다.

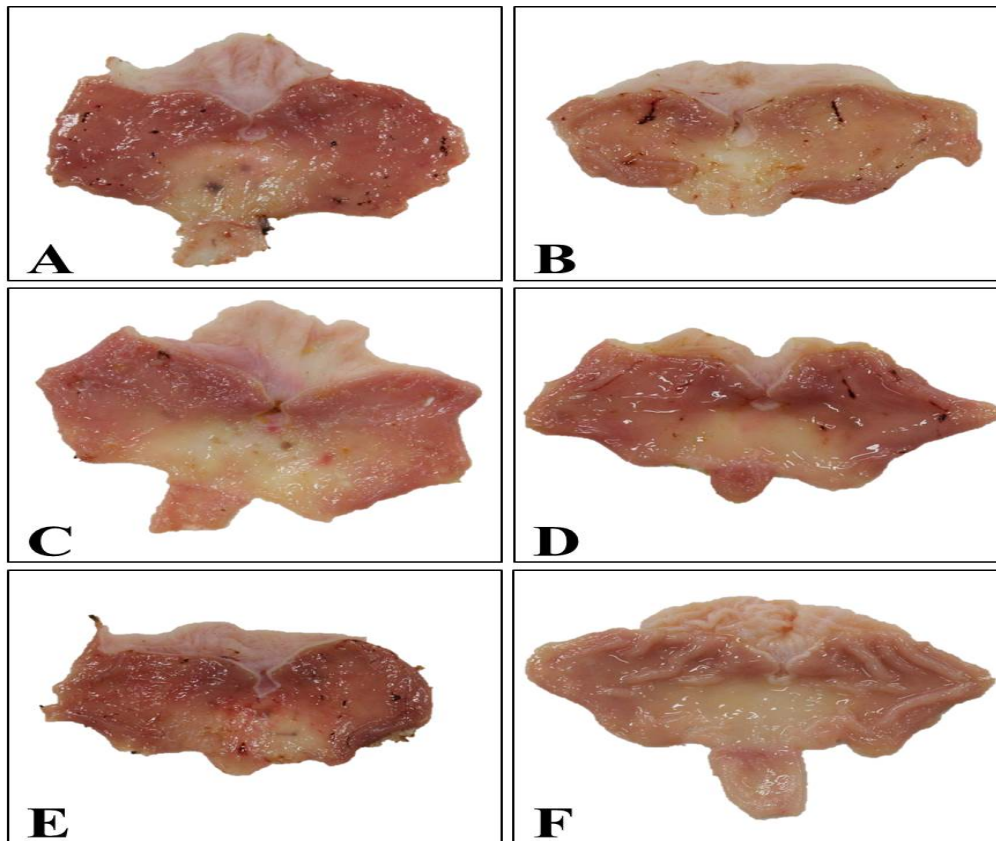


Fig. 46. Representative findings of gastric ulcer induced by 7-hour water-immersion restraint stress. A, vehicle; B, 300 mg/kg 40BSE; C, 100 mg/kg 70BSE; D, 300 mg/kg 70BSE; E, 300 mg/kg J-BSE; F, 30 mg/kg pantoprazole.

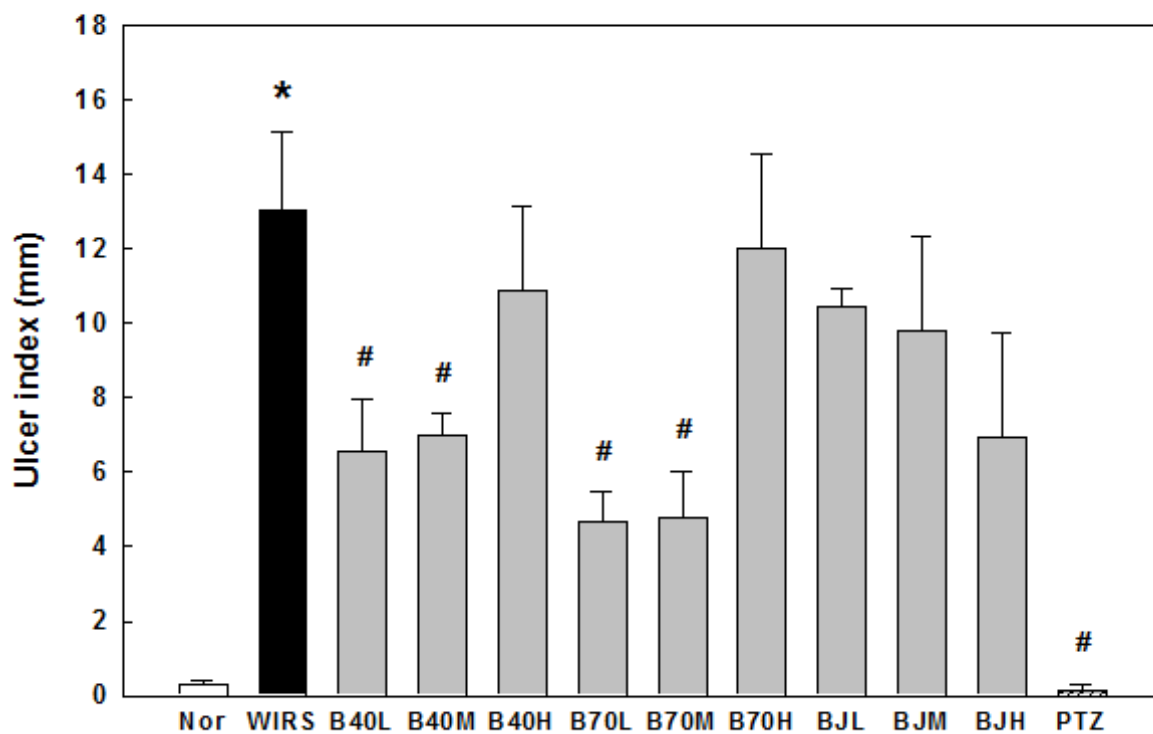


Fig. 47. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the gastric ulcer induced by 7-hour water-immersion restraint stress. Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.



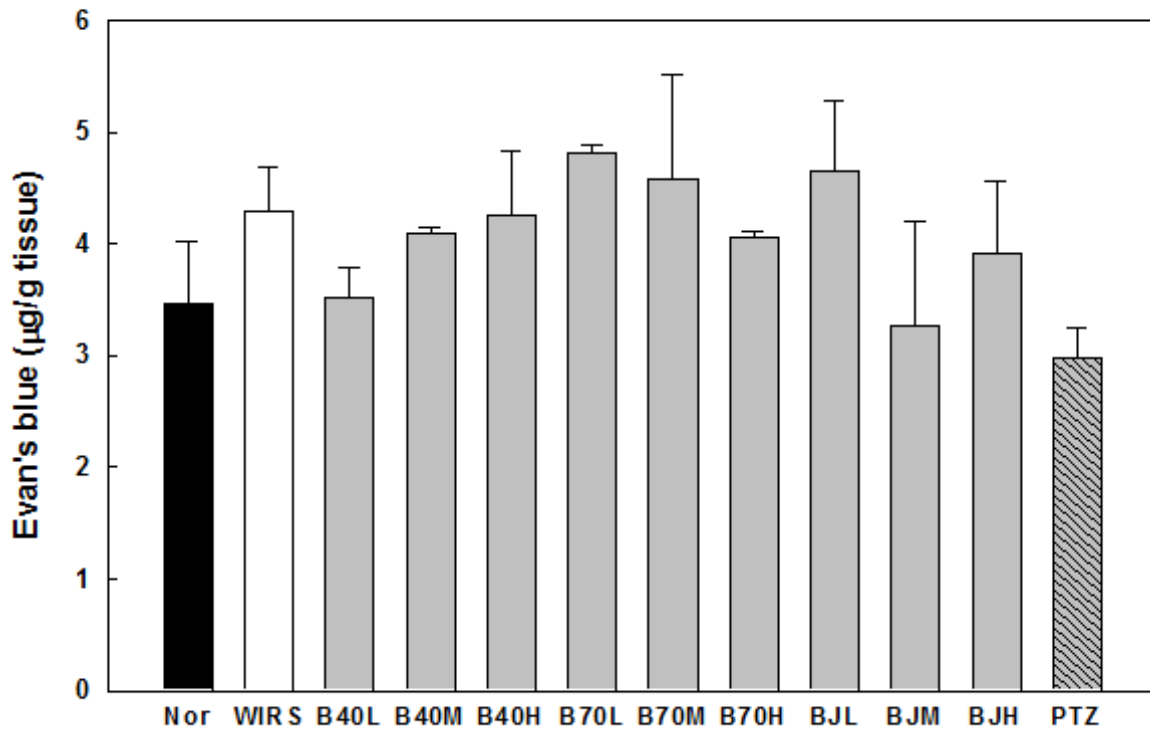


Fig. 48. Effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) on the mucus content in the ulcerated stomachs following 7-hour water-immersion restraint stress. Nor, normal; Veh, vehicle; B40L, 30 mg/kg 40BSE; B40M, 100 mg/kg 40BSE; B40H, 300 mg/kg 40BSE; B70L, 30 mg/kg 70BSE; B70M, 100 mg/kg 70BSE; B70H, 300 mg/kg 70BSE; BJL, 30 mg/kg J-BSE; BJM, 100 mg/kg J-BSE; BJH, 300 mg/kg J-BSE; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

알콜, NSAID 약물, 스트레스 등 서로 다른 원인의 위궤양에 대해 브로콜리 새싹 추출물 (BSE)과 pantoprazole (PTZ)이 개선효능을 비교평가할 때, proton pump inhibitor인 PTZ는 indomethacin 및 WIRS 유도 위궤양에 높은 효능을 보여 준 반면, 알콜성 위궤양에는 상대적으로 낮은 효과를 나타내었다(Table 36). 기존의 시판품인 J-BSE는 indomethacin 유도 위궤양에만 특이적으로 좋은 효능을 보여 주었다. 이에 비해 70BSE는 PTZ와 유사하게 indomethacin과 WIRS 유도 위궤양에 모두 좋은 효과를 나타내어 J-BSE보다 효능이 확대되었음이 확인되었다. 흥미롭게도 40BSE는 70BSE에 비해 indomethacin 및 WIRS 유도 위궤양에 대한 효능이 감소한 반면, ethanol 유도 위궤양에 탁월한 효과를 보여 줌으로써 특성이 크게 변화되었음을 알 수 있다. 하지만 40BSE의 indomethacin과 WIRS 유도 위궤양에 대한 효능에 있어 유효용량이 낮아지고 있어 이들 모델에서의 효능 역시 소실되지 않았음을 시사한다.

Table 36. Improving effects of broccoli sprout extracts (BSE) and pantoprazole (PTZ) in various gastric ulcer models

Treatment	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)		
		Alcohol-induced	Indomethacin - induced	WIRS-induced
40BSE	30	70.7	62.1	49.6
	100	87.4	59.3	46.6
	300	96.8	38.3	16.8
70BSE	30	15.2	70.4	64.9
	100	53.8	77.4	63.4
	300	97.9	77.4	8.4
J-BSE	30	52.2	59.3	19.8
	100	32.5	77.4	25.2
	300	41.5	77.3	47.3
PTZ	30	57.8	99.6	98.5

라. Alcohol-induced gastric ulcer에 대한 지표성분의 개선효능

3가지 서로 다른 위궤양 모델에서 브로콜리 새싹 추출물의 개선효능을 확인한 결과, 70% ethanol로 추출한 70BSE보다 추출 후 40% ethanol로 부분정제한 40BSE에 지표성분이 sulforaphane 함량이 더 높았고, 알콜성 위궤양에서 탁월한 효능 상승이 확인되었으며, NSAID와 스트레스성 위궤양에서도 유효용량 강하 효과가 보임으로써 지표물질인 sulforaphane 이 유효성분일 가능성이 점쳐졌다. 따라서 알콜성 위궤양에 대하여 sulforaphane과 더불어 브로콜리 추출물 내 위점막 보호효과가 알려진 indole 계열 화합물 중 indole-3-carbinol (IC)와 3-indolepropanol (IP)의 개선효능을 추가로 확인하였다.

앞의 연구에서 100 및 300 mg/kg 40BSE에 해당하는 함유량인 0.2 및 0.6 mg/kg sulforaphane과 0.5 mg/kg indole-3-carbinol 및 0.5mg/kg 3-indolepropanol을 경구투여 후 ethanol (3 ml/kg)로 위궤양을 유발하였다. 위궤양 유발 2시간 후에 위를 적출하여 분석한 결과, vehicle만을 투여한 대조군에서는 심각한 위궤양(출혈병변)이 관찰되었으며, 위궤양지수(ulcer index)로 환산하였을 때  $54.7 \pm 8.3$  mm를 나타내었다(Fig 49A & 50). 이에 반해 sulforaphane을 위궤양 유도 30분 전에 투여한 군에서는 0.2 mg/kg에서  $46.3 \pm 4.4$  mm, 0.6 mg/kg에서  $26.0 \pm 5.2$  mm로 대조군에 비해 각각 15.4% 및 52.5%의 억제율을 보여 농도의존적인 위보호 효과가 확인되었다(Fig 49C, 49D & 50).

Indole 계열에서는 indole-3-carbinol (0.5 mg/kg) 투여군에서 위궤양지수가  $48.7 \pm 3.8$  mm로 11.0%의 미약한 억제율을 보인 반면, 3-indolepropanol (0.5 mg/kg) 투여군에서는  $32.0 \pm 6.3$  mm로 41.5%의 우수한 효능을 보여 주었다(Fig 49E, 49F & 50). 한편, 비교물질인 PTZ (30 mg/kg) 투여군에서는 위궤양지수가  $17.4 \pm 2.2$  mm로 감소하여 68.2%의 가장 우수한 억제효과를 보여 주었다.

위궤양에 따르는 혈관 누출량(vascular leakage)을 정량적으로 제시하기 위해 누출된 Evan's blue를 용출시켜 측정한 결과 정상동물에 비해 ethanol 노출시 약 4.1배 증가하였다(Fig 51). 이러한 혈관 누출반응에 대해 sulforaphane (0.2 및 0.6 mg/kg)과 PTZ (30 mg/kg) 투여군에서는 거의 완전한 억제효과를 보여 주었으며, 3-indolepropanol (0.5 mg/kg) 역시 유의한 개선효능을 나타낸 반면, indole-3-carbinol (0.5 mg/kg)의 효과는 미미하였다.

한편, 위점액 보호효과를 확인하기 위해 alcian blue를 용출시켜 mucus contents를 측정한 결과, ethanol 노출에 의해 위점액이 약 33% 감소하였다(Fig 52). 이러한 점액량 감소에 대해 sulforaphane, indole-3-carbinol 및 3-indolepropanol 모두 회복시켜 주는 경향을 나타냈지만, PTZ의 효과는 상대적으로 낮았다.

이러한 결과로부터 브로콜리 새싹 추출물 내의 위궤양 개선 유효성분은 sulforaphane과 3-indolepropanol로 추정되며, 0.2-0.6 mg/kg의 아주 적은 용량에서도 기존의 의약품에 버금가는 효능을 발휘함을 알 수 있다.

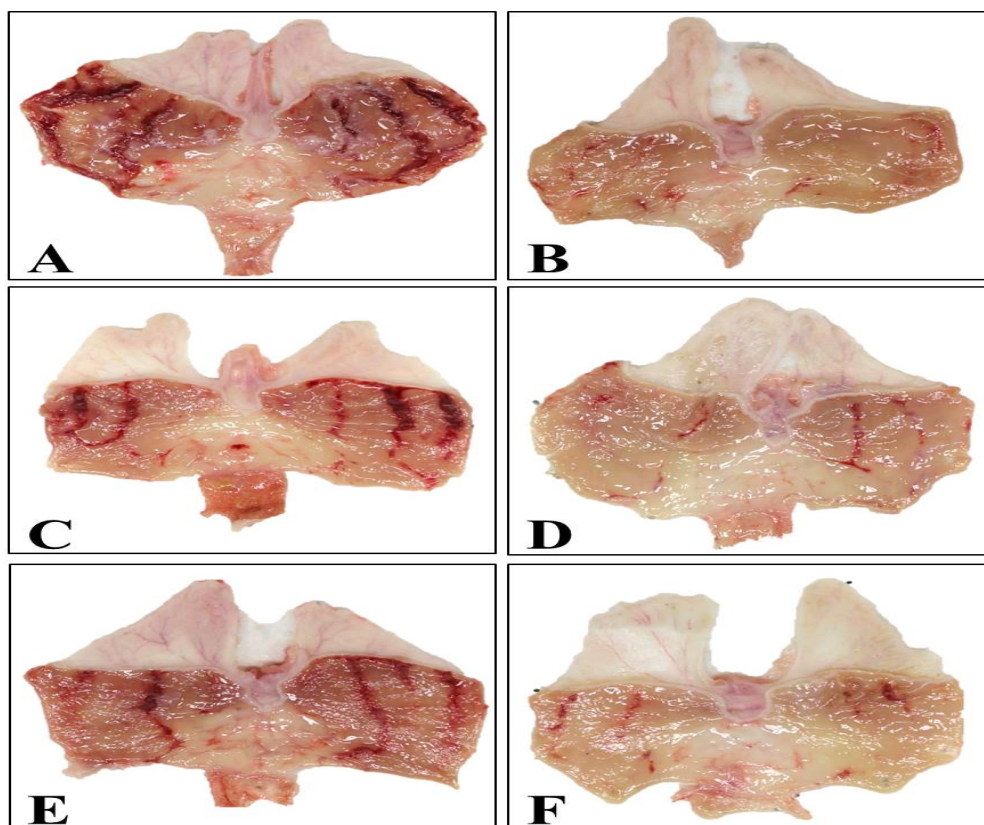


Fig. 49. Representative findings of gastric ulcer induced by ethanol (3 ml/kg). A, vehicle; B, 30 mg/kg pantoprazole; C, 0.2 mg/kg sulforaphane; D, 0.6 mg/kg sulforaphane; E, 0.5 mg/kg indole-3-carbinol; F, 0.5 mg/kg 3-indolepropanol.

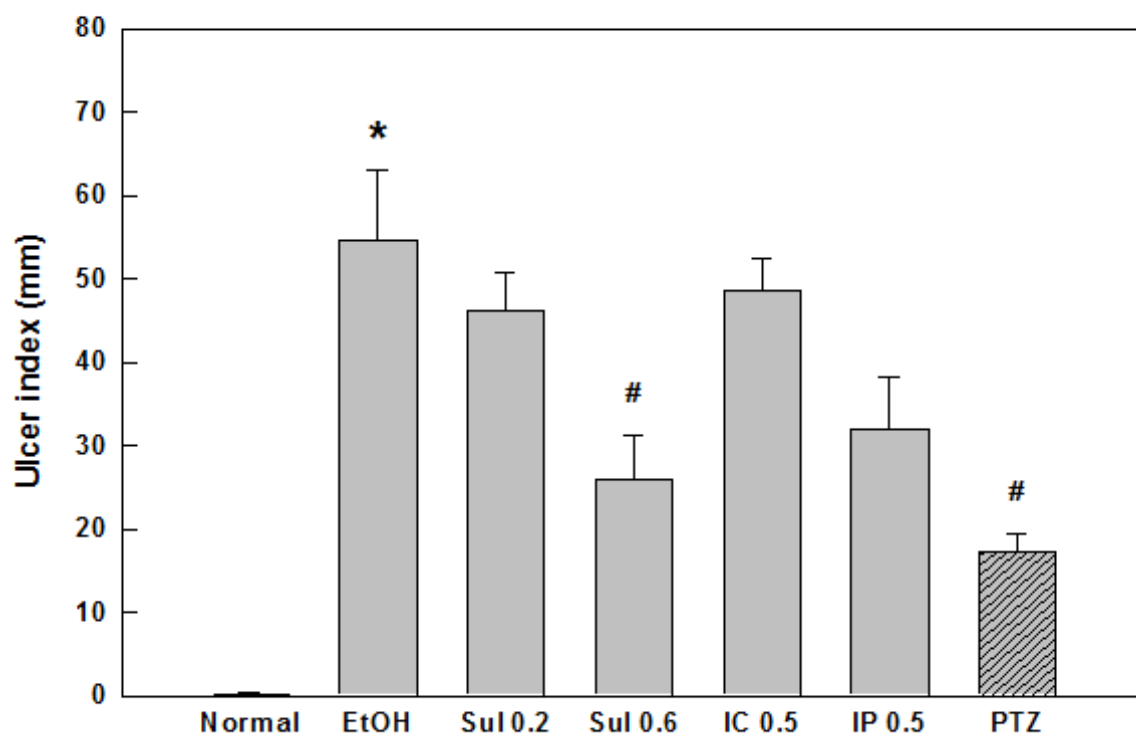


Fig. 50. Effects of sulforaphane (Sul), indole-3-carbinol (IC), and 3-indolepropanol (IP) on the gastric ulcer induced by ethanol (EtOH, 3 ml/kg). Sul 0.2, 0.2 mg/kg sulforaphane; Sul 0.6, 0.6 mg/kg sulforaphane; IC 0.5, 0.5 mg/kg indole-3-carbinol; IP 0.5, 0.5 mg/kg 3-indolepropanol; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

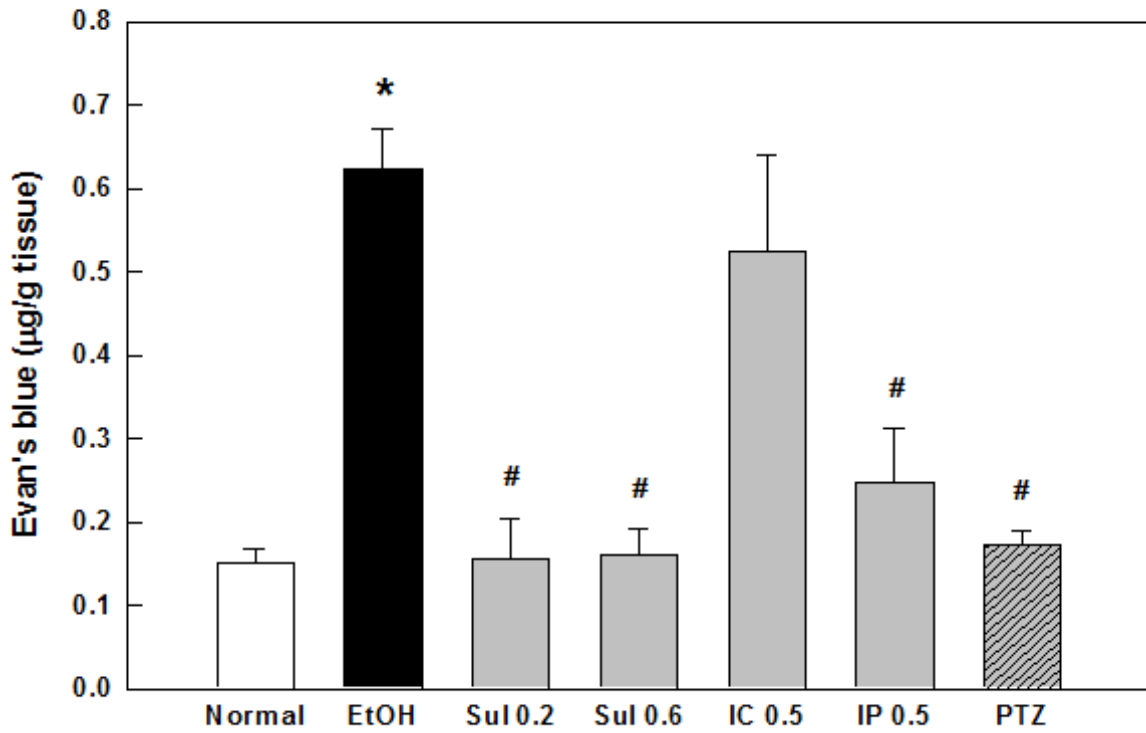


Fig. 51. Effects of sulforaphane (Sul), indole-3-carbinol (IC), and 3-indolepropanol (IP) on the gastric vascular leakage induced by ethanol (EtOH, 3 ml/kg). Sul 0.2, 0.2 mg/kg sulforaphane; Sul 0.6, 0.6 mg/kg sulforaphane; IC 0.5, 0.5 mg/kg indole-3-carbinol; IP 0.5, 0.5 mg/kg 3-indolepropanol; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

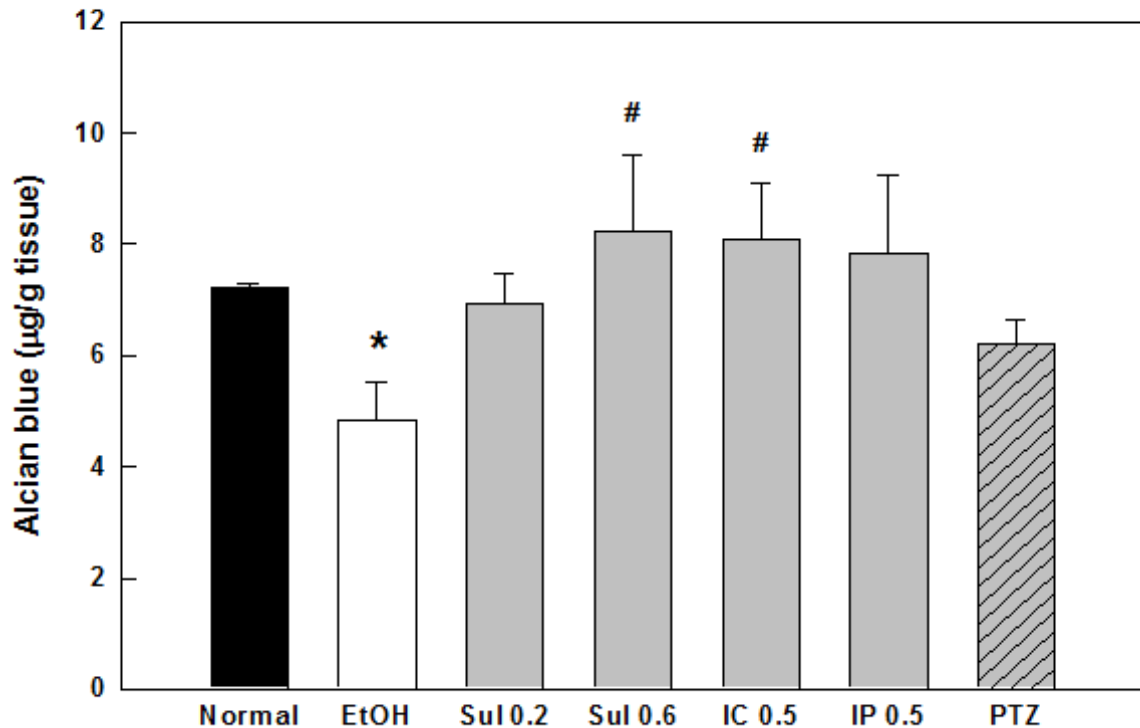


Fig. 52. Effects of sulforaphane (Sul), indole-3-carbinol (IC), and 3-indolepropanol (IP) on the mucus content in the ulcerated stomachs treated with ethanol (EtOH, 3 ml/kg). Sul 0.2, 0.2 mg/kg sulforaphane; Sul 0.6, 0.6 mg/kg sulforaphane; IC 0.5, 0.5 mg/kg indole-3-carbinol; IP 0.5, 0.5 mg/kg 3-indolepropanol; PTZ, 30 mg/kg PTZ.

위궤양 발병 원인 중 위산의 분비와 관련되는 물질을 공격인자라고 하며, 위장 점막의 방어력과 관련되는 물질을 방어인자라고 하는데 공격인자가 강하거나 또는 방어인자가 약할 때 궤양이 형성된다고 알려져 있다. 공격인자의 대표적인 것들로는 스트레스, 술, 담배, 아스피린과 같은 진통소염제, 스테로이드제제, 자극적인 음식, 영양결핍, *H. pylori*의 감염 등을 들 수 있으며, 방이기전으로는 reactive oxygen species (ROS)의 증가에 대한 항산화력의 약화 및 prostaglandins 생성 저하가 궤양의 병변과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 밝혀지고 있다.

브로콜리는 vitamin C, K, A 및 섬유질 외에도 sulforaphane, indole-3-carbinol, 3-indolepropanol, chlorogenic acid,  $\beta$ -carotene 등의 생리활성물질을 함유하고 있는 채소로, 브로콜리 새싹에서 더 높은 함유량을 보이는 sulforaphane은 항암, 면역증강, 해독 및 *H. pylori* 항균효능을 가지고 이는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀에서도 이전의 연구로부터 브로콜리 새싹 추출물(BSE) 중에서 *in vitro* 항산화효능과 *H. pylori* 항균효능에 있어서는 20% ethanol 추출물(20BSE)이, *in vivo* *H. pylori* 균체제거 효능에 있어서는

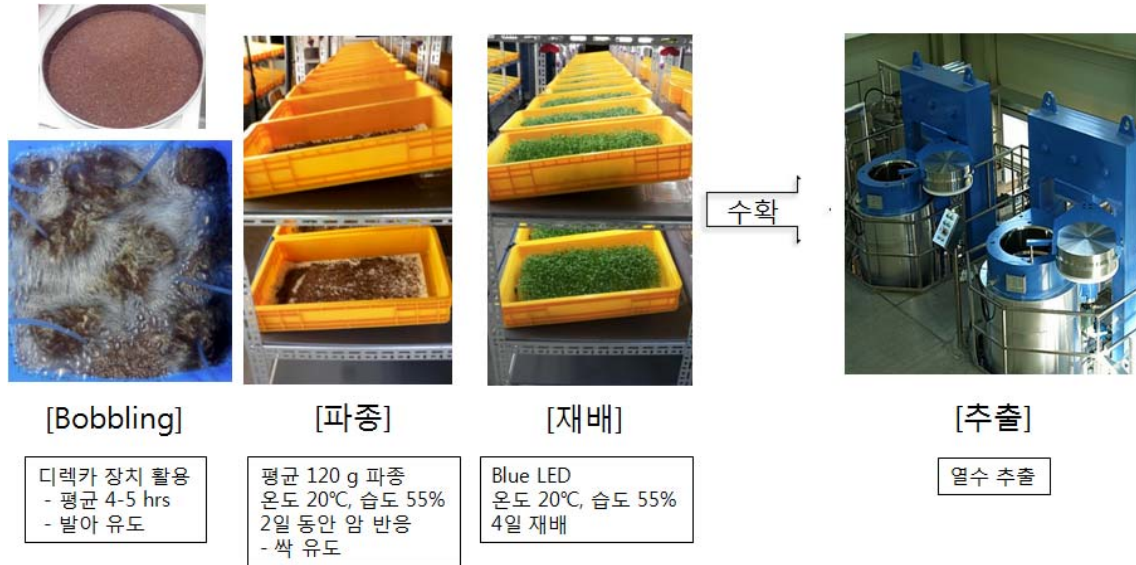
40BSE가, 그리고 위산과다로 인한 위궤양 개선에는 70BSE가 우수한 것으로 확인하였다 (data not shown). 따라서, 20BSE가 직접적인 *H. pylori* 항균효능을, 40BSE가 균체의 위점막 침투억제 및 항산화효과를, 그리고 70BSE가 항산화 및 위점막 보호효과를 나타내는 서로 다른 기전을 가지고 있음을 시사한 바 있다.

Ethanol, indomethacin, WIRS 등 서로 다른 원인의 위궤양에 대해 브로콜리 새싹 추출물의 개선효능을 비교한 결과, 기존의 시판품인 J-BSE는 indomethacin 유도 위궤양에만 특이적으로 좋은 효능을 보여 주어 위조직 내로의 혈류저하로 인한 위궤양에 효과적인 것으로 나타났다. 이에 비해 70BSE는 indomethacin과 WIRS 유도 위궤양에 모두 좋은 효과를 나타내어 혈류개선과 위산분비 차단을 통해 효능을 발휘하는 것으로 J-BSE보다 적용범위가 확대되었음이 확인되었다. 흥미롭게도 40BSE는 70BSE에 비해 indomethacin 및 WIRS 유도 위궤양에 대한 효능이 상대적으로 낮았지만 최적용량이 30 mg/kg 이하로 내려가는 경향을 보여 이들 모델에서도 효능이 소실된 것이 아니라 유효용량 재설정이 필요함을 시사하고 있으며, 특히 ethanol 유도 위궤양에 대해서는 효능이 크게 상승하여 폭넓은 적응증이 확보되었음이 확인되었다. 한편, 지표물질 겸 유효물질로 추정된 sulforaphane, indole-3-carbinol 및 3-indolepropanol에 대한 유효성 평가 결과 indole-3-carbinol의 효과는 미약하였지만 sulforaphane과 3-indolepropanol은 0.2-0.6 mg/kg의 아주 적은 용량에서도 pantoprazole (30 mg/kg)에 버금가는 효능을 발휘함으로써 브로콜리 새싹 추출물을 활용한 기능성 식품소재 개발에 좋은 지표가 될 것으로 기대된다.



# 제 4 절 브로콜리 새싹 농축액 원료를 부원료로 이용한 발효유 식품

## 1. 원료 생산 과정



[브로콜리 새싹 원료 공정 과정]

Fig. 53. Manufacturing process of raw broccoli sprouts.

## 2. 브로콜리 새싹 농축액 제조공정

번호	제조 공정	상세설명	비고
1	수세	이물이 붙어 있는 브로콜리를 브로콜리 무게의 5배의 물을 사용하여 깨끗이 수세한다.	
2	건조	수세한 브로콜리생물은 식물세포가 살아있기 때문에 세포안의 성분이 충분히 추출되지 않을 수 있으므로, 건조과정을 거쳐 세포를 파괴시켜 성분이 최대한 추출되도록 한다.	
3	세절	건조과정을 거친 것을 성분추출의 최적화를 위해 잘게 쪼개주는 과정을 거친다.	
4	추출	성분의 파괴를 방지하기위해 100℃가 아닌 추출 온도를 80℃로 유지하며, 장시간 추출한다.	생산 차별화 (보통 100℃로 단기추출)
5	1,2차 여과	추출성분이 아닌 이물질을 함유하지 않도록 30 $\mu\text{m}$ 1차 여과하고, 2차로 4 $\mu\text{m}$ 제균 여과하여 브로콜리의 성분만을 함유하게 한다.	
6	농축	희석된 성분을 고농도로 생산하기 위해 저온 감압 농축한다.	생산 차별화 (보통은 끓여서 농축)
7	향의 포집	농축 시 휘발되는 향을 포집된 액을 다시 농축하여 농축액에 혼합시킴으로서 브로콜리 고유의 향을 함유시킨다. 에센셜 성분으로 생리활성 강하다.	
8	충진	20 kg 플라스틱 통에 충진 포장한다.	
9	품질관리	충진 포장한 것을 출고 전에 표준품과 비교 시험 한다. (성상, 물리시험 등)	
10	출고	합격품을 출고시킨다.	

### 3. 브로콜리 새싹 농축액에 대한 시험성적서

시 험 항 목	규 격 값	시 험 값
1. 성 상	진갈색의 맑은액, 약간의 특이취	확인
2. pH(원액)	5.0 ± 0.3	4.72
3. 미생물	일반세균 35℃, 48hr 대장균(Coliform) 35℃, 48hr 효모 및 사상균수 24℃, 4day	검출 없음 검출 없음 검출 없음
4. 중금속	납 : 20ppm이하 비소 : 2ppm이하	검출 없음 검출 없음
5. Brix(%)	55 ~ 60 %	56.5%
6. 타르색소	검출유무	검출 없음
7. 이물	검출유무	검출 없음
8. Sulforaphane	0.01% ~ 0.05%	0.03%

#### 4. 원료 및 제품



한국 유업계 1위 업체  
(매출 1.3조원)



1일 판매량  
65만병



1일 판매량  
20만병



1일 판매량  
25만병



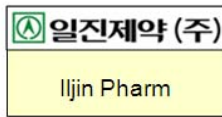
1일 판매량  
35만병



한국 식품업계 1위 (매출 3조 5천억원)



기타 유업계 및 음료제조업체



원료 거래선 : 기타 식품회사 및 건강기능식품 제조회사

수요처	국명	수요량	관련제품
기업체/소비자	대한민국	한국야쿠르트	“윌” 발효유
기업체/소비자	일본	메이지유업, 설인유업	발효유, 음료, 건강식품
기업체/소비자	미국	유업계, 건강식품업체	건강기능식품



자사 브로콜리 새싹 추출물 (고형분 55%) 0.01% 함유하는 월 제품

- 대기업의 신제품 개발 시, 사전에 원료 개발, 컨셉 개발, 상품화 제안 및 테스트를 통하여 원료공급 [현재 야쿠르트의 프로젝트 “월” 제품에 설폴라판 성분이 고 함유된 브로콜리 새싹 농축액을 월 300 kg 이상을 원료로 공급하고 있음. - “위 기능강화 발효유”

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

○ 본 과제에의 연구목표 및 평가착안점에 따라 연구를 수행하였으며, 지적재산권확보를 위하여 국내 특허를 출원하였고, 현재 개발된 원료를 “Y” 사에 공급하고 있음

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2011~ 2012)	○ LED 광원에 따른 성장조건 최적화 및 최적추출 조건 확립 및 평가	30
	○ LED 광원에 따른 이화학적 특성 변화 및 생리활성 평가	30
	○ <i>H. pylori</i> 증식억제 효과 구명	40
최종평가	○ 고품질 브로콜리 새싹 원료 개발	30
	○ 효능의 과학적 입증	40
	○ <i>H. pylori</i> 억제 기능성 소재로 발굴	30

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
2차년도 (2012~ 2013)	○ LED 광원에 따른 성장조건 최적화 및 최적생육 조건 확립(안정적인 기능성 소재용 브로콜리 새싹 확보)	30
	○ 유효성분의 손실을 최소화한 원재료의 전처리 및 가공기술의 표준화	30
	○ 헬리코박터-위점막 개선 효능 평가	40
최종평가	○ 추출정제를 통한 유효성분 함량 극대화 (고품질 브로콜리 새싹 원료 개발)	30
	○ 효능의 과학적 입증	40
	○ 헬리코박터-위점막 개선 기능성 소재 발굴	30

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
3차년도 (2013~ 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 원료 표준화 및 분석법 확립</li> <li>○ 설포라판 이외이 기능성 물질 연구</li> <li>○ 원료형 완제품화</li> <li>○ 기전별 위궤양 개선 효능평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 브로콜리 새싹 정제 추출물의 기능성 입증</li> </ul> </li> <li>○ 대량생산체계 확립</li> </ul>	15 15 25 20 25
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효능의 과학적 입증</li> <li>○ 유효성분의 위궤양 개선 효능 입증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 새로운 기능성 소재 발굴</li> </ul> </li> <li>○ 대량생산체계 확립</li> <li>○ 원료의 완제품화 (분말, 농축액 등)</li> </ul>	20 20 30 30

## 제 2 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 새싹 작물의 식품소재원료를 안전하게 생산 공급하기 위한 기초생리 및 안전 제배 기술을 확립
2. 브로콜리 새싹 함유 성분의 항산화력, *H.pylori* 억제능의 과학적 접근으로 관련분야의 기초자료로 제공
3. 새로운 *H.pylori* 억제능 발굴 및 기능성 식품의 제품화 관련기술을 개발
4. 브로콜리 새싹의 기능성 성분, 생체 항산화 및 *H.pylori* 억제능을 규명하였고, 기능성 소재를 개발

5. 식물유래 천연 *H.pylori* 억제능 물질의 대량생산 시스템 개발로 산업화의 기틀을 마련



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 학술대회 발표

발표제목	학술대회명	발표일자
Physico-chemical properties of broccoli sprouts cultivated in the plant factory system with different light conditions	한국식품영양과학회	2011.11.01
식물공장 시스템에서 광원의 종류를 달리하여 재배한 브로콜리 새싹의 유효성분 함량 및 <i>H. pylori</i> 억제능	한국약용작물학회 (우수포스터상 수상)	2012.05.03

#### 2. 논문발표 및 게재

논문명	학술지명	비고
식물공장 시스템에서 광원의 종류를 달리하여 재배한 브로콜리 새싹의 이화학적 특성	한국식품영양과학회지 (2011년)	40(12); 1757-7163
광원별 브로콜리 추출물의 화장품 약리활성 검증	생명과학회지 (2012년)	22(3); 347-353
식물공장 시스템에서 재배한 브로콜리 새싹의 건조방법에 따른 이화학 및 항산화 특성 연구	한국식생활문화학회지 (2013년)	28(1); 57-69

#### 3. 특허출원 및 등록

구분	특허명	출원국가명 (출원번호)	출원일
등록	브로콜리 새싹의 생산 방법	대한민국 /10-2011-0105328	2011.10.14
등록	원적외선 음이온수 장 치를 이용하여 브로콜 리 새싹을 생산하는 방법	대한민국/ 10-2011-0126993	2011.11.30
출원	위점막 보호효능을 갖 는 브로콜리 새싹 정 제 추출물과 그 제조 방법	대한민국 /10-2013-0090127	2013.07.30

#### 4. 사업화 현황

(천원)

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액 '12-13'	당해년도 매출액(5월)	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
기능성 원료 소재	“월” 제품에 설포라판 고 함유된 브로콜리 새싹 농축액 월 300 kg 이상 원료 공급	(주)야쿠르 트	양기락	1,915명	브로콜리 새싹 농축액/분말	361,044	86,724	447,768
연 2.5~3.5t 이상을 원료로 공급하고 있음								
합계								447,768

## 제 2 절 산업화 추진방안

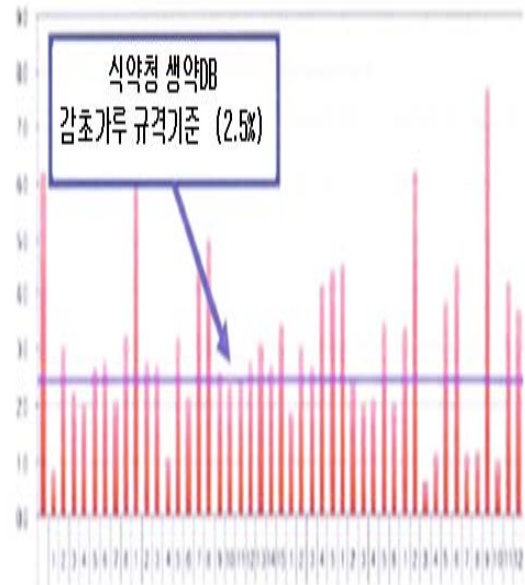
개발종료 후 사업 추진에 따른 시장 확대에 따라 식물공장 규모를 확대할 계획이며, 농업 재배·생산 분야에 활용. (낙후된 농산물 유통과정에서 수집상, 중간 도매상 등 중간 유통과정을 거치면서 농산물 가격 상승폭이 커져 가격 불안정을 초래하지만, 소비자 접근형인 도시형 식물공장 구축으로 유통과정 최소화 및 물류비 절감으로 가격 안정화 도모)

1. 3년차 기술개발 연구를 기반으로 융·복합 바이오 기능성 원료의 상업생산
2. 개발기술을 통한 식약처 건강기능식품 원료 인정(개별인정형) 신청

3. 식약처 인정신청을 위한 개별인정을 위해 안전성 평가를 위한 독성시험 및 인체적용시험 등을 추진할 예정
4. 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략
- 가. 대기업(유업계, 음료업계)에 기능성 소재 원료 공급
- 나. 대기업의 신제품 개발 시, 사전에 원료 개발 및 컨셉 개발을 통하여 상품화 제안 및 테스트
- 다. 건강기능식품 업체 원료 공급
- 라. 국내외 기능성 소재 원료 전시회 참석 부스 전시  
(국내 전시회 1회/년, 해외 전시회 1회/년)
- 마. 제품에 대한 기능성 소재 개발 : 독성시험 및 임상 시험
- 바. 식약처에 건강기능식품 개별인정형 원료 허가 신청
- 사. 고기능성 건강기능식품 개발 및 판매
- (1) 1차로 폐사가 가지고 있는 기존 영업망(대기업 유통망 - 원료공급, 완제품 제품화 판매 - 홈쇼핑, 기타 대형 약국 판매 등)을 활용하여 매출을 시작
- (2) 대기업 신제품 개발 시, 사전 원료 개발 및 컨셉 개발을 통하여 상품화 제안 및 테스트(건강기능식품 업체 원료 공급 및 해외 거래선 원료 수출, OO대기업과 판매 제휴를 맺을 계획으로 이미 마케팅 협의를 마친 상태임)
- (3) 보다 안정적인 유통영업망을 확보하기 위하여 다음과 같은 곳에 판로를 확보하고자 함

No.	구분	내용	비고
1	대기업/원료공급	대기업과 사전에 원료 개발 및 컨셉 개발을 통하여 상품화 제안 및 테스트 (이미 제품화 추진 계획에 선정)	업체원료공급 및 해외 거래선 원료 수출 기대
2	홈쇼핑(제품화)	GS, CJ, 현대홈쇼핑 등 판매 대리점 유통망 구축	(건강기능식품)
3	해외 수출	중국, 일본 및 아시아, 미국 등에 수출	완제품 수출

※ 핵심기술 및 기존 기술과의 차별성

기존 재배기술	식물공장 재배(핵심)기술
<div data-bbox="255 627 638 694" style="text-align: center;"> <p>야생식물유래 감초의 글리시진산 함량편차</p> </div>  <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 야생식물유래 감초는, 약효성분함량, 조성의 편차가 큼</li> <li>○ 품질이 안정한 한방약제조를 위해서는 약효성분의 균질화가 필요함</li> <li>○ 야생식물유래의 감초는 식약청 생약 DB의 감초가루 규격치(2.5% 이상) 충족되지 못하는 것이 존재함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물공장에서의 약용식물 생산의 매력 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연중 최적의 생육조건 (생육시기단축 및 계획적인 안정생산가능)</li> <li>- 폐쇄성이 높은 시설 (잔류농약, 중금속오염 등의 위험이 없음)</li> <li>- 양액재배 (안정적인 품질의 식물을 대량생산 가능)</li> <li>- 종묘공급에서 가공까지 일괄생산 (종묘부터 생산까지 안정적인 제품공급 실현 가능)</li> </ul> </li> <li>○ 안전한 약용식물의 국내 안정생산의 실현 가능</li> <li>○ 생육기간 단축, 단위 면적당 토지생산성, 연중 안정적 공급 가능</li> <li>○ 무농약 재배 등 친환경 농업생산이 가능하고, 해충방제, 성장촉진 등 농업생산물의 효능 증가</li> <li>○ 고품질의 균일화, 규격화된 상품 생산 및 가격 결정용이</li> <li>○ 소비 트렌드와 기후변화에 대응 및 시장 접근성 용이</li> <li>○ 식물공장 시스템 대량 생산 → 수출차별화 가능</li> <li>○ 기능성 브로콜리 새싹 재배 → 가격 차별화 가능</li> <li>○ 유효성분 추출 가공기술 개발 → 함량 차별화 가능</li> <li>○ Sulforaphane 고 함유 원료 소재 생산 → 원료수출, 수입대체 가능</li> <li>※ 식물공장 생산시스템 : 통제된 시설 내에서 식물의 생육환경(빛, 공기, 열, 양분)을 인공적으로 제어하여 공산품 처럼 일정한 품질의 생산이 가능한 시스템적인 농업형태일 뿐 만 아니라, 최신기술인 LED, 환경제어시스템, 로봇 자동화 공정 등을 도입한 첨단 IT기술이 융화된 농업형태이며, 또한 기존 농법의 단점을 보완하여 유효성분의 함량 표준화 및 속성재배를 통한 물량 확보가 가능함</li> </ul>

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 일본

1. 지역경제를 활성화하고, 기후변화 대응 차원에서 경제산업성과 농림수산성이 협력하는 농상공연계를 추진하여 식물공장 사업을 추진 중
2. 일본의 식물공장 시장규모는 2009년 95억엔에서 2020년에는 417억엔으로 고성장할 것으로 전망되며, 정부의 식물공장 보조금지원에 의한 것으로 판단되며 현재 50여개의 식물공장이 운영되고 있으나 2012년에 150여개로 확대 될 예정
3. 일본의 식자재 공급업체인 스프레드는 기후변화 등으로 인한 가격변동 리스크 회피차원에서 2008년 식물공장을 설립하여 프릴양상추, 로메인양상추, 상추 등을 생산하여 대형마트와 호텔에 판매 중
4. 일본 (주)미라이의 'Green Flavor' 식물공장은 파나소닉의 형광등을 채용하여 도심 곳곳에 점포를 개설하고, 점포 내 식물공장 시설에서 직접 재배한 야채류를 판매 중

### 제 2 절 미국

1. 미국은 1960-1970년대 GE, General Food, General Mills 등 기업체를 중심으로 완전인공광형 식물공장에 대한 연구를 진행하였으나 경제성을 이유로 중도에 포기함
2. Vertical Farm(수직농장) 개념으로 진화 중이나, 구체적으로 진행되고 있는 사업은 없음

### 제 3 절 기술현황 및 기대 효과

구분	현재	기대효과
기술적 측면	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 하이브리드 전극 형광램프(Hybrid Electrode Fluorescent Lamp, HEFL)는 AdvanceAgri사에서 액정TV의 백라이트 기술을 응용하여 개발된 조명 장치로 LED의 특징을 모두 가지고 있으며, 수평조사 방식으로 균일한 조사가 가능하다고 하며, 제조원가면에서 LED 보다 merit를 가지고 있지만 널리 상용화되지 못함</li> <li>○ 화우테크놀로지, 와이즈산전, 카스트엔지니어링, 다인바이오, LG CNS, 파루, 파루스코리아, 우양디지컴, 유양디앤유, 오디텍, 인성테크, 신한, 서울반도체 등이 식물공장 관련 연구 및 제품생산을 시도하고 있으나, 대부분 조명업체 및 기계설비 업체로서 식물공장의 조명을 비롯한 하드웨어적인 부분 기술개발로 식물공장의 상용화 및 산업화에 무리가 따름(식물공장에 대한 보편적인 핵심요소기술 및 통합기술이 확립 및 정리되지 못한 상황)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형광등과 식물공장용 평면 냉음극 형광램프(Cold Cathode Fluorescent Lamp, CCFL)을 혼합적용함으로써 전력소비를 획기적 절감하고 LED 보다 가격경쟁력을 갖춰 상업화 및 실용화에 한발 더 다가갈 수 있는 복합 광원 조명 시스템 개발(CCFL 불용 폐품을 재활용한 면광원 개발로 비용절감 효과 기대)</li> </ul>
경제 산업적 측면	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 식물공장 관련 기업의 매출을 보면 아직 연구개발 및 사업성 검증 초기단계로 시장 미형성. 설포라판 기능성 소재관련 일본-오리자(20억엔, 30%)</li> <li>○ 식물공장 관련 일본-미우라농원 2,450천엔(순수익) 시즈오카현 5,516천엔(순수익)</li> <li>○ 생산량 : 현재 상추류 - 15,000주 (50 평) 연구개발 후 : 새싹류 (1톤/1개월/30평), 상추류 - 20,000주 이상 (50평 기준) - 1년내 손익분기점 달성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고품질의 균일화·규격화된 상품생산 및 가격결정 용이</li> <li>○ 소비트렌드와 기호변화에 대응 및 시장 접근성용이</li> <li>○ 고품질, 친환경, 고 영양, 고기능성, 안전성 등의 고부가가치 농산물을 적기·적소에 공급함으로써 농촌 수익 증대와 함께 해당 농산물의 시장 확대 효과</li> <li>○ 현재의 시장규모 - 세계시장 규모 : 200억원, 2013후 500억원 시장 형성 예상 - 한국시장 규모 : 30억원, 2013후 120억원 시장 형성 예상</li> </ul>

## 제 7 장 참고문헌

Aristoteli LP, O'Rourke JL, Danon S, Larsson H, Mellgard B, Mitchell H, Lee A. Urea, fluorofamide, and omeprazole treatments alter helicobacter colonization in the mouse gastric mucosa. *Helicobacter* 2006; 11: 460-468.

Brown ED, Wright GD. New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem Rev* 2005; 105: 759-774.

Byun SK, Lee YE, Shin SH, Jang JY, Choi BI, Park DS, Jeon JH, Nahm SS, Hwang SY, Kim YB. The role of corticosteroids in stress-induced gastric ulceration in rats. *Lab Anim Res* 2007; 23: 127-131.

Cantarella G, Martinez G, Cutuli VM, Loreto C, D'Alcamo M, Prato A, Amico-Roxas M, Bernardini R, Clementi G. Adrenomedullin modulates COX-2 and HGF expression in reserpine-injured gastric mucosa in the rat. *Eur J Pharmacol* 2005; 518: 221-226.

Cantarella G, Martinez G, Di Benedetto G, Loreto C, Musumeci G, Prato A, Lempereur L, Matera M, Amico-Roxas M, Bernardini R, Clementi G. Protective effects of amylin on reserpine-injured gastric damage in the rat. *Pharmacol Res* 2007; 56: 27-34.

Cao H, Wang MW, Jia JH, Wang QG, Cheng MS. Comparison of the effects of pantoprazole enantiomers on gastric mucosal lesions and gastric epithelial cells in rats. *J Health Sci* 2004; 50: 1-8.

Coghlan JG, Gilligan D, Humphries H, McKenna D, Dooley C, Sweeney E, Keane C, O'Morain C. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers: a 12-month follow-up study. *Lancet* 1987; 2: 1109-1111.

Cover TL, Blazer MJ. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer disease. *Annu Rev Med* 1992; 43: 135-145.

Dias PC, Foglio MA, Possenti A, de Carvalho JE. Antiulcerogenic activity of

crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 57-62.

El-Shinnawy NA, Abd-Elmageid SA, Alshailabi EM. Evaluation of antiulcer activity of indole-3-carbinol and/or omeprazole on aspirin-induced gastric ulcer in rats. *Toxicol Ind Health*. 2014; 30: 357-75.

Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7610-7615.

Filaretova L, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: 1082-1089.

Graham DY, Evans DG, Evans DJ Jr. *Campylobacter pylori*. The organism and its clinical relevance. *J Clin Gastroenterol* 1987; 11: S43-S48.

Hahm KB, Kim DH, Lee KM, Lee JS, Surh YJ, Kim YB, Yoo BM, Kim JH, Joo HJ, Cho YK, Nam KT, Cho SW. Effect of long-term administration of rebamipide on *Helicobacter pylori* infection in mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 24-38.

Haristoy X1, Angioi-Duprez K, Duprez A, Lozniewski A. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3982-3984.

Hiraishi H, Shimada T, Ivey KJ, Terano A. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 103-109.



Isbil BN, Gulec G, Ozluk K. Protective effect of centrally-injected glucagons-like peptide-1 on reserpine-induced gastric mucosal lesions in rat: possible mechanisms. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 1-6.

Isobe H, Okajima K, Harada N, Liu W, Okabe H. Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 313-320.

Jainu M, Devi CS. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *J Ethnopharmacol* 2006; 104: 156-163.

Kim YR, Lee MR, Kim YH, Jang BJ, Park SC, Han SH, Kim BH, Ryoo ZY, Kim KS. Effect of *Opuntia humifusa* extract on indomethacin-induced gastric ulcer in Sprague Dawley rat. *Lab Anim Res* 2005; 21: 375-578.

Kurilich AC1, Tsau GJ, Brown A, Howard L, Klein BP, Jeffery EH, Kushad M, Wallig MA, Juvik JA. Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem*. 1999; 47: 1576-81.

Lee A, Fox J, Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun* 1993; 61: 1601-1610.

Marshall BJ. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: have Koch's postulates been fulfilled? *Ann Med* 1995; 27: 565-568.

Neal MJ. *Medical Pharmacology at a Glance*. 3rd ed, Blackwell Publishing Inc., London, 2003; pp 30-31.

Ozbakiş Dengiz G, Gırsan N. Effects of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on indomethacin-induced ulcer model in rats. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16: 85-88.

Pope AJ, Toseland CD, Rushant B, Richardson S, McVey M, Hills J. Effect of potent urease inhibitor, fluorofamide, on *Helicobacter* sp. in vivo and in

vitro. Dig Dis Sci 1988; 43: 109-119.

Raffin RP, Colom LM, Schapoval EE, Jornada DS, Pohlmann AR, Guterres SS. Gastro-resistant microparticles containing sodium pantoprazole: stability and in vivo anti-ulcer activity. Open Drug Deliv J 2007; 1: 28-35.

Rao ChV, Ojha SK, Radhakrishnan K, Govindarajan R, Rastogi S, Mehrotra S, Pushpangadan P. Antiulcer activity of *Utreria salicifolia* rhizome extract. J Ethnopharmacol 2004; 91: 243-249.

Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and apoptosis in gastric mucosal injury by indomethacin: effect of omeprazole and ebrotidine. Scand J Gastroenterol 1997; 32: 638-642.

Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. FASEB J 1996; 996: 731-740.

Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 1991; 338: 1175-1176.

Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S, Tauchi M, Suzuki H, Hyodo I, Yamamoto M. Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. Cancer Prev Rev (Phila) 2009; 2: 353-360.