

발간등록번호
11-1390000-001906-01

최 중
연구보고서

십자화과 채소류 부산물을 이용한 생물신소재 개발

Development of Health-benefit Materials from Broccoli by-products

상주대학교
생명자원과학대학

농 림 부

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “십자화과 채소류 부산물을 이용한 생물신소재 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

제출일시 : 2008년 3월 31일

과제수행참여 연구원

과 제 명	연구책임자		연구수행 참여자		세부과제 수행기간
	소속기관	성 명	소속기관	성 명	
○ 유용활성 물질분석 및 활성 검증	상주대학교	최용화	상주대학교 상주대학교	정민철 신봉현	'06~'07
○ 생물소재 개발 및 산업화	(주)비아이지	정종상	(주)비아이지	박종철 차광호 박수희 양희덕	'06~'07

여 백

목 차

Summary

I. 연구목적

II. 연구개발의 목표 및 내용

III. 재료 및 방법

IV. 연구결과 및 고찰

IV. 연구개발 결과의 활용계획

V. 참고문헌

여 백

SUMMARY

I. Title

Development of Health-benefit Materials from Broccoli by-products

II. Scope and Rationale

Not only that broccoli is recently known to contain anti-cancer and detoxification enzyme, but also, in the West consumption is rapidly increasing. Through the cooperation result treatise published in The American National Academy of Science journal, John's Hopkins university in America and National Science center in France have announce that a component called sulforaphane in broccoli and broccoli sprout kill *Helicobacter pylory* which is the cause of an ulcer of stomach and gastric cancer. Through the experiment on rats, sulforaphane compound killed *Helicobacter pylory* in inside and outside of the paunch cell, especially killed *Helicobacter pylory* with resistant of an antibiotics. *Helicobacter pylory* in paunch cell can be killed by antibiotics, however, it is expensive and has bad side-effects such as killing the useful bacteria that helps digestion at the same time.

In broccoli, there are four to five flowers and more than ten to fifteen leaves, however, only the flowers are used for food and the remaining is wasted. Because glucosinolates which is precursor of sulforaphane are contained in the stem and leaves also, treatment will help to get more sulforaphane than flower, development in using leaves and stem would be needed.

Because in the research, all parts of broccoli including the low quality parts which are usually thrown away, are used, it is very economical way of developing the topic.

III. Results

To search the content of sulforaphane in leaves of brassicaceous plants, the amount of sulforaphane was analyzed for nineteen sorts of broccoli, eleven

sorts of chinees cabbage, and six sorts of radish. For the result, sulforaphane was found in only one sort of radish and chinese cabbage, on the other hand, eleven sorts out of nineteen sort of broccoli contained sulforaphane. Because among only eleven sorts out of nineteen sorts sulforaphane could be found, it leads to the fact that different kind and the temperature of the culture could make a difference in the ability of making sulforaphane.

After grinding the broccoli leaves with blinder, analyzed the amount of sulforaphane made related to the time. After being grinded by the blinder, amount of sulforaphane in broccoli leaves was rapidly raised after thirty minutes and maintained the amount till sixty minutes have passed. Biosynthesized sulforaphane was found in powder of leaves when it was dried by freezing, but when it was dried by the hot wind, it couldn't be found in powder because to be volatile.

When the amount of sulforaphane was analyzed by the parts of broccoli, the root had the most sulforaphane and then leaves, then stem, and the flower had the least. To find how long biosynthesized sulforaphane could maintain, analyzed the amount of sulforaphane in both room temperature and in freezing temperature. In freezing temperature, sulforaphane maintained longer than in room temperature. However, even in frozen condition, the amount of sulforaphane was reduced to half or less after 3 weeks.

To maintain the amount of sulforaphane, used heat treatment, ethanol treatment, biocoating method, nitrogen gas charging method, and capsulation treatment, however, in any method, half or more of the amount of sulforaphane was reduced after 3 weeks. Extract that was extracted from the leaves of broccoli, seemed to have antibiotics toward *Helicobacter pylory*.

IV. Remarks

1. Analyzed the content of nineteen sort of broccoli, eleven sort of chinees cabbage, and six sort of radish. For the result, sulforaphane was found in only one sort of radish and chinese cabbage, on the other hand, eleven sort out of nineteen sort of broccoli contained sulforaphane.

2. After being grinded by the blinder, amount of sulforaphane in broccoli leaves was rapidly raised after thirty minutes and maintained the amount till sixty minutes have passed.

3. When the amount of sulforaphane was analyzed by the parts of broccoli, the root had the most sulforaphane.
4. In freezing temperature, biosynthesized sulforaphane maintained longer than in room temperature. However, even in frozen condition, the amount of sulforaphane was reduced to half or less after 3 weeks.
5. To maintain the amount of sulforaphane, used heat treatment, ethanol treatment, biocoating way, nitrogen gas charging way, and capsulation treatment, however, in any way, half or more of the amount of sulforaphane was reduced after 3 weeks.
6. Extract that was extracted from the leaves of broccoli, seemed to have antibiotics toward *Helicobacter pylori*.

Contents

Chapter 1	Research purpose
Chapter 2	Research objects
Chapter 3	Research materials and methods
Chapter 4	Research results and investigations
Chapter 5	Research extension program
Chapter 6	References

I. 연구목적

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

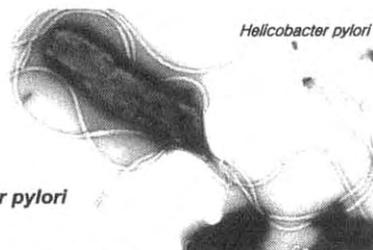
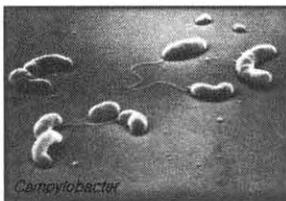
브로콜리(broccoli)는 십자화과에 속하는 채소로 최근, 항발암 및 해독효소의 유도 효과가 크다고 알려져 많은 연구 (Zhang et al., 1992; Aspry and Bjeldanes, 1983; Beecher, 1994, Kim et al., 1997b; Kim et al., 1997; Kim et al., 1997a; Howard et al., 1997)가 진행됨은 물론, 서양에서는 브로콜리의 소비량이 상당히 많이 증가되고 있는 실정이다.

미국 존스 홉킨스 대학과 프랑스 국립과학연구센터는 미 국립과학원 학술지에 실린 공동 실험결과 논문을 통해 브로콜리와 브로콜리의 싹에 들어 있는 suforaphane이라는 성분이 위궤양과 위암의 원인인 헬리코박터 박테리아를 죽이는 것으로 확인됐다고 밝혔다. 쥐를 상대로 한 실험 결과 위 세포의 안과 바깥에 있는 헬리코박터 박테리아를 모두 죽이며 (Haristoy et al., 2003), 특히 항생제에 내성이 있는 박테리아도 죽이는 것으로 나타났다. 헬리코박터 박테리아는 항생제로도 없앨 수 있으나 이는 비용이 비싼데다 소화를 돕는 박테리아를 함께 죽이는 등의 부작용이 문제점으로 지적돼왔다.

*Helicobacter pylori*의 발견과 특징은 다음과 같다.

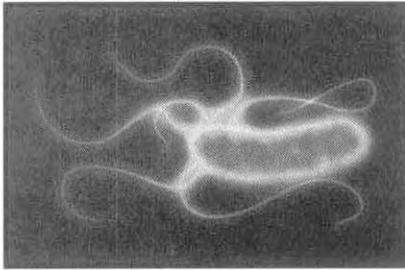
Campylobacter Organism (CLO)
Campylobacter pylordis
Campylobacter pylori
Helicobacter pylori

Marshall 1983
Marshall et al. 1984
Marshall, Goodwin 1987
Goodwin 1987



Helicopter + bacteria ----- *Helicobacter pylori*

International Agency for Research on Cancer (IARC) ⇒ Definite carcinogen group



- 그람음성, 미호기성
- 2~7 X 0.4~1.2 μm
- 체내의 위상피세포에서만 발견됨
- 위점막의 점액층과 상피세포 사이에

colony 형성

- 감염률은 저개발국과 나이가 많을수록 높음
- Urease를 생성하여 낮은 pH에서 생존

꽃봉오리가 다발로 이루어진 꽃을 식용하는 브로콜리는 한 줄기에서 꽃이 4~5개 정도 맺히고, 잎은 10~15장 이상 나와 매우 무성하나 꽃만 식용으로 하기 때문에 잎은 모두 버려지고 있다. 그러나 브로콜리의 줄기와 잎에도 sulforaphane의 전구물질인 glucosinolates이 다량으로 함유되어 있어 가공공정을 개발하면 꽃봉오리보다 높은 sulforaphane을 생합성 시킬 수 있어 이에 대한 활용도 개발이 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

자원의 재활용측면에서 폐기물인 브로콜리의 잎과 줄기를 이용하여 유용 화합물의 함량을 높이는 가공공정의 개발이 절실히 요구된다. 소비자의 소비욕구와 생활의 질 향상으로 기능성 식품산업은 특정한 생리조절 기능이 우수한 원료 농산물의 발굴을 필요로 한다. 따라서 브로콜리의 부산물을 이용하여 신 개념의 기능성 생물소재를 발굴함으로써 농산물의 부가가치를 높여 농가에 보탬이 될 뿐만 아니라 생리활성을 가진 생물소재를 발굴하여 국내 소비는 물론 수출의 활로를 개척 할 수 있다.

모든 브로콜리에서 활성 물질인 sulforaphane 발견되는 것은 아니며 종자에 따라 함량에 많은 차이를 보여주고 있다 (김 등, 1997). 따라서, 일부에선 육종을 통한 sulforaphane 함량이 높은 종자의 개발, 어린 싹에 수확에 달하는 함량이 포함되어 있다는 보고가 있다. 미국에선 현재 어린 싹을 키워 기능성 식품으로 판매하고 있으며 여기서 추출한 sulforaphane 을 알약 형태로 만들어 판매를 하고 있는 실정이다. 또한, 식물 조직배양을 통해 sulforaphane 생성량을 최대로 할 수

있는 방법을 모색하고 있다. 하지만 이 모든 분야는 고비용 시스템을 사용하고 있어 경제성이 떨어지는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 화퇴 부분 외에 버려지는 부위와 상품성이 없는 화퇴 부분을 포함해 브로콜리 전체를 가공 대상으로 하기 때문에 상당히 경제성이 높은 소재 개발 방법이라 할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

최근 식생활패턴의 서구화로 인하여 성인병 등 각종 만성질환이 증가하고 있고 이에 따라 국민들의 식품소비형태도 건강 지향적으로 변하고 있어 새로운 건강식품소재의 개발이 절실히 요청되고 있다. 앞에서 언급되었지만 브로콜리 부산물(잎, 줄기, 상품성이 떨어지는 화퇴)의 경우 영양학적으로나 생리활성 물질의 함유량으로나 전혀 손색없는 식품 소재로서의 중요한 가치를 지니고 있는 자원임에도 불구하고 이에 대한 체계적인 연구 및 이를 이용한 소재나 식품의 개발이 이루어지지 않았다.

값싼 부산물에서 훌륭한 기능성 소재의 발굴은 이제까지 여러 가지 중요한 기능적 가치를 지니고 있으면서 가공방법의 문제이거나 소재로써의 활용 아이디어를 얻지 못한 기타 부산물들에 대해서도 다시 한 번 생각해 볼 수 있는 좋은 기회가 될 것으로 판단된다. 웰빙은 멀리 있는 고도한 것이 아니고 우리 주위에 있는 것을 어떻게 잘 먹고 우리 몸을 잘 다스리느냐가 관건이라 할 수 있을 것이다.

이러한 측면을 보았을 때도 본 연구 과제에서 수행하려는 부산물로부터 소재의 발굴은 자원의 리사이클이라는 중요한 의미를 부여하며 대다수 국민들에게 좋은 훌륭한 소재가 있음에도 가격적인 측면이나 제품에 대한 불신의 이유로 이용하지 못한 소재에 대해 저렴한 가격에 확신을 가지고 이용 할 수 있는 기반을 만드는데 큰 의의가 있을 것으로 판단된다.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

가. 브로콜리의 성분 및 효능

브로콜리(broccoli)는 십자화과에 속하는 채소로 항산화, 항위장병균, 항발암 및 해독효소의 유도 효과가 크다고 알려져 서양에서는 브로콜리의 소비량이 증가되

고 있다. 브로콜리에 함유된 주요 생리활성물질로는 베타-carotene, 알파-tocopherol, ascorbate, 엽산, Vitamin A과 같은 강한 항산화 활성물질 외에 glucoraphanin, aliphatic glucosinolates, indolyl glucosinolates, 등과 같은 영양분이 알려져 있고 (Jeffery et al., 2003) 약효성분으로는 sulforaphane, indole-3-carbinol, diindolylmethane 등의 화합물이 존재하는 것으로 밝혀졌다.

특히 sulforaphane(S-methylsulfonylbutyl isothiocyanate)는 phase II 효소들 (glutathione S-transferase)의 활성을 유도하지만 발암전구체를 발암원으로 활성화 시키는데 관여하는 것으로 알려진 phase I 효소는 유도하지 않는 것으로 알려져 있으며, 위궤양과 위암의 원인이 되는 세균 (*helicobacter pylori*)을 사멸시키는 것이 Johns Hopkins University 의과대학 Fahey 박사 연구팀(Fahey et al., 1997)에 의해 밝혀졌다.

Brassica Protection Products (BPP)社は 브로콜리 종자를 발아시켜 3일간 생육한 어린싹으로 “Brassica Tea”와 “BroccoSprouts”을 출시하고 있다. 미국의 일부 기업에서 다양한 전문 소재로의 개발을 서두르고 있다. 브로콜리의 함유된 다양한 생리활성은 항암뿐만 아니라 강력한 항산화효과를 지니고 있어 화장품등에 다양한 접근이 시도 되고 있다.

나. 브로콜리의 생체 기능성 실험

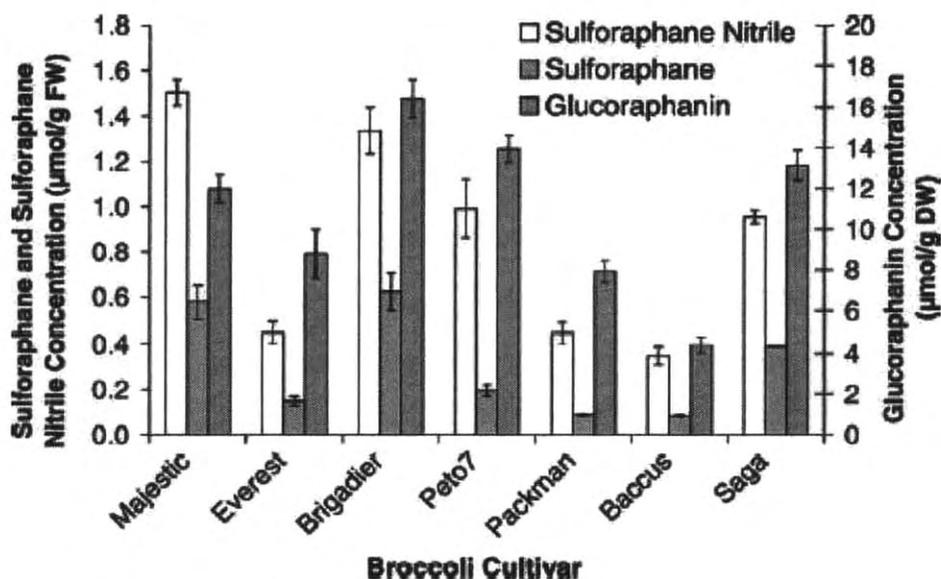
브로콜리 꽃 봉우리와 어린 싹에 있는 sulforaphane이 위염을 일으키는 원인균인 *Hericobacter pylory* 45종 중 대부분의 균에서 Minimum inhibitory concentration (MIC)가 4ppm 이하인 것으로 밝혀졌다 (Fahet et al., 2002). 또한 이 화합물은 암 유발 화합물을 해독시키는 enzyme (phase II)의 생산량을 증가시켜 암 예방 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

브로콜리와 같은 겨자과(*cruciferous*) 야채들은 동물실험에서 자기면역 질병인 피부결핵 낭창(lupus)을 예방, 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.

브로콜리에 함유되어 있는 indole-3-carbinol을 마우스에 투여한 결과 낭창을 지연시키고 병증을 완화시키는 것으로 North Shore-Long Isoland Jewish Research Institute의 연구에서 밝혀졌다. 또한 이 화합물은 antiestrogen 역할로

친 상태와 유사하게 생 브로콜리를 마쇄한 후 이를 원료로 실험을 진행한 결과 일반 슈퍼마켓에서 판매되는 브로콜리의 경우 20%의 sulforaphane과 80%의 sulforaphane nitrile로 이루어져 있다고 발표했다.

Myrosinase에 의해 sulforaphane 이 생성될 때 단지 20%만 생성되고 나머지 80%는 항암작용이 없는 sulforaphane nitrile 이 생성된다는 것이다.



브로콜리 안에 함유된 ESP라 불리는 단백질이 있는데 이것은 myrosinase 의 cofactor로써 작용하며 sulforaphane nitrile 생성을 유도한다. 여기에 적당한 열을 가하면 온도에 민감한 ESP의 활성을 떨어뜨려 sulforaphane 생성량을 늘일 수 있다고 발표하였다. 문제는 sulforaphane의 전구체인 glucoraphanin이 많이 생성하는 종자를 선별하는 것이고 다음은 이것을 어떻게 sulforaphane 으로 유도하는 가공조건을 설계하는 것이다.

이러한 조건이 갖추어 지지 않는다면 브로콜리를 먹는다는 것이 아무런 의미 없는 일이 될 수도 있다. 또한, 추출 분리된 sulforaphane 을 알약 형태로 섭취하는 것은 약이라는 부담으로 섭취가 꺼려질 수도 있으며 또한 대중화시키기에는 가격적인 경제력이 다소 떨어지는 문제점이 있다.

II. 연구개발의 목표 및 내용

브로콜리 부산물을 이용 가공식품 소재화 기술을 개발하고 다양한 가공제품을 개발하여 브로콜리 부산물의 생리적 효능 및 활성을 동물실험을 통해 확인하고자 한다.

1. 브로콜리 부산물인 잎과 줄기를 이용하여 sulforaphane 고함유 가공 공정 개발

- 가. 전국에 재배되고 있는 주요 종자의 잎, 줄기, 화뢰의 glucoraphanin 및 sulforaphane 함량 조사.
- 나. Endogenous sulforaphane의 정량, 정성분석 기술개발
- 다. 다양한 가공조건 설계 후 가장 경제적인 조건 및 효율 조사
- 라. 가공공정에 따른 sulforaphane의 함량 비교
- 마. 가공공정 후 sulforaphane의 함량 변동 조사

2. 브로콜리 부산물을 이용한 생물소재 개발

- 가. 안정적 가공 조건 확립
- 나. Sulforaphane 고함유 가공품 개발
- 다. 생체 기능성 활성물질 검토

3. 동물실험을 통한 생체 기능성 검토

- 가. 항 당뇨 및 당뇨병 합병증 예방 효과 검토
- 나. 항산화 및 항암 효과
- 다. 항균 활성(헬리코박터 파이로리) 분석

4. 브로콜리 생물소재를 이용한 상품 개발

- 가. 가공품을 이용하여 건강 기능성 식품개발

III. 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 시료

브로콜리는 제주농업기술원에서 조생종 13종 과 중만생종 6종을 분양받아 사용하였고 십자화과 채소는 원예연구소에서 총 19종을 분양받아 분석하였다.

구분	품종	재배지	시료채취 시기	비고
브로콜리	조생종 13종	제주도농업기술원	10월 중순 수확	Sulforaphane함량 분석 용
	중만생종 6종	제주도농업기술원	2월 중순 수확	Sulforaphane함량 분석 용
	필그림	상주대학교 포장	6월 말 수확 10월 초 수확	Sulforaphane함량 경시변화 분석용
십자화과	배추 11종 (s1~s11)	원예연구소		Sulforaphane함량 분석 용
	무우 6종 (s14~s19)	원예연구소		Sulforaphane함량 분석 용

나. 시약

- (1) Sulforaphane 표준품은 Calbiochem, USA에서 구입하여 사용하였다.
- (2) 기타 사용된 시약은 특급시약 혹은 HPLC grade 시약을 사용하였다.

2. 분석방법

가. 시료 조제방법

브로콜리 잎을 Blinder로 균질화하여 일정기간 상온에서 방치한 후 48시간 동결건조 또는 고온 건조하여 sulforaphane 분석에 사용하였다.

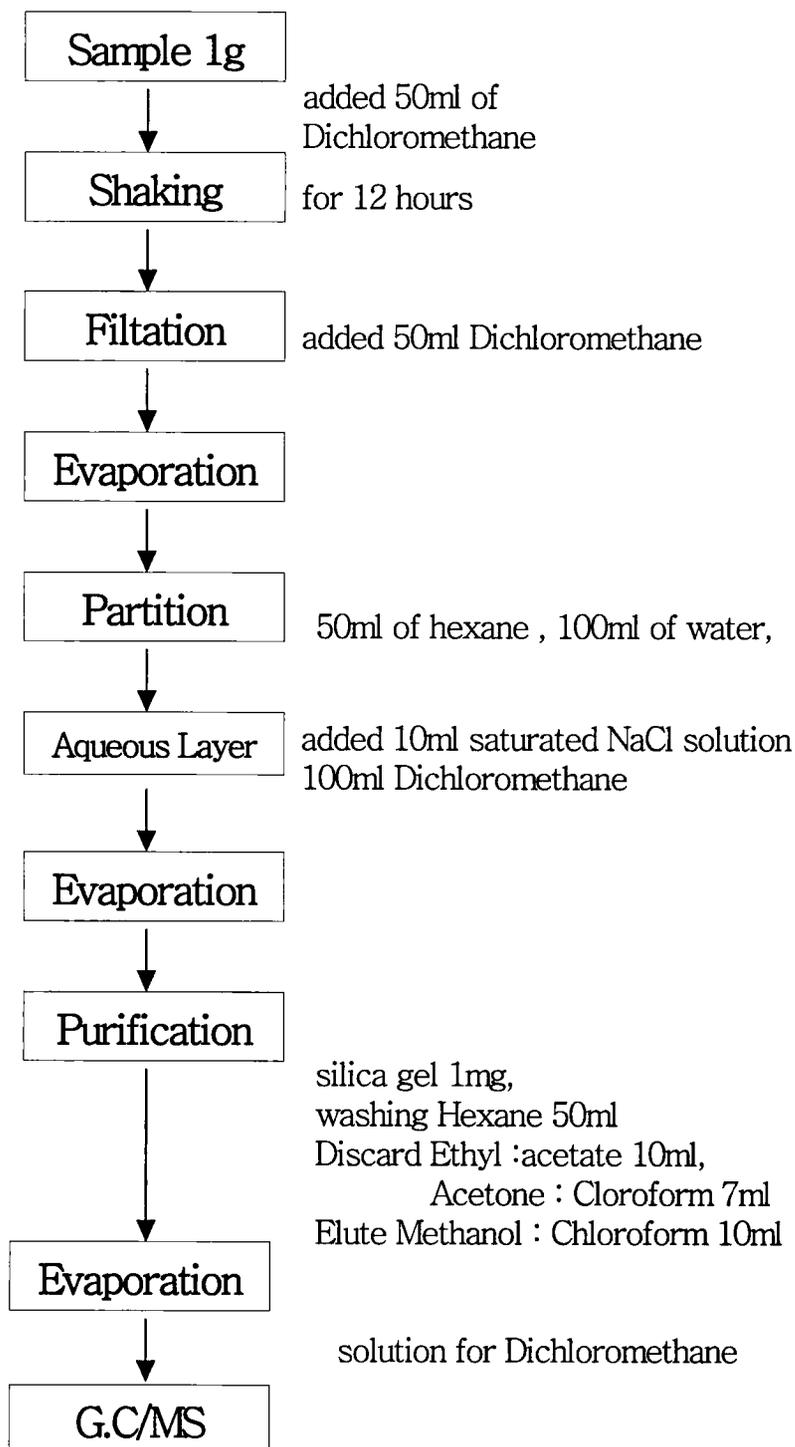
나. Sulforaphane 추출 및 정제

- (1) 용매추출에 의한 시료 전처리는 액상추출법에 의해 처리하였다.
- (2) 동결건조된 시료 1g에 50ml dichloromethane을 가하여 12시간동안 shaking 후 여과하고 다시 50ml dichloromethane을 가하여 여과 후 농축하였다.

농축물에 50ml water, 1ml NaCl을 가한 후 50ml hexane으로 2회 추출하여 농축, 다시 농축물에 9ml NaCl을 가하고 100ml dichloromethane으로 2회 추출

하여 농축하였다.

1g Silica gel column chromatography에 loading 후 hexane과 10ml EtOAc, 7ml 2% acetone in chloroform으로 씻어준 후 10ml 5% methanol in chloroform으로 용출 농축, 2ml hexane으로 정용하여 sulforaphane을 정량 분석하였다.



다. GC/MS에 의한 sulforaphane 정량분석

정성분석은 GC/MS로 분석하였으며 정성분석은 GC/MS SIM mode로 분석하였다.

(1) 분석기기

- 1) Gas chromatograph equipped with 5973N mass spectrophotometer (6890N, Agilent, U.S.A)
- 2) SIM(Selective ion monitoring) detector
- 3) Monitored ions : m/z 177, 160, 115

(2) 분석조건

- 1) Injector temperature : 280°C
- 2) Oven temperature : holding 180°C (15min) increase 280°C (10min)
- 3) Column : DB-5MS capillary column
(30m×0.25mm I.D.×0.25 μ m, Agilent)
- 4) Gas flow rate : He 1ml/min
- 5) Split ratio : 10 : 1
- 6) Injection volume : 1 μ l
- 7) Inlet temp. : 300°C
- 8) Mass source temp. : 230°C

3. 실험방법

가. 브로콜리 잎으로부터 sulforaphane의 정성분석

브로콜리 잎 10g을 Blinder로 마쇄하여 상온에서 1시간정도 방치 후 동결건조하여 상기에서 기술한 방법에 의해 추출하여 full scan GC/MS로 분석하여 표준품 sulforaphane의 spectrum과 비교 동정하였다.

나. 십자화과 작물의 잎으로부터 sulforaphane의 함량분석

십자화과 작물인 배추 11종과 무우 6종을 분양받아 위에서 기술한 방법에 의해 sulforaphane 함량을 분석하였다.

다. 브로콜리 잎을 균질화 후 방치시간에 의한 sulforaphane 생합성 함량분석

Blinder로 균질화한 후 상온에서 방치시간별 sulforaphane의 생합성량을 측정하여 최적생합성 시간을 분석하였다.

라. 브로콜리 품종별 및 부위별 sulforaphane 생합성 함량 분석

- (1) 브로콜리 조생종 13종과 중만생종 6종을 분양받아 동일한 조건으로 가공하여 sulforaphane의 생합성 함량을 분석하였다.
- (2) 다량으로 sulforaphane을 생합성하는 브로콜리 4종을 대상으로 꽃 봉우리, 잎, 줄기, 뿌리 부위로 구별하여 sulforaphane의 생합성 함량을 비교 분석하였다.

마. *de novo* 생합성 된 sulforaphane의 경시변화

생합성 된 sulforaphane의 경시변화에 대해서 분석하였다. 다량으로 생합성 되는 브로콜리의 잎을 동일조건으로 가공하여 냉동보관과 상온조건에 방치하여 sulforaphane의 함량변화를 분석하였다.

바. 열처리에 의한 sulforaphane의 함량 변화

- (1) 생합성 된 sulforaphane의 경시적 함량감소를 억제하고자 60℃와 120℃로 1시간씩 처리한 후 evaporator로 농축하여 상온에 보관하면서 sulforaphane의 함량변화를 분석하였다.
- (2) 60℃로 열처리할 경우 처리시간에 따른 sulforaphane 함량의 경시변화를 분석하자

30분, 60분, 120분간 ethanol로 처리한 후 evaporator로 농축하여 상온에 보관하면서 sulforaphane의 함량변화를 분석하였다

사. Ethanol 처리에 의한 sulforaphane의 함량 변화

생합성 된 sulforaphane의 경시적 함량감소를 억제하고자 ethanol 처리량에 따른 sulforaphane 함량의 경시변화를 분석하였다.

아. Biocoating에 의한 sulforaphane의 함량 변화

브로콜리 환을 만들어 표면을 식용용 수지로 coating 하였다.

자. 질소가스 충전에 의한 sulforaphane의 함량 변화

시료를 식용수지를 가하여 granule 상태로 만들어 알루미늄 봉투에 투입한 후 진공포장기 SW-600을 이용하여 챔버 내에서 진공 후 질소를 충전 접착하였다.

차. Capsulation에 의한 sulforaphane의 함량 변화

하드캡셀자동충전기 (EXC-40F)를 이용하여 시료를 캡슐에 넣고 봉합처리 하였다.

하. *Helicobacter pylori* 항균 활성검정

(1) 시료준비

동결건조한 시료 100g에 1,000ml dichloromethane을 가한 후 12시간 진탕하였다. 추출물을 evaporator에서 농축하여 정량하였다.

(2) 사용균주 및 배양실험에 사용한 균주는 위·십이지장 궤양 원인균으로 알려진 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 배양은 10%(v/v)의 calf serum (Gibco BRL, USA)을 함유하는 brucella broth (Difco, USA)를 사용하여 10% CO₂ incubator에서 microaerobic condition을 유지시켜 주고, 습도는 항상 95% 이상 유지하면서 37°C에서 3회 계대 배양하여 사용하였다.

(3) 브로콜리 추출물의 항균효과 및 최소 저해 농도(MIC) 측정

*H. pylori*에 대한 브로콜리 추출물의 항균효과는 agar disc diffusion으로 조사하였다. *H. pylori*를 10⁸~10⁹ CFU/mL의 농도로 brucella 한천배지에 도말 한 후 멸균된 paper disc (inner diameter 8mm)를 올려놓았다. 브로콜리 추출물은 membrane filter (0.45µm)로 제균하고 paper disc에 각각의 농도로 첨가하여 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 paper disc 주위에 생성된 inhibition zone의 유무 확인 및 직경을 측정하여 항균 활성을 측정하였다.

MIC(Minimum Inhibition Concentration)는 Kudo와 Saga (1990)의 방법을 수정하여 측정하다. 탁도를 맞춘 균을 brucella broth에 접종한 후 제균한 브로콜리 추출물을 농도별로 처리하여 37°C CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 100 µl 씩을 취하여 brucella 한천 배지에 도말하고 동 조건으로 배양시켜 colony 생성유무를 확인하여 MIC를 측정하였다.

본 실험의 대조구로는 브로콜리 표준물질인 D,L-Sulforaphane (Calbiochem, U.S. and Canada)과 *H. pylori*의 치료제인 Tetracycline (Sigma, USA)를 사용하였다.

(4) 브로콜리 추출물의 urease 활성 억제

먼저, *H. pylori*로부터 crude urease의 분리는 하(2001)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 brucella broth에 3일간 배양한 *H.pylori*를 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 2회 세척 한 후 4°C에서 6분간 sonication(U200S control,

Ika, Germany)시키고, 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 crude urease로 사용하였다. 이 때 단백질 농도는 Lowry 방법(Lowery et al., 1951)에 따라 측정하였다. 분리된 urease 활성은 이 등(Lee et al., 1999)의 방법으로 urea broth (Difco, USA) 1 mL에 urease 300 μ l를 첨가하여 20°C에서 1시간 동안 반응시키며 10분 간격으로 pH 및 흡광도(O.D._{560nm}) 변화를 측정하였다.

브로콜리 추출물의 urease 억제효과는 이 등(Lee et al., 1999)의 방법으로 4.2 mL urea broth에 브로콜리 추출물을 500 μ l 첨가한 후 pH를 7.0으로 보정한 다음 300 μ l의 urease를 첨가하여 20°C에서 1시간 반응시키면서 10분 간격으로 pH 변화를 측정하였다. urease 활성 억제는 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 pH 변화값을 1로 기준하여 각 농도에 따른 추출물의 pH 변화를 백분율로 환산하였다.

(5) 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 조사

*H. pylori*에 시료를 처리하여 24시간 후의 세포벽의 변화를 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 각각 배양된 세포균주 배양액을 0.1 M phosphate buffer (pH7.4)로 여러 번 세척 한 후 2.5% glutaraldehyde로 전 고정한 다음 동일 buffer로 세척 후 1% OsO₄로 후 고정한 뒤 tannic acid로 전도염색을 하였다. 이를 ethanol로 탈수 한 후 isoamyl acetate로 치환 과정을 거쳐 critical point dryer (Hitachi-HCP-2, Tokyo, Japan)로 건조시키고 순금을 300 nm 두께로 도포한 후 주사전자현미경 (Hitachi S-450, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(6) Western blot에 의한 외독소 단백질의 발현 변화 조사

브로콜리 추출물이 *H. pylori*가 생산 하는 외독소 vacA 와 cagA의 발현 정도를 측정하기 위해 Western blot방법을 실시하였습니다. *H. pylori*을 15 mL conical tube에 1.5X10⁸ cfu/mL로 접종하여 브로콜리 추출물을 처리하여 24시간 배양한 뒤 3,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 그 침전물에 용해 buffer (50 mM tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 mM PMSF, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL aprotinin, 1M DTT) 300 μ L를 첨가하여 빙냉하에서 1분간 sonication 하여 세균을 용해시켰다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 상등액을 얻은 다음 BCA kit를 사용하여 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

전기영동을 하여 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane (Millipore; Billerica, MA)과 transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 350 mA에서 120분간 transfer 시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 fast green solution으로 transfer의 유무를 확인한 후, 5% non-fat skim milk solution 으로 blocking하였다. 4°C에서 일차 항체와 24시간 반응 시킨 후 TST (100 mM Tris-Cl, 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20)를 이용하여 10분 간격으로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체와 2시간 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 항체와 반응한 membrane에 ECL 진단 kit의 발색 시약 I 과 II를 40:1로 섞은 혼합액을 도포하고, X-ray film에 노출하여 현상한 후 film상의 band 농도를 관찰하였다.

IV. 연구결과 및 고찰

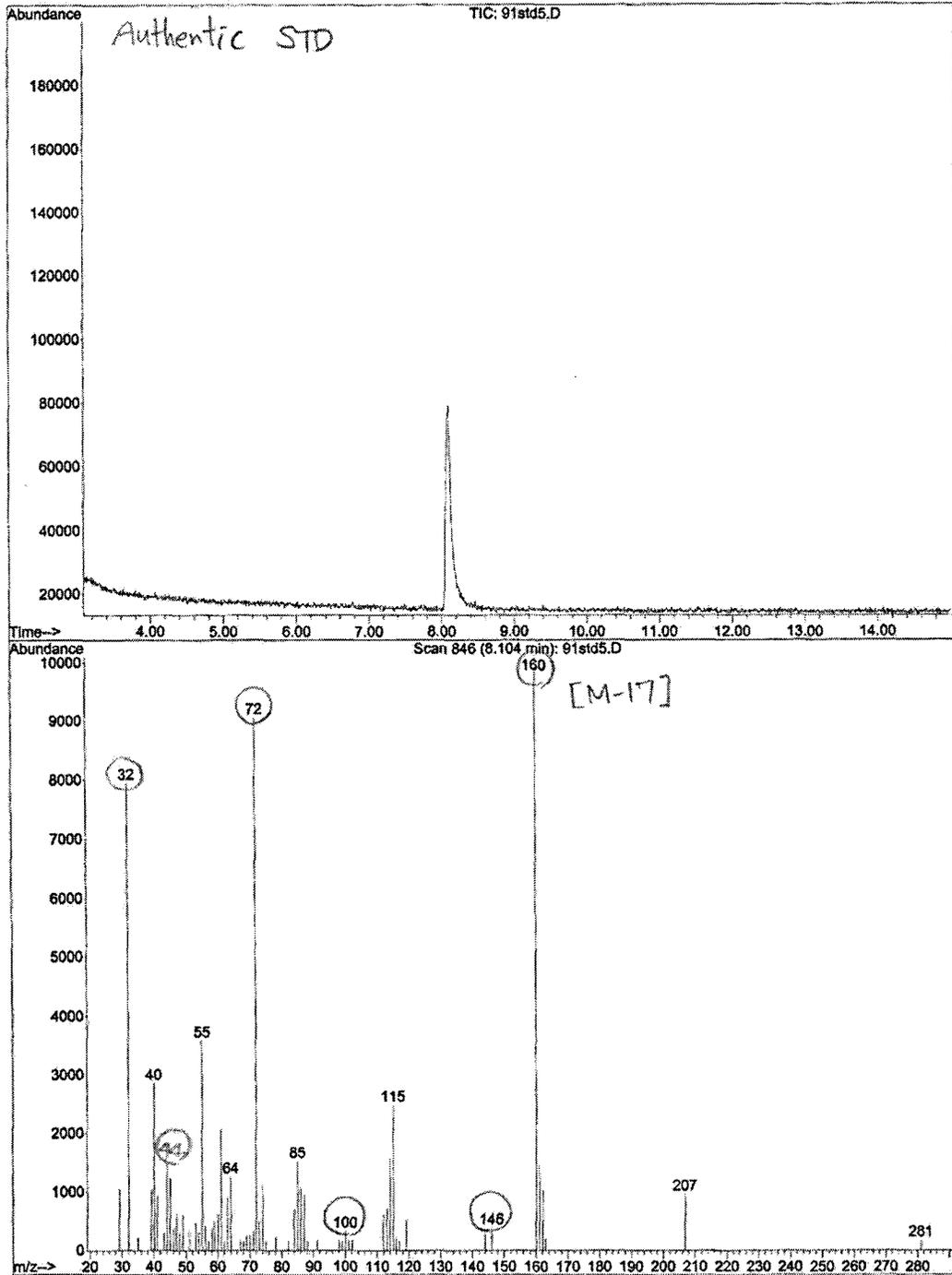
1. Sulforaphane의 정량, 정성분석법 연구

가. 브로콜리 잎으로부터 sulforaphane의 정성분석

(1) 브로콜리 잎 10g을 Blinder로 마쇄하여 상온에서 1시간 정도 방치 후 동결건조하여 위에서 기술한 방법에 의해 추출하여 full scan GC/MS로 분석하여 표준품 sulforaphane의 spectrum과 비교한 결과 잎으로부터 추출한 분획에서 표준품 sulforaphane spectrum과 동일한 패턴을 나타내 브로콜리의 잎도 sulforaphane이 생합성 되는 것으로 판단되었다.

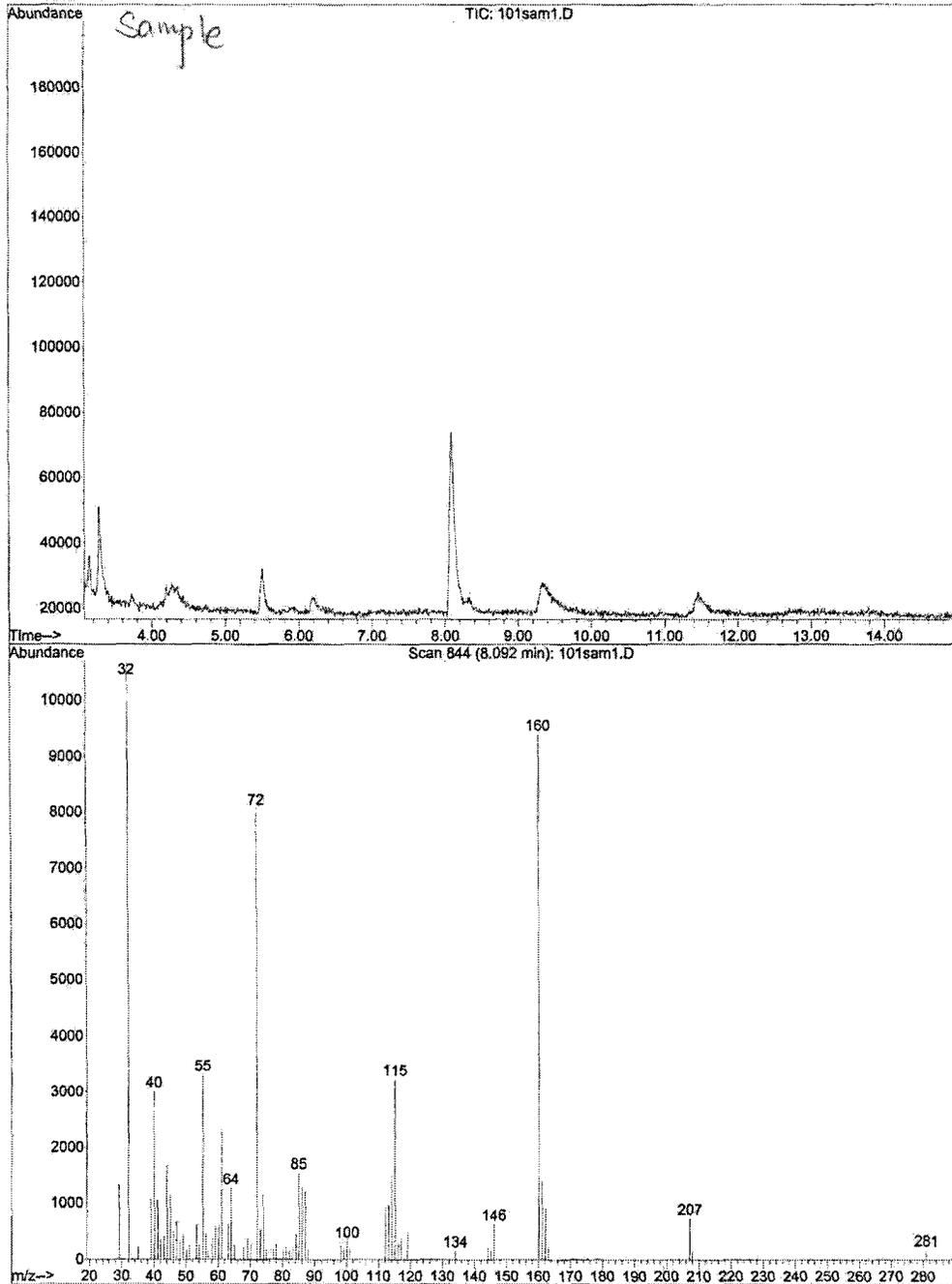
1) 표준품 sulforaphane의 full scane GC/MS spectrum

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\sulfo1109\91std5.D
Operator : hplca@sangju.ac.kr
Acquired : 10 Nov 2007 3:35 using AcqMethod SP0717.M
Instrument : Instrument #1
Sample Name: std5
Misc Info :
Vial Number: 5



2) 브로콜리 잎으로부터 분리한 sulforaphane fraction의 spectrum

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\sulfo1109\101sam1.D
Operator : hpica@sangju.ac.kr
Acquired : 10 Nov 2007 10:07 using AcqMethod SP0717.M
Instrument : Instrument #1
Sample Name: sample 1
Misc Info :
Vial Number: 1



(2) 브로콜리 잎으로부터 sulforaphane의 정량분석

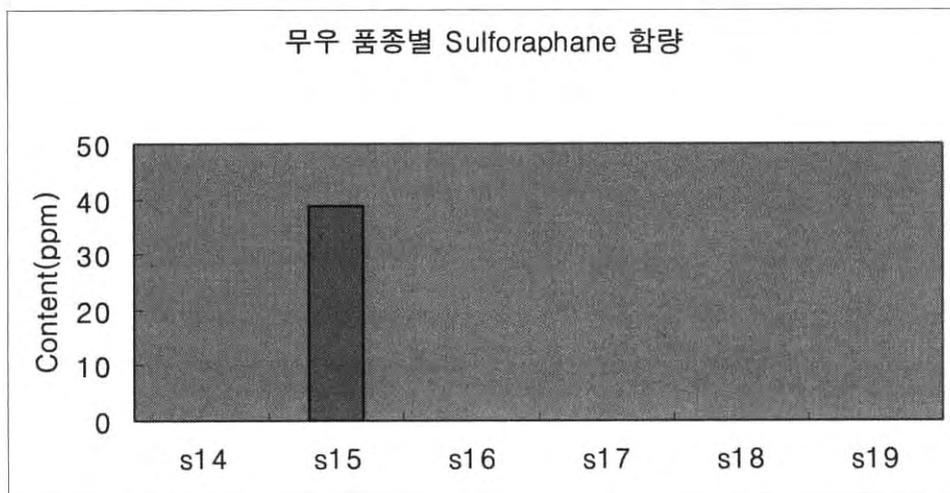
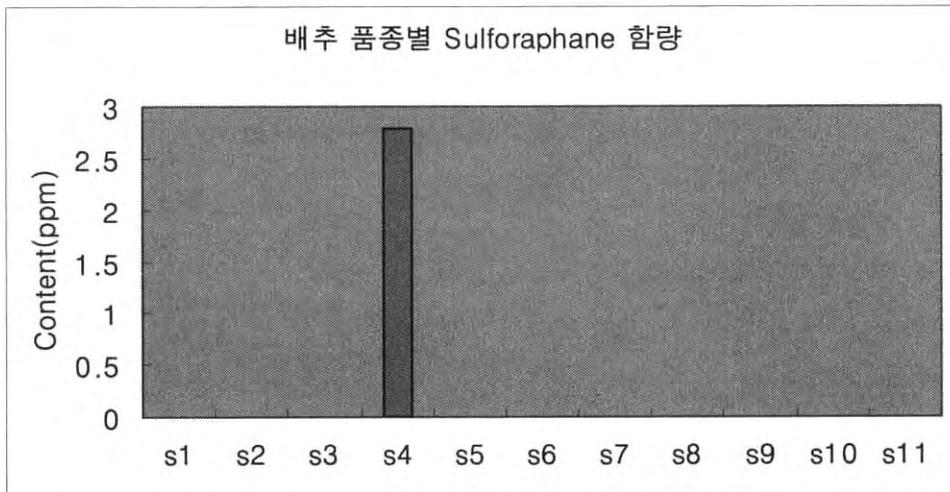
(가) Sulforaphane 표준품(순도 : 98.28%)을 100ml의 acetone에 녹여 100ppm의 stock solution을 조제하고 이를 희석하여 1.25, 2.5, 5, 10, 20ppm이 되도록 표준용액을 만든 후 각각 1 μ l를 GC/MS-SIM mode에 주입하여 얻어진 chromatogram 상의 peak area를 기준으로 검량선을 작성하였다.

(나) GC/MS-SIM mode의 최소검출량은 1.66ng이었다.

나. 브로콜리 잎으로부터 Sulforaphane의 생합성 연구결과

(1) 십자화과 작물의 잎으로부터 sulforaphane의 함량분석

(가) 브로콜리와 동일한 십자화과의 작물에서도 sulforaphane이 생합성 되는지를 확인하고자 십자화과 작물인 배추 11종과 무우 6종을 분양받아 위에서 기술한 방법에 의해 sulforaphane 함량을 분석하였다.



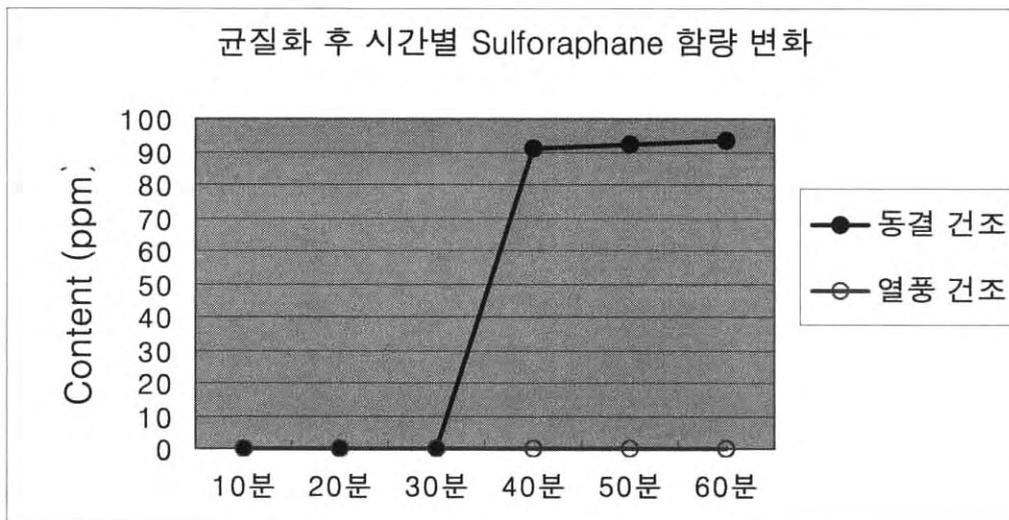
(나) 국내에서 재배되는 주요 십자화과 채소인 배추와 무우를 대상으로 sulforaphane 생합성 함량을 분석한 결과 대부분의 품종에서 검출되지 않았으나, 배추 품종 중에서는 s4와 무 품종 중에서는 s15 품종에서만 검출되었다.

(2) 브로콜리 잎을 균질화 후 방치시간에 의한 sulforaphane 생합성 함량분석

(가) Blender로 균질화한 후 상온에서 방치시간별 sulforaphane의 생합성량을 측정하여 최적생합성 시간을 분석하였다.

(나) Blender로 브로콜리의 잎을 균질화한 후에 sulforaphane의 생합성 함량은 30분 후에 급격히 증가하여 60분까지 함량이 유지되었다

(다) *de novo* 생합성된 sulforaphane 화합물은 동결건조 시에는 브로콜리 잎의 분말에 고정되지만, 열풍건조 시에는 휘산되어 분말에 고정되지 않았다.



(3) 브로콜리 품종별 sulforaphane 생합성 함량 분석

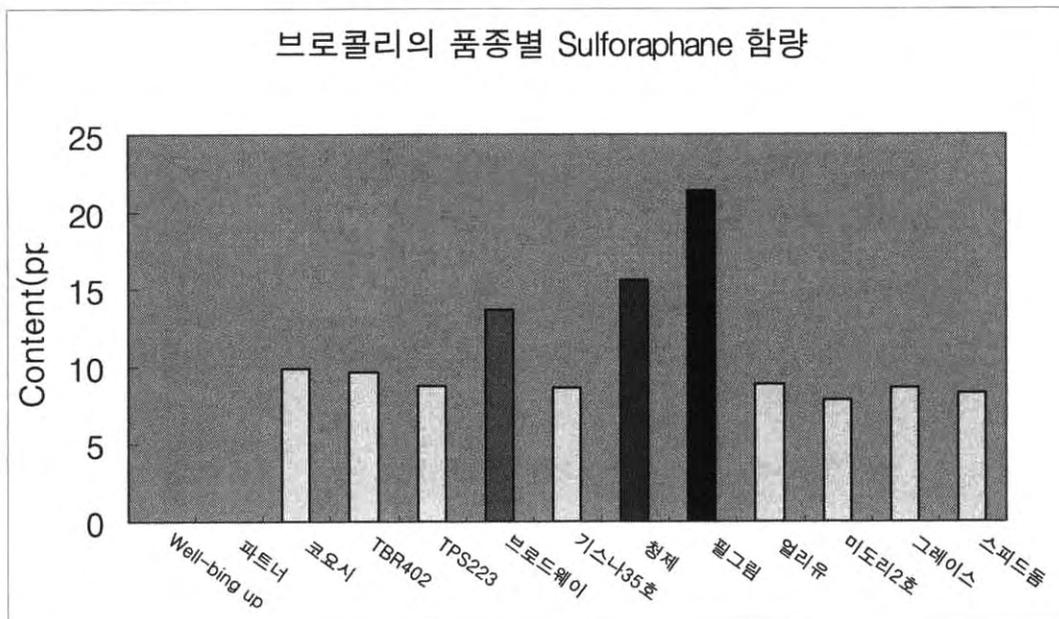
(가) 브로콜리 조생종 13종과 중만생종 6종을 분양받아 동일한 조건으로 가공하여 sulforaphane의 생합성 함량을 분석하였다.

(나) 브로콜리 품종별로는 조생종 일부에서 sulforaphane의 생합성이 확인되었으나, 중만생종에서는 전혀 나타나지 않았다. 이는 품종별에 따라서 sulforaphane 생합성능의 차이뿐만 아니라 재배되는 시기의 기온에 따라서도 sulforaphane의 생합성능이 다르다는 것을 알 수 있었다.

(다) 브로콜리 13종의 잎을 가공하여 sulforaphane의 생합성 함량을 분석한 결과 펄그림에서 가장 많이 검출되었고 다음으로 청제, 브로드웨이, 얼리유 순으로

많이 검출 되었다.

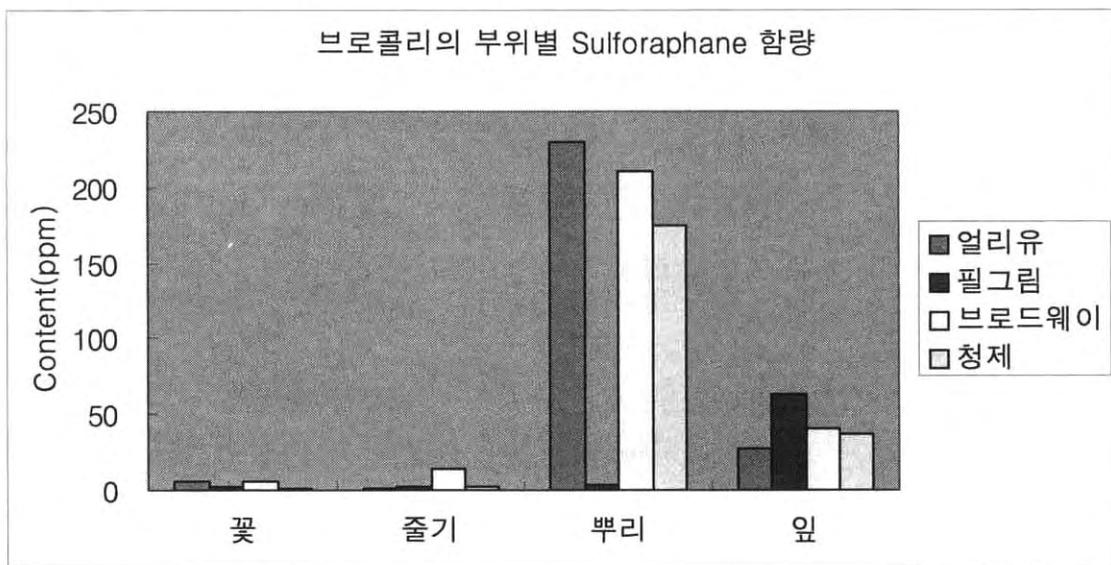
구분	품종	Content(ppm)
조생종	Well-bing up	N. D.
	파트너	N. D.
	코요시	19.9
	TBR 402호	19.3
	TPS 223	17.6
	브로드웨이	27.4
	기스나 35호	17.2
	청제	31.2
	필그림	42.8
	얼리유	17.6
	미도리 2호	15.7
	그레이스	17.2
	스피드 돔	16.7
중만생종	그린돔	N. D.
	만생그린돔	N. D.
	유메이 624	N. D.
	야요이 155호	N. D.
	노조미 424	N. D.
	식기미도리 에이스 268	N. D.



(4) 브로콜리 부위별 sulforaphane 생합성 함량 분석

(가) 다량으로 sulforaphane을 생합성하는 브로콜리 4종을 대상으로 꽃 봉우리, 잎, 줄기, 뿌리 부위로 구별하여 sulforaphane의 생합성 함량을 비교 분석하였다.

(나) 브로콜리의 부위별 sulforaphane의 생합성 함량을 분석한 결과 뿌리에서 가장 왕성히 생합성 된다는 사실을 밝혀졌다. 그 다음으로 잎에서 많이 생합성 되었으나, 뿌리에서 함량은 잎에서 생합성 되는 함량의 5배 이상이었다. 그러나 화퇴에서는 극소수량만이 검출되어 그간 보고된 결과와 다르게 나타났다. 이는 화퇴에는 endogenous sulforaphane 함량이 많지만 가공방법에 따라 함량변화가 다르게 나타난 것으로 판단된다.

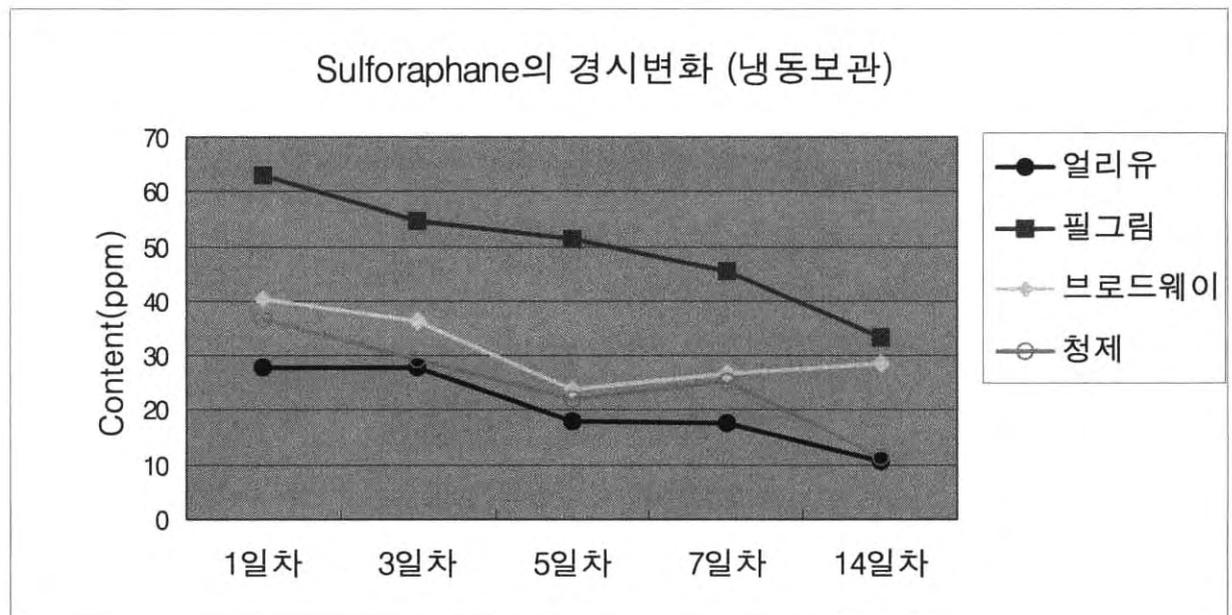
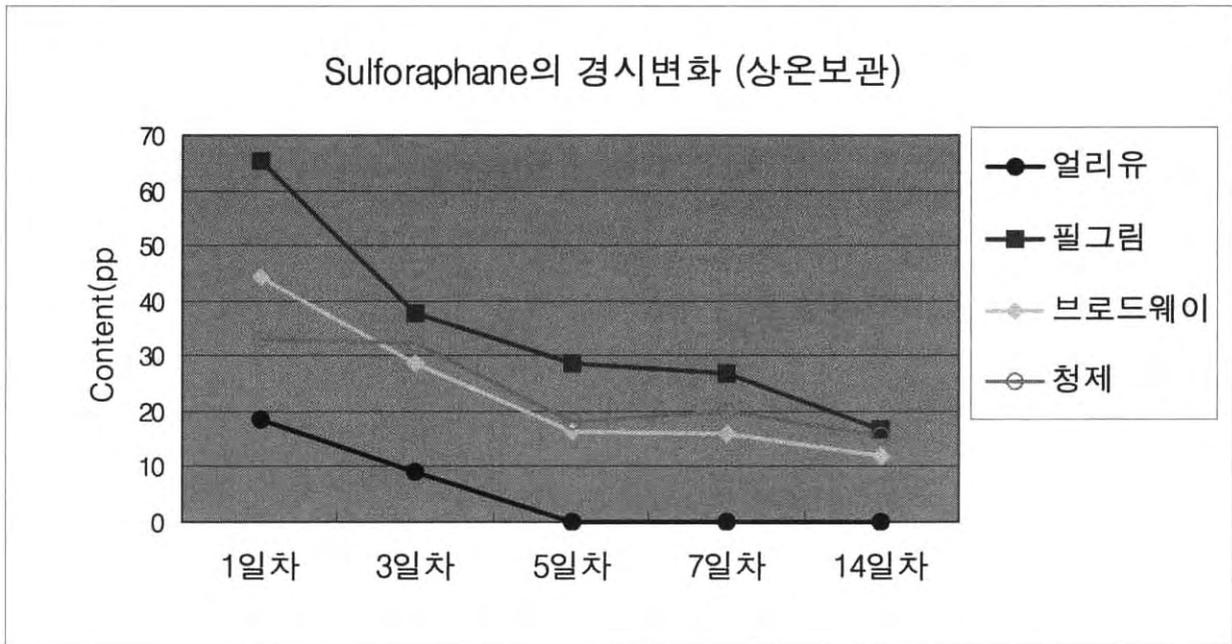


다. 생합성된 Sulforaphane의 지속성 연구결과

(1) *de novo* 생합성된 sulforaphane의 경시변화

(가) 생합성된 sulforaphane의 경시변화에 대해서 분석하였다.

(나) 브로콜리 잎을 가공하여 상온과 냉동보관 방법에 따른 sulforaphane의 함량 변화를 분석한 결과 대체적으로 함량이 시간경과에 따라 감소되었으면 냉동보관 방법이 상온보관 방법보다는 다소 완만하게 감소되었다.

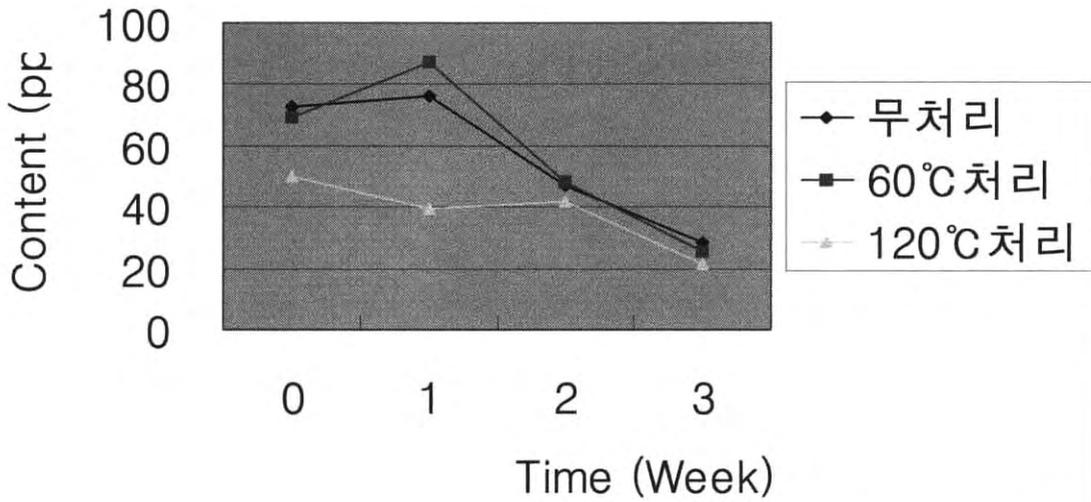


(2) 열처리 온도에 따른 sulforaphane의 함량 변화

(가) 생합성 된 sulforaphane의 경시적 함량감소를 억제하고자 60℃와 120℃로 1시간씩 처리하고 함량변화를 분석하였다.

(나) 시료를 60℃와 120℃ 온도 처리에 의한 sulforaphane의 degradation 혹은 conversion을 지연시키지는 못했다.

열처리 온도에 의한 Sulforaphane의 함량 변화

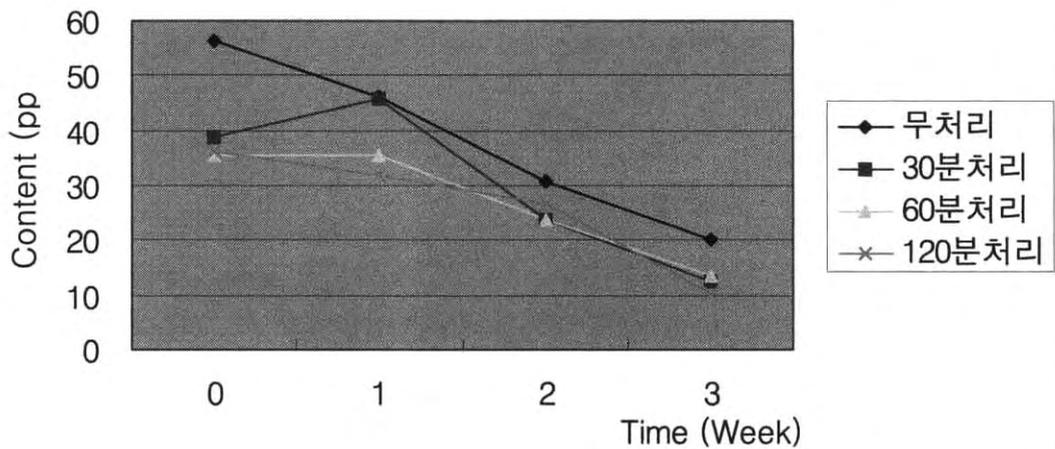


(3) 열처리 시간에 따른 sulforaphane의 함량 변화

(가) 60°C로 열처리 온도를 고정하고 처리시간을 달리하였을 경우 sulforaphane 함량의 경시변화를 분석하였다.

(나) 60°C로 30분, 60분, 120분 처리할 경우에도 뚜렷한 차이는 발견되지 않았다.

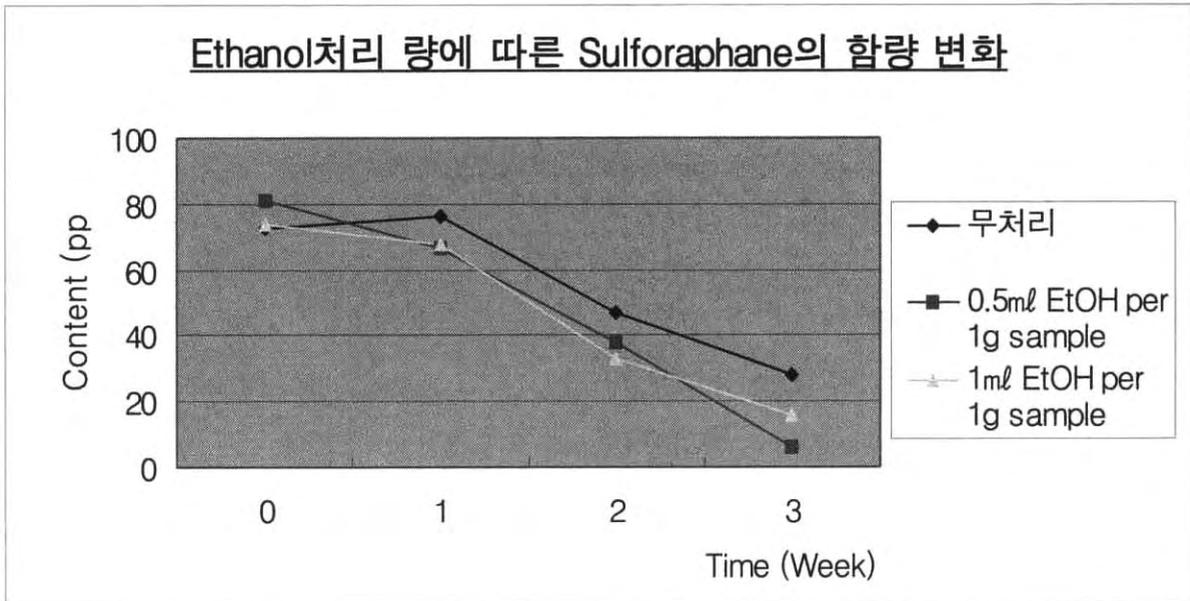
열처리 시간에 따른 Sulforaphane의 함량 변화



(4) Ethanol 처리에 의한 sulforaphane의 함량 변화

(가) 생합성 된 sulforaphane의 경시적 함량감소를 억제하고자 ethanol 처리량에 따른 sulforaphane 함량의 경시변화를 분석하였다.

(나) Ethanol 처리에 의해서도 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었다.

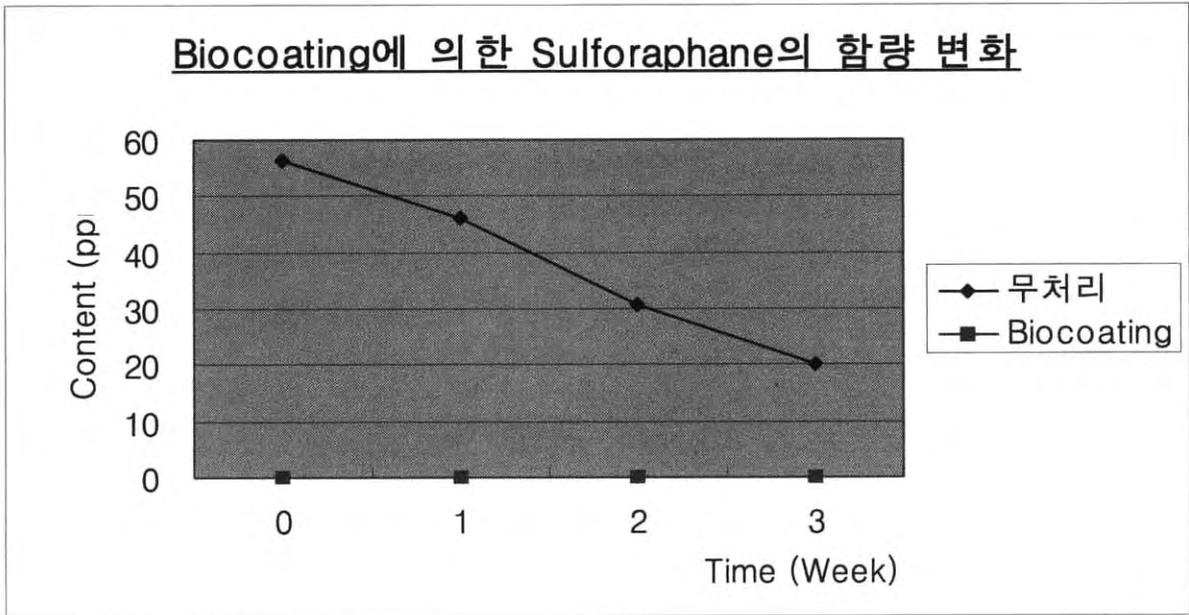


(5) Biocoating에 의한 sulforaphane의 함량 변화

(가) 식용수지를 이용하여 시료를 biocoating한 후 경시변화를 분석한 결과 전혀 검출되지 않았다. 이는 biocoating 과정에서 열에 의해 분해 또는 휘산 된 것으로 추정되었다



Biocoating에 의한 Sulforaphane의 함량 변화



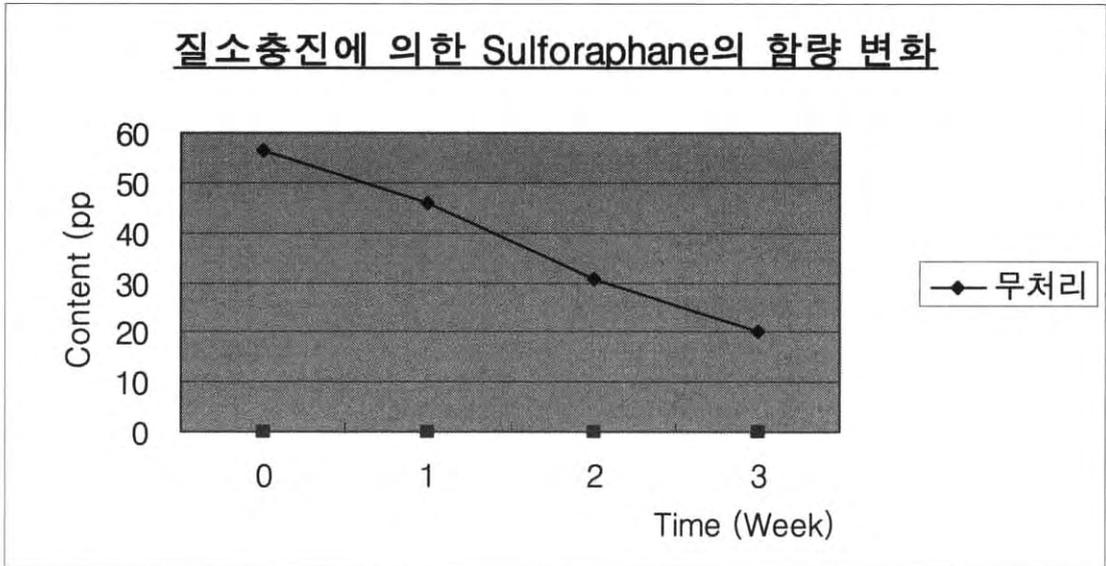
(6) 질소가스 충전에 의한 sulforaphane의 함량 변화

(가) 시료를 식용수지를 가하여 granule 상태로 만들어 알루미늄 봉투에 투입한 후 진공포장기 SW-600을 이용하여 챔버 내에서 진공 후 질소를 충전 접착하였다.



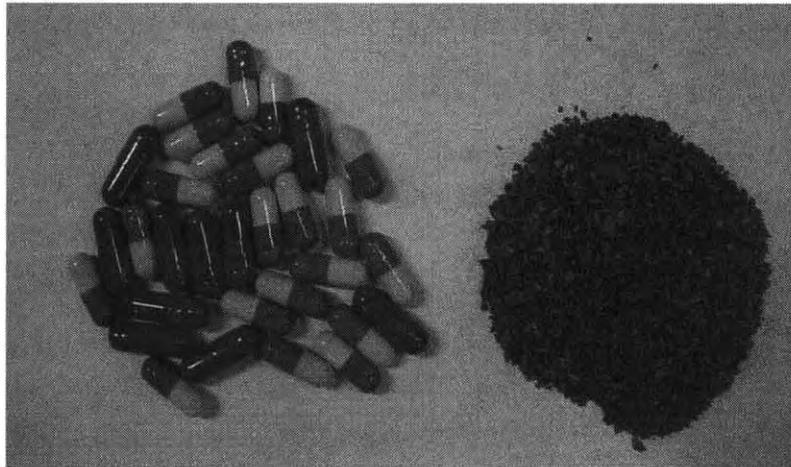
(나) 질소충진 후 sulforaphane의 경시변화를 분석한 결과 전혀 검출되지 않았다.

질소충진에 의한 sulforaphane의 conversion 혹은 degradation 등이 촉진되었을 가능성이 검토되었다.



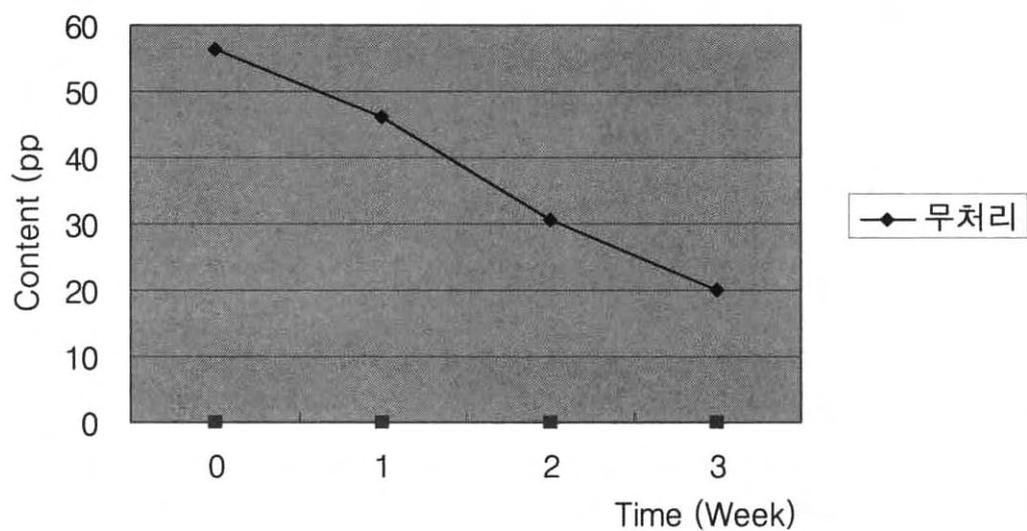
(7) Capsulation에 의한 sulforaphane의 함량 변화

(가) 하드캡셀자동충전기 (EXC-40F)을 이용하여 시료를 캡슐에 넣고 봉합처리 하였다.



(나) Capsulation 후 sulforaphane의 함량변화를 분석한 결과 캡슐화 이후 전혀 검출되지 않았다. 이는 캡슐화 과정에서 일어나는 열처리 공정에 의해 생합성된 sfloraphane이 휘산된 것으로 판단된다. 이 공정에 대한 추후 검토가 요구되었다.

Capsulation에 의한 Sulforaphane의 함량변화



(8) 활성물질 생성 가공공정 개발

(가) 브로콜리 잎을 대상으로 대량생산 가공공정을 개발하였다.



라. 생합성 된 Sulforaphane의 항균활성 검정

(1) 브로콜리 잎 추출물의 항균효과 및 MIC 측정

브로콜리 추출물로 *H. pylori*에 항균효과를 측정한 결과, Table 1과 같이 나타났다. 브로콜리 추출물의 각 농도별 inhibition zone은 12~10 mm로 처리농도에 비례하여 *H. pylori*에 대한 항균효과가 증가하였으며, 최소저해농도(MIC)는 100ug/mL로 측정되었다. 또한 대조구인 D,L-Sulforaphane과 Tetracycline은 낮은 농도에서도 우수한 항균활성을 나타냈다.

이 등(Lee et al., 2003)이 호장근 메탄올추출물 5~0.5mg/cylinder의 농도에서 11~17mm의 항균활성을 보고 하였다. 또한 최소저해농도는 Tabak 등(Tabak et al., 1996)은 thyme이 3,500 ug/mL 이 등(Lee et al., 1999)의 소엽이 190ug/mL, 소목이 350ug/mL 그리고 황련이 60ug/mL으로 보고와 비교 하였을 때 그 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

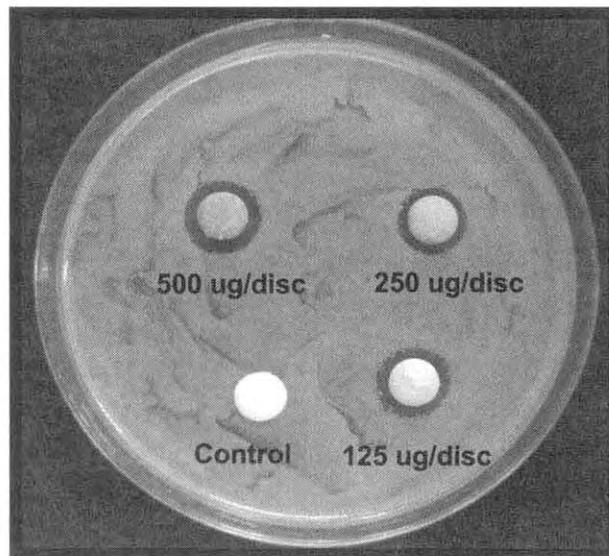


Fig. 1. Antibacterial activities of *Brassica oleracea var. italica* against *H. pylori*.

(2) Urease 분리 및 활성 억제 효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 특이한 점은 강력한 urease (urea aminohydrolase) 활성을 가지고 있는 것이다. *H. pylori*의 urease 생성능은 *Proteus* 균종의 생성능에 비해 100배 이상이며, 균체 단백질의 약 6%정도가 urease로 알려져 있다. 따라서 urease 활성을 억제하는 물질은 *H. pylori*의 감염 예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있을 것이다. 브로콜리 추출물로 urease 활성

을 억제할 측정하기 위해 *H. pylori*로부터 crude-urease를 얻은 다음, 분리된

Table 1. Growth inhibition of *H. pylori* by *Brassica oleracea* var. *Italica* and minimum inhibitory concentration (MIC)

Samples	Concentration	Inhibition Zone diameter (mm) ¹⁾	MIC (ug/mL)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i> (Broccoli)	500 ug/disc	12	100
	250 ug/disc	11	
	125 ug/disc	10	
D,L-Sulforaphane	50 ug/disc	16	10
	25 ug/disc	14	
	12.5 ug/disc	12	
Tetracycline	30 ug/disc	30	5
	15 ug/disc	20	
	7.5 ug/disc	12	

¹⁾Inhibition zones including the diameter of the paper disc (8 mm)

crude-urease 활성을 urea broth를 이용한 흡광도와 pH 변화를 측정하여 그 변화를 확인 하고자 하였다. 그 결과, pH변화는 초기 pH 7.0에서 반응 1시간 후 pH 7.8로 지속적인 증가를 보였고 흡광도는 1시간동안 0.5의 증가를 보였다. 이때의 단백질 함량은 Lowry(1951)방법으로 정량한 결과 3.1±0.12 mg/mL로 측정 되었다.

브로콜리 추출물의 urease 활성 저해능을 확인한 결과, 반응 1시간 후 40 ug/mL의 농도에서 50%를 80 ug/mL의 농도에서 65%를 저해하는 것으로 나타났다으며, 처리 농도가 증가 할수록 저해 효과 또한 증가하였다(Fig.1.). 또한 브로콜리 표준물질인 D,L-Sulforaphane을 농도별로 처리 했을 때 urease 활성을 억제 하는 것을 알 수 있었다(Fig.2.). 이는 이 등(Lee et al., 2003)이 호장근 메탄올추출물 2 mg/mL에서 85%, thyme 열수추출물이 3 mg/mL에서 45% 감소시킨다는 Tabak 등(1996)의 보고 보다 더 우수한 활성을 나타내고 있다.

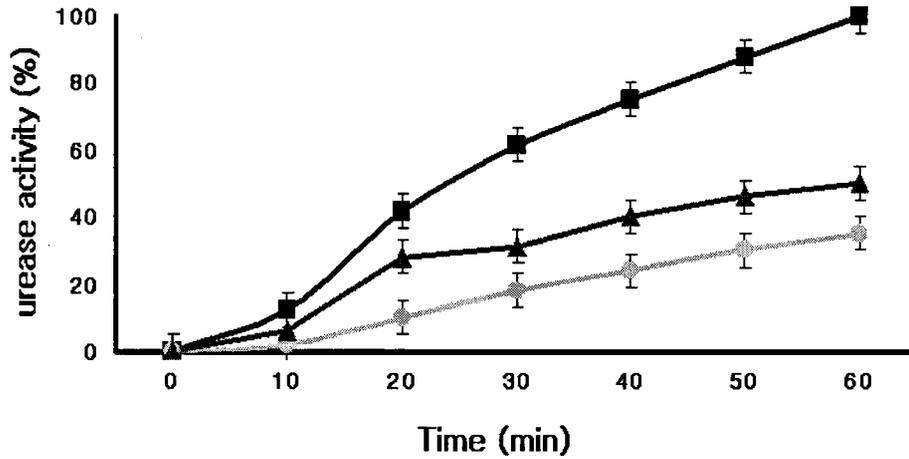


Fig. 1. Inhibition of *H.pylori* urease activity by *Brassica oleracea* var. *Italica* extract on the urea broth.

- : Control,
- ▲ : *Brassica oleracea* var. *Italica* extract 40 ug/mL,
- : *Brassica oleracea* var. *Italica* extract 80 ug/mL

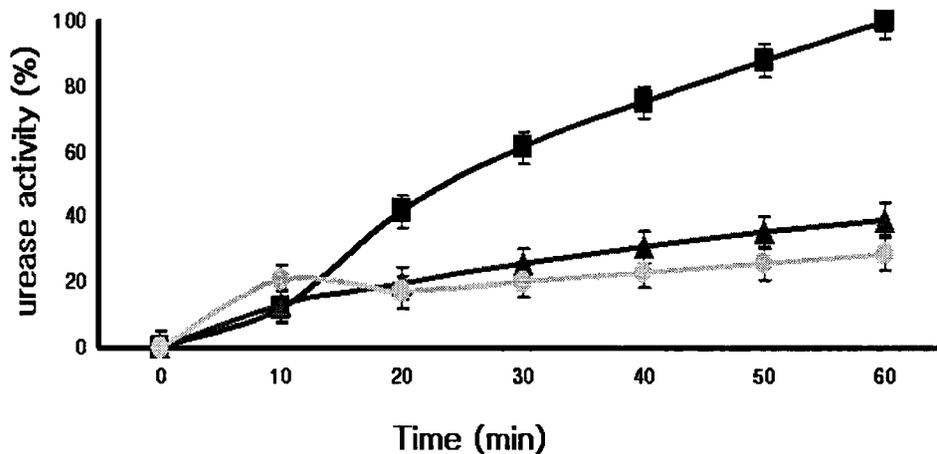


Fig. 2. Inhibition of *H.pylori* urease activity by D,L-Sulforaphane on the urea broth.

- : Control,
- ▲ : D,L-Sulforaphane 2 ug/mL,
- : D,L-Sulforaphane 4 ug/mL

(3) 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 조사

브로콜리 추출물 처리에 의한 *H. pylori*의 형태변화를 조사하기 위하여 브로콜리 추출물을 40 ug/mL 농도로 24시간 처리한 후 주사전자 현미경으로 관찰한 결과는 Fig.3.과 같다. 브로콜리를 처리하지 않은 균체는 표면이 깨끗하고 완전한 구형을 이루고 있는 반면, 브로콜리를 처리한 균체는 표층 구조가 심하게 허물고

떨어져 나간 것을 볼 수 있다. 이는 이 등(Lee et al., 2003)이 호장근 메탄을 추출물을 처리한 것과 유사한 결과를 보였다.

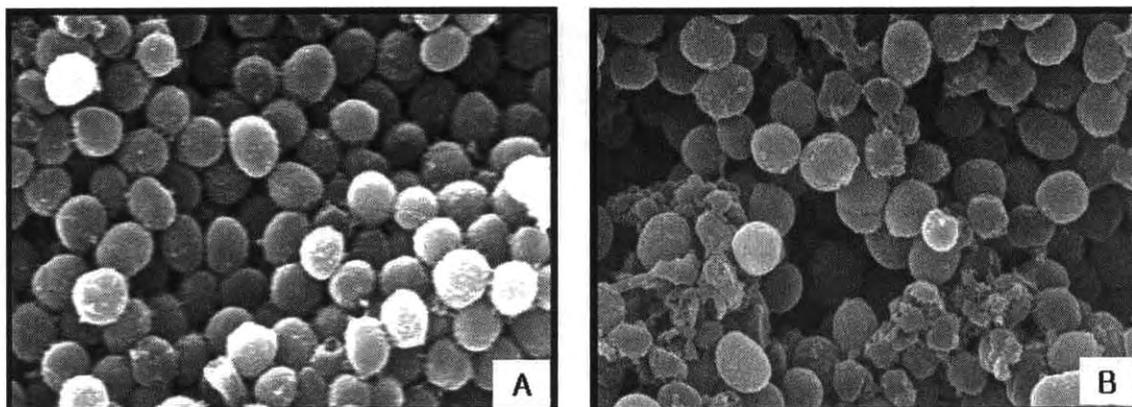


Fig. 3. Antimicrobial effect of *Brassica oleracea* var. *Italica* on *H. pylori* ($\times 15,000$)

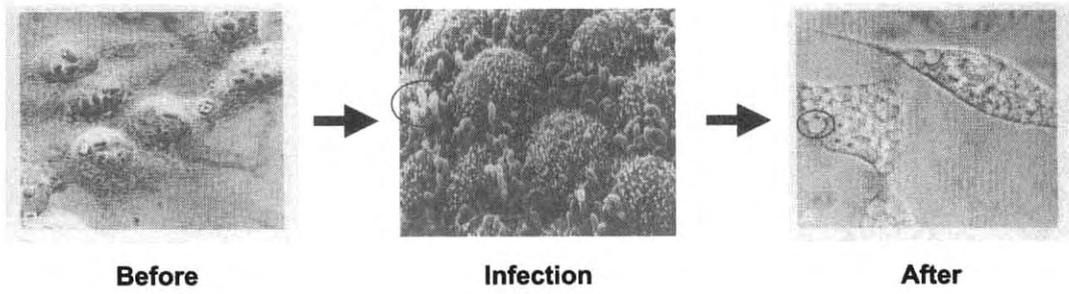
A: Control, B: treated with *Brassica oleracea* var. *Italica* 40 ug/mL.

(4) 외독소 단백질의 발현 변화 조사

현재까지 *H. pylori*가 위 점막에서 일으키는 병태 생리에 대하여 충분히 밝혀 지지는 않았지만, 몇 가지 요소가 병독성을 일으키는데 관여하는 것으로 생각되며 특히, 임상적으로는 위 상피에 독성을 나타내는 약 90 kDa의 VacA (vacuolating cytotoxin)와 120~140kDa의 CagA(cytotoxin associated with gene A) 두 인자가 주목 받고 있다(Chiara et al., 1995; Tummuru et al., 1993). VacA는 *H. pylori* 균주 중 50%에서 분비되며 배양세포 주에서 공포를 만드는 것이 확인되었고 이 공포가 위 상피에 손상을 일으킨다(Telford et al., 1994). CagA 유전자는 *H. pylori* 균주의 60%에서 나타나며, 대부분의 *H. pylori* cagA 유전자는 CagA 단백질을 만든다(Cover et al., 1995). 특히 위궤양이 있는 환자의 80%에서 *H. pylori*가 나타나므로 위·십이지장 질환에 중요한 요인으로 작용한다. 따라서 *H. pylori*가 생산하는 외독소인 VacA와 CagA의 단백질 발현 억제 정도를 측정하기 위해 western blot 방법을 사용하였다.

브로콜리 추출물을 10~50ug/mL의 농도로 처리한 결과 농도 의존적으로 VacA와 CagA의 발현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히, CagA의 경우 50ug/mL의 농도에서 거의 발현이 되지 않은 것으로 나타났다.

그러므로 브로콜리 추출물은 *H. pylori*가 생산하는 외독소인 VacA와 CagA의 발현에 우수한 억제 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.



2. Vac A (Vacuolation Toxin)

3. Cag A (Cytotoxin-associater gene A)

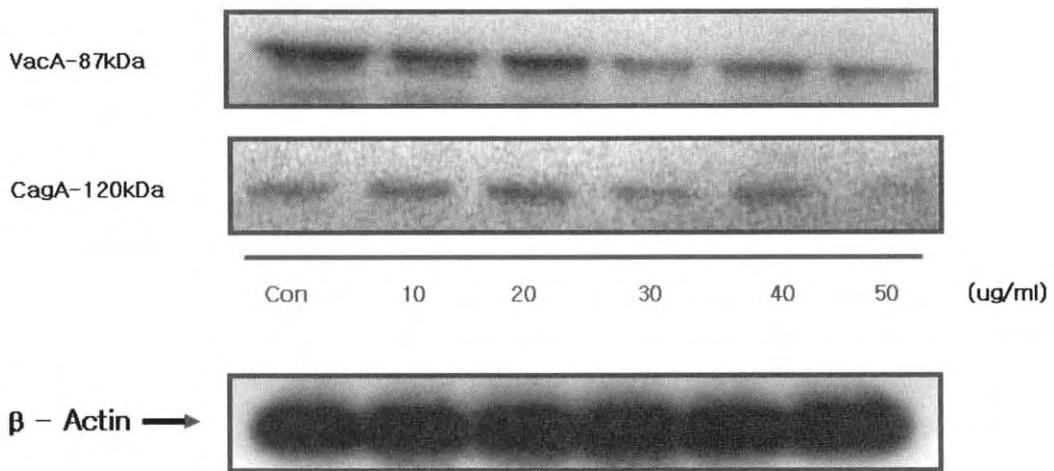


Fig. Effect of *Brassica oleracea* var. *Italica* extract on VacA(87kDa) and CagA(120kDa) expression in *H.pylori*.

VI. 연구개발 결과의 활용계획

1. 브로콜리가 가지고 있는 유용한 활성물질인 sulforaphane을 가열에 의한 섭취로 인하여 활용하지 못하고 있으나 부산물을 이용한 기능성 식품소재를 개발하면 활성물질을 효과적으로 유용할 수 있을 것으로 기대된다.
2. 부산물을 이용한 제품개발로 인하여 농가에 소득을 증진시킬 뿐만 아니라 소비를 촉진효과와 더불어 국민건강에도 기여할 것으로 기대된다.
3. 브로콜리의 부산물인 잎을 적절히 가공하면 위암을 유발하는 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori* 균은 강하게 제어할 수 있는 소재로 개발이 이루어질 것으로 기대된다. 또한 이들 소재들은 식품첨가물뿐만 아니라 기능성 건강식품으로 개발 가능할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Aspary, K. E. and Bjeldans, L. F.; Effects of dietary broccli and butylated hydrxyanisole on liver mediated metabolism of benzo[a]pyrene. *Food Chem, Toxicol.*, 21, 133 (1993)
2. Chiara, P.; Marchetti, M. and Blaser, M. J. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun.* 1995, 63, 4154-4160.
3. Cover, T. L.; Glupczynski, Y. and Lage, A. P. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *J. Clin Microbiol.* 1995, 33, 1496-1500.
4. Fahey, J. W.; Zhang, Y. and Talaly, P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 10367-10372
5. Jeffery, E. H. ;Brown, A.F. ;Kurilich, A.C. ;Keck, A.S. ;Matusheski, N. ; Klein, B.P.; Juvik, J. A. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16. 2003, 323-330
6. Ha, Y. D. Antitumoral and antimicrobial activities of solvent fractions from *Grifola umbellatus*. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 2001, 8, 481-487.
7. Tabak, M; Armom, R.; Potasmam, I. and Neemam I. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 80, 667-672.
8. Kim, M. R.; Lee, K. J; and Kim, H.-Y. Effect of Processing on the Content of Sulforaphane of Broccoli. *Korean J. Soc. Food Sci.* 1997, 422-426
9. Kim, M. R.; Lee, K. J. ; Kim, J. H. and Sok, D.-E. Determination of Sulforaphane in cruciferous vegetables by SIM. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1997, 882-887

10. Kudo T, and Saga N. Development of a simple method for antibiotic susceptibility testing in algae using paper disks. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1990, 56-455.
11. Lee, I. S.; Im, H. G. and Lee, S. O. Growth inhibition of *Helicobacter pylori* by *Reynoutria elliptica* Migo. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2003, 35, 1182-1187.
12. Lee, J. J.; Kim, S. H.; Chang, B. S.; J. B.; Huh, C. S.; Kim, T. J. and Beak, Y. J. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1999, 31, 764-770.
13. Lowery, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. and Randell, R. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193, 265-275.
14. Sok, D.-E.; Kim, J. H. and Kim, M. R. Isolation and Identification of Bioactive Organosulfur Phytochemicals from Solvent Extrsrct of Broccoli. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003, 315-319.
15. Telford, J. L.; Ghiara P. and Dell'Orco, M. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 1994, 179, 1653-1658.
16. Tummuru, M. K.; Cover T. L. and Blaser, M. J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.* 1993, 61, 1799-1809.
17. Zhang Y.; Talalay P.; Cho C. G.; Posner G. H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli; Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89; 2399-2403