



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

무로부터 내생효소에 의한
아이소티오시안네이트의 생성

濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科 食品工學專攻

姜 允 求

2014年 2月

무로부터 내생효소에 의한
아이소티오시안네이트의 생성

指導教授 任 尙 彬

姜 允 求

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 2月

강운구의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 河 璉 桓 印

委 員 金 賢 貞 印

委 員 任 尙 彬 印

濟州大學校 産業大學院

2014 年 2月

Production of Isothiocyanates by Endogenous Enzymolysis of Radish

Yun-Gu Kang
(Supervised by Professor Sang-Bin Lim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Engineering

2014. 02.

This thesis has been examined and approved.

Jin-Hwan Ha, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering
Hyun-Jung Kim, Prof of Food Science and Engineering
Sang-Bin Lim, Prof of Food Science and Engineering

February 2014

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	I
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 재료	3
2. 무의 가수분해 반응 실험방법	3
3. Sulforaphene과 erucin의 표준용액 제조	3
4. GC/MS에 의한 sulforaphene과 raphasatin의 분석	4
5. 통계 분석	4
III. 결과 및 고찰	5
1. Sulforaphene과 erucin 표준용액의 검량선	5
2. 가수분해 반응 조건에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 함량 변화	8
(1) 질소 충전	8
(2) NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화	12
1) 가수분해 반응 전 NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화	12
2) 가수분해 반응 후 NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과	

raphasatin의 생성량 변화	14
(3) 반응 시간에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화	16
(4) 교반 형태에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화	18
(5) 가수량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화	20
국문 요약	22
참고문헌	23

ABSTRACT

Endogenous enzymolysis of radish-sourced glucosinolates was optimized in terms of (1) the reaction medium in the environment of nitrogen, (2) the reaction time, (3) the mixing type, and (4) the ratio of the sample to distilled water. The concentrations of sulforaphene and raphasatin after the hydrolysis reaction with nitrogen filled in the reaction medium were about 1.6- and 2-fold higher than those without nitrogen filled, respectively. The concentration of sulforaphene without the addition of NaCl after the hydrolysis reaction was 77.0 ppm and those with 5~30% NaCl was almost the same as 63.0 ppm. The concentration of raphasatin without the addition of NaCl was 422.1 ppm and it was rapidly decreased with the increase of NaCl added. and that with 30% NaCl was 83.5 ppm. The concentration of sulforaphene was increased from 5 min to 15 min of the reaction time and it was decreased gradually thereafter. The concentration of raphasatin was rapidly decreased with the increase of the reaction time and it was completely degraded after 30 min of the hydrolysis period. The concentrations of sulforaphene with different shaking methods such as standing, vortexing, and rotation during the hydrolysis reaction were 73.4, 39.9, and 34.2 ppm, respectively. On the other hand, the concentrations of raphasatin was 144.1, 113.0, and 71.3 ppm with vortexing, rotation, and standing. The concentration of sulforaphene was 64.0 and 54.0 ppm, whereas that of raphasatin was 116.0 and 145.9 ppm at the ratio of sample and distilled water of 0.5 g : 4 mL and 0.5 g : 8 mL, respectively. It was concluded that in order to increase the production of isothiocyanates, the hydrolysis reaction should be performed in the reaction medium being undisturbed with nitrogen filled within 5 min.

I. 서론

십자화과 채소인 무(*Raphanus sativus* L.)는 그 종류가 다양하여 구미에서는 등근 무(자주색, 분홍색, 빨강색, 검정색 등)가 주로 이용되고 있지만 아시아에서는 길고 흰 뿌리를 가진 무인 white radish(daikon)가 많이 식용되고 있다(1).

무는 국내에서 생산되는 채소류 중 배추와 더불어 총 생산량의 60% 이상을 차지하고 있는 매우 중요하고 친숙한 작물이며, 제주도에서 무의 재배면적과 생산량은 각각 2006년에 3,867 ha, 203,409톤, 2010년에 6,637 ha, 353,519톤, 2011년에 1,553 ha, 74,132톤이었다(2).

무는 그 자체로 식용하거나, 염장, 통조림, 단무지, 발효 및 건조식품 등 광범위한 용도로 동아시아에서 널리 이용되고 있다(3, 4). 무는 민간요법과 고전문헌에 의하면 내복근이라 하여 소화 촉진과 어패류 또는 면류의 중독해소에 효과가 있고, 그 종자를 내복자라 하여 기암, 혈담, 천식 및 늑간 신경통 등에 쓰인다고 한다(5). 무는 야채로서 뿐만 아니라 약리학적 성분을 가진 중요한 원천으로 고혈압과 같은 심혈관 장애, 간 기능 장애, 위장 장애, 비뇨기 장애 및 호흡기 장애에 이용되고 있다(6). 또한 최근에는 무 또는 무 추출물의 항산화(7, 8), 항돌연변이(1), 해독 효소의 유도(9)와 같은 항증식 효과 등(10~12)의 기능성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

Glucosinolates는 십자화과 채소에 다량 함유되어 있으며, 이러한 glucosinolates 중에서 glucoraphasatin과 glucoraphenin은 무에 다량 함유되어 있는데 이들은 무 자체에 함유되어 있는 myrosinase에 의하여 가수분해되어 생리활성이 높은 raphasatin과 sulforaphene을 생성하게 된다(13~15). Raphasatin(4-methylthio-3-trans-butenyl isothiocyanate; MIBITC)은 무의 매운 맛과 향기에의 주요 성분으로 알려져 있다.

한편 raphasatin와 구조가 비슷하지만 이중 결합을 가지고 있는 sulforaphene은 phase II enzyme을 유도하는 강력한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(16). Sulforaphene은 사람과 쥐의 erythroleukemic 세포, 사람의 T-림프 세포, 사람의 자궁 경부 암 세포와 H3-T1-1 세포의 증식을 억제하는 기능을 나타낸다(17, 18). Sulforaphene은 브로콜리에 다량 함유되어 있는 sulforaphane에 비하여

1.3-1.5배 높은 향돌연변이 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다(19). Sulforaphene과 raphasatin의 분리, 정제(20~22)에 대한 연구도 보고되어 있다.

국내에서의 무에 대한 연구로는 대부분이 품종별, 계절별로 재배된 무의 이화학적 특성과 깍두기나 동치미 등의 발효 적성에 관한 연구(23~27), 단무지의 품질특성에 관한 연구(28, 29), 무에서 추출한 myrosinase의 분자량과 효소적 특성에 관한 연구(30, 31), 향돌연변이, 항암효과에 대한 연구(32~34)가 있다. 무의 glucosinolates에 관한 연구로는 indole glucosinolates(35), isothiocyanates에 관한 연구로는 품종별 종자 발아 중 sulforaphene 함량 변화(36), 생육 및 저장 중 sulforaphene 함량 변화(37)가 있다.

무에 다량 함유되어 있는 glucosinolates는 생리활성이 낮지만, 효소에 의한 가수분해 산물인 isothiocyanates는 생리활성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 무에서 가수분해 반응을 일으켜 isothiocyanates 생성을 최대화할 필요가 있다. 지금까지 국내외적으로 브로콜리의 내생과 외생효소에 의한 가수분해 반응에 대한 연구는 보고된 바 있으나(38), 무의 내생 효소에 의한 가수분해 반응에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 무의 내생효소에 의한 가수분해 반응으로 무의 기능성 성분인 sulforaphene과 raphasatin을 생성 시 최적반응조건(질소충전 여부, 반응 시간, 교반형태, 가수량)을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

무는 제주특별자치도 서귀포시 성산읍 소재 무집하장에서 구입하여 사용하였다. 무를 세척하고 절단 후 $-70\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 급속 동결 후 동결건조기(PVTFD101A; Hucom Systems, Gwacheon, Korea)에서 72시간 동안 동결건조하였다. 동결건조 무를 가정용 믹서기(HR1396, Philips Co, Istanbul, Turkey)로 분쇄한 후 표준체(Chunggyesanggongsa, Seoul, Korea)를 사용하여 40 mesh를 통과하는 것만을 회수하여 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다.

2. 무의 가수분해 반응 실험방법

무 동결건조물 0.5 g에 3차 증류수를 8 mL 가한 후 25°C 에서 5분 동안 정치하였다. 여기에 NaCl을 2.4 g 가하여 가수분해 반응을 정지시킨 후 dichloromethane 8 mL을 첨가하여 가볍게 혼합하고 원심분리(4°C , $7,000\times\text{g}$, 5분)(KR/HA-50, Hanil industrial Co., KyungBuk, Korea)하여 dichloromethane 층을 회수하였다. 잔사에 dichloromethane 8 mL을 2회 더 가하여 추출하였고, 추출물은 No. 5A 여과지로 여과한 후 rotary evaporator(CH/R-124, Buchi Co., Germany)로 상온에서 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 농축된 시료에 dichloromethane 2 mL을 가하여 용해시킨 후, $0.5\ \mu\text{m}$ syringe filter(PTFE, Dismic-13Jp, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)로 여과하고 내부표준물질로 BITC 용액(25 ppm)을 가하여 GC/MS 분석하였다(21, 38, 39).

가수분해 반응을 위한 변수로 질소 충전 여부, 효소 불활성화를 위한 NaCl 첨가량(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30%), 반응 시간(5, 10, 15, 20, 30, 50분), 교반 형태(정치, vortexing, rotation)(SLRM-2M, intelli-mixer, Seolin Bioscience Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea), 가수량을 달리하여 sulforaphene과 raphasatin의 생성량을 측정하였다.

3. Sulforaphene과 erucin의 표준용액 제조

Sulforaphene 표준용액은 sulforaphene(Santa Cruz Biotechnology, Inc.,

Dallas, Texas, USA)을 dichloromethane(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 용해하여 최종 농도가 40, 50, 60, 70, 80 ppm되게 제조하였으며, raphasatin 표준용액은 raphasatin 시약이 시판되지 않으므로 raphasatin과 구조가 비슷한 erucin(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)을 사용하여 최종 농도가 150, 175, 200, 225, 250 ppm되게 제조하여 사용하였다. 내부 표준물질로는 benzyl isothiocyanate(BITC)(Sigma-Aldrich Co.)를 25 ppm되게 제조하여 사용하였다 (39, 40).

4. GC/MS에 의한 sulforaphene과 raphasatin의 분석

GC/MS는 Agilent 6890 GC/ 5973 MSD(Agilent Technologies, California, USA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 HP-5MS capillary column(30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)이었고, injector와 detector의 온도는 각각 200°C와 280°C이었다. Oven 온도는 40°C에서 2분간 유지한 후 분당 10°C로 260°C 까지 승온시켜 10분간 유지하였으며, Injection volume은 1 µL이었다(40).

Sulforaphene의 농도는 BITC와 sulforaphene의 peak area의 비율로부터 계산하였으며, raphasatin의 농도는 BITC와 erucin의 peak area의 비율로부터 계산하였다.

5. 통계 분석

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan의 다중범위검정으로 최소유의차 검정(5% 유의수준)을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Sulforaphene과 erucin 표준용액의 검량선

Sulforaphene, erucin, BITC의 혼합용액을 GC/MS로 분석한 크로마토그램은 Fig. 1과 같았다. Retention Time은 BITC가 14.181, erucin이 15.086, sulforaphene이 18.709이었으며, mass 값은 BITC가 65, 89, 91, 149, erucin이 61, 72, 85, 115, sulforaphene이 72, 103, 112, 159이었다.

무 중의 sulforaphene과 raphasatin의 함량을 측정하기 위해 sulforaphene 표준용액의 농도는 40, 50, 60, 70, 80 ppm, erucin 표준용액의 농도는 150, 175, 200, 225, 250 ppm 되게 제조하였으며, 각각의 용액에 내부 표준물질로 BITC를 25 ppm 되게 첨가하여 GC/MS 분석한 후 sulforaphene과 erucin의 농도에 따른 BITC와 sulforaphene 및 erucin의 피크면적의 비율로 나타낸 검량선은 Fig. 2와 같았다. 검량선 식은 sulforaphene이 $y = 0.0133x - 0.1814$ ($R^2 = 0.9876$)이었고, erucin은 $y = 0.0152x + 1.2544$ ($R^2 = 0.9705$)이었는데, 여기서 x는 sulforaphene 또는 erucin의 농도이었고 y는 각각 sulforaphene과 BITC의 피크면적 비율과 erucin과 BITC의 피크면적 비율이었다.

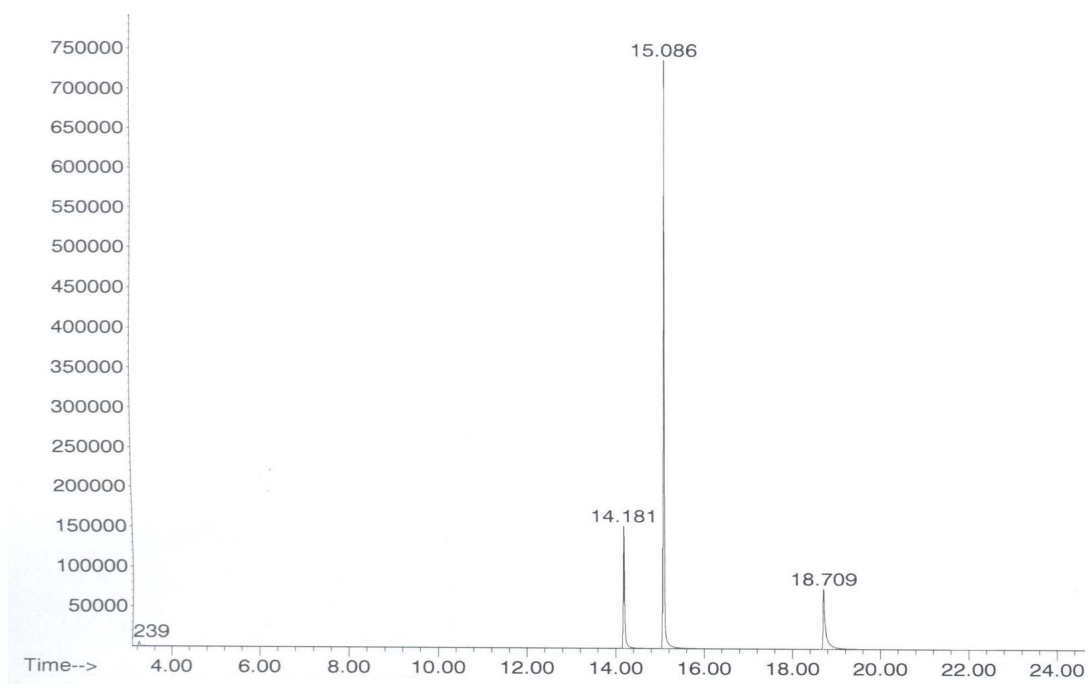
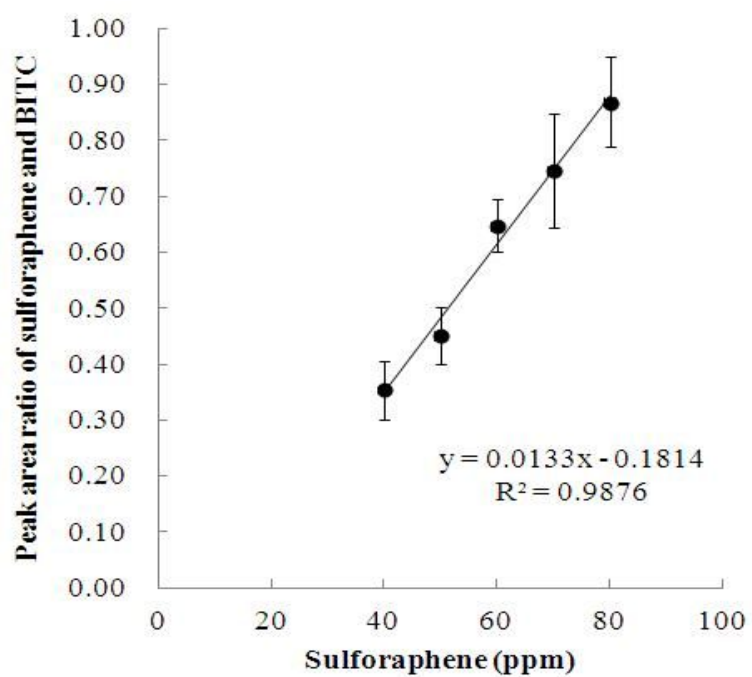


Fig. 1. GC/MS chromatogram of standard solution (RT 14.181: BITC, RT 15.086: erucin, RT 18.709: sulforaphene).

(A)



(B)

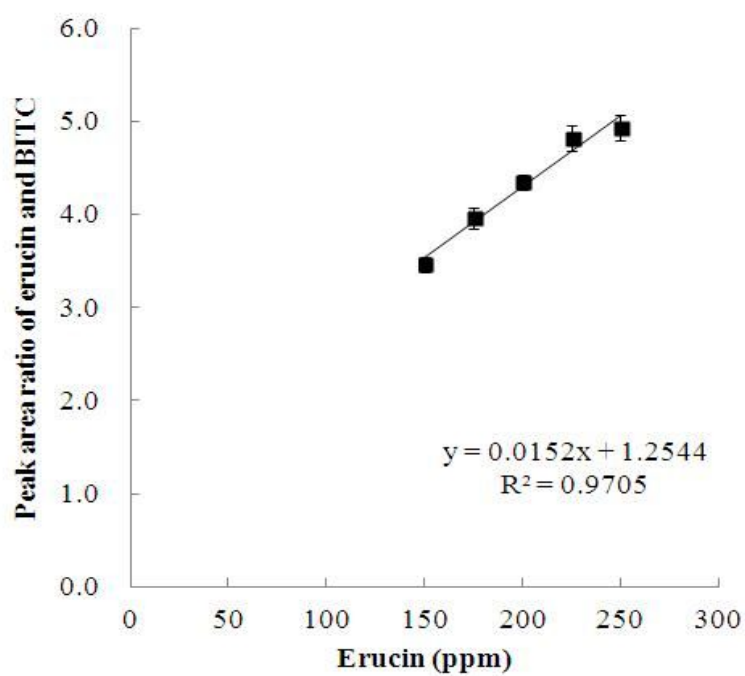


Fig. 2. Calibration curves of sulforaphene (A) and erucin (B) standard solutions.

2. 가수분해 반응 조건에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 함량 변화

(1) 질소 충전

무에 다량 함유되어 있는 glucoraphasatin과 glucoraphenin은 무 자체에 함유되어 있는 myrosinase에 의하여 가수분해되어 생리활성이 높은 sulforaphene과 raphasatin을 생성하게 되는데, sulforaphene은 비교적 안정한 물질이지만 raphasatin은 매우 불안정한 물질로 생성된 후 공기 중의 산소에 의하여 파괴되어 기능성이 낮은 다른 물질로 변하는 특성을 가지고 있다(22). 이를 방지하기 위하여 시료 용액 중의 용존산소를 질소로 대체하여 가수분해 반응을 실시하였다(Fig. 3). 즉, 무 동결건조물 0.5 g에 3차 증류수를 8 mL 가한 후 질소를 충전하여 25°C에서 5분 동안 암소에서 정치하였다. 여기에 NaCl을 2.4 g 가하여 가수분해 반응을 정지시킨 후 추출 분리하여 GC/MS 분석하였다.

질소를 충전한 시험군(Filled)은 질소를 충전하지 않은 시험군(Not filled)에 비하여 sulforaphene 함량은 약 1.6배, raphasatin 함량은 약 2.0배 높았다. 질소를 충전하지 않았을 때 낮게 나타난 이유는 동결건조 무 시료와 증류수의 가수분해 반응에 있어서 용존산소와 반응 용기의 head space의 산소에 의해 sulforaphene과 raphasatin이 변질되었을 것으로 추정되었다. Barillari 등(22)는 수용액 상에서 산소의 존재 하에 raphasatin의 전구물질인 glucoraphasatin이 sulforaphene의 전구물질인 glucoraphenin으로의 산화가 더 쉽게 발생한다고 보고하였다.

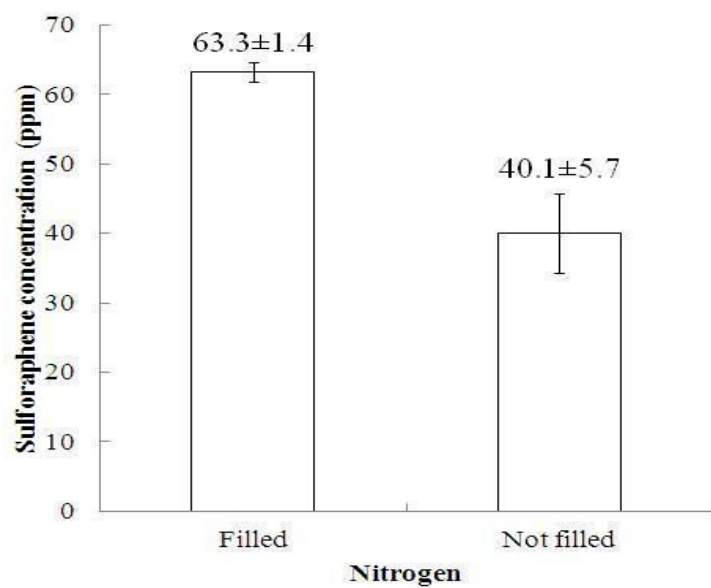
다시 말해서, glucoraphasatin이 수용액 상에서 산소에 의해 산화되어 glucoraphenin이 생성되며, myrosinase의 가수분해 작용에 의해 isothiocyanate인 sulforaphene이 생성되었다. 또한, 시료 자체에 함유되어 있는 glucoraphenin이 myrosinase에 의해 sulforaphene이 생성되었으며, 이렇게 생성된 sulforaphene은 가수분해 반응에서 빠르게 degradation product로 변화되었을 것으로 추정되었다(41).

Fig. 4는 질소를 충전함이 없이 동결건조 무 분말에 증류수를 8 mL 가한 후 25°C에서 반응 시간을 달리하여(2, 6, 10, 15, 20, 25분) vortexing에 의해 가수분

해 하고 소금 농도가 20% 되게 가하여 반응을 정지시킨 후 추출 분리하여 sulforaphene과 raphasatin의 함량을 GC/MS로 분석한 결과이다. 반응 시간 10분까지는 sulforaphene과 raphasatin이 증가하는 경향을 보였는데, sulforaphene 함량이 증가하는 이유는 산소의 영향으로 glucoraphasatin이 산화되어 glucoraphenin으로 전환되었으며, 이 glucoraphenin이 myrosinase에 의해 sulforaphene으로 전환되어 증가한 것으로 추정되며, raphasatin 함량이 증가하는 이유는 glucoraphasatin이 glucoraphenin으로 전환될 때 산소를 이용하는데 산소의 양이 반응 시간의 경과에 따라 줄어들면서 전환되는 glucoraphenin의 함량은 감소하고 상대적으로 glucoraphasatin의 함량이 증가되기 때문인 것으로 추정되었다. 반응 시간 10분 후에는 sulforaphene과 raphasatin 함량이 감소하였는데, 이는 반응 용기 head space 내의 산소가 완전히 소모되었기 때문에 더 이상 glucoraphasatin이 glucoraphenin으로의 전환이 이루어지지 않았고, myrosinase에 의해 sulforaphene과 raphasatin 만이 생성되었기 때문이라고 추정되었다.

Montaut 등(42)에 의하면, 대부분의 isothiocyanates는 수용액 상에서 상대적으로 안정하지만, raphasatin은 수용액과 메탄올 용액 상에서는 degradation product로 변하였고, raphasatin은 수용액 상에서 매우 불안정하였다고 보고하였다. 그러므로 질소를 충전하였을 때 glucoraphasatin이 glucoraphenin으로의 산화를 방지함으로써 시료 자체의 glucosinolate인 glucoraphenin과 glucoraphasatin으로부터 무 자체에 함유되어 있는 효소인 myrosinase의 가수분해 작용에 의해 각각 sulforaphene 과 raphasatin을 생성할 수 있을 것으로 추정되었다.

(A)



(B)

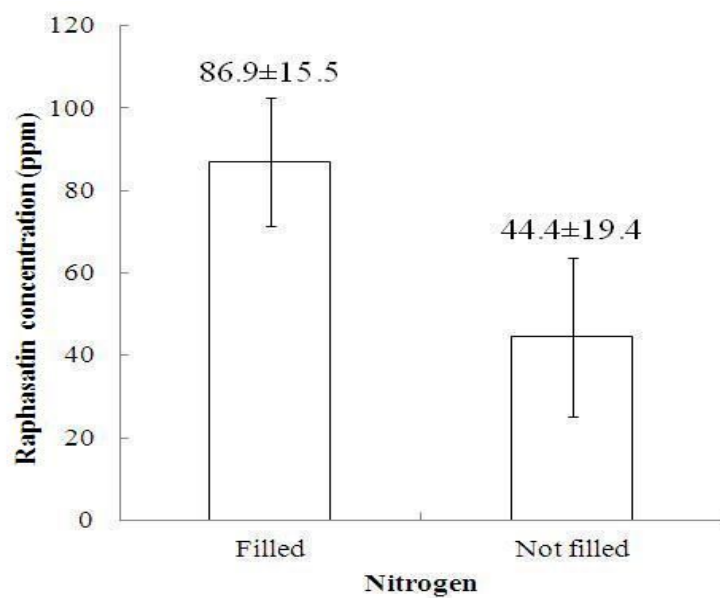
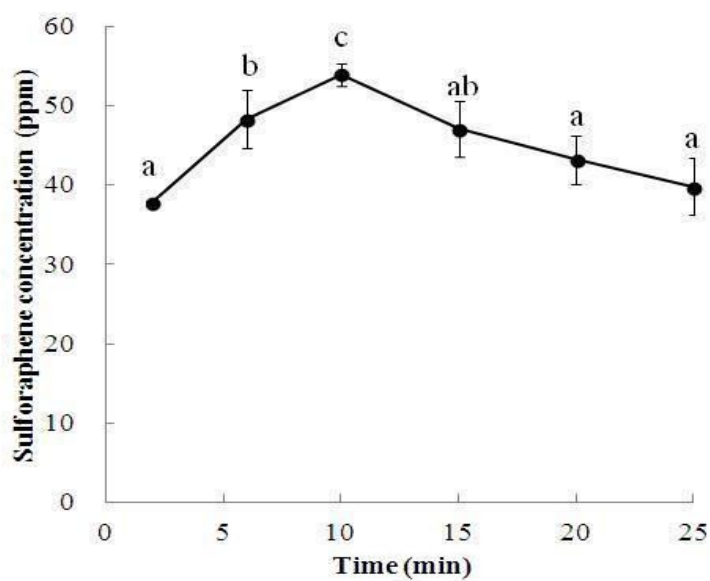


Fig. 3. Concentrations of sulforaphene (A) and raphasatin (B) after hydrolysis reaction with and without nitrogen filled (Hydrolysis was carried out at 25°C for 5 min and 20% NaCl solution was added for inactivating myrosinase after hydrolysis reaction).

(A)



(B)

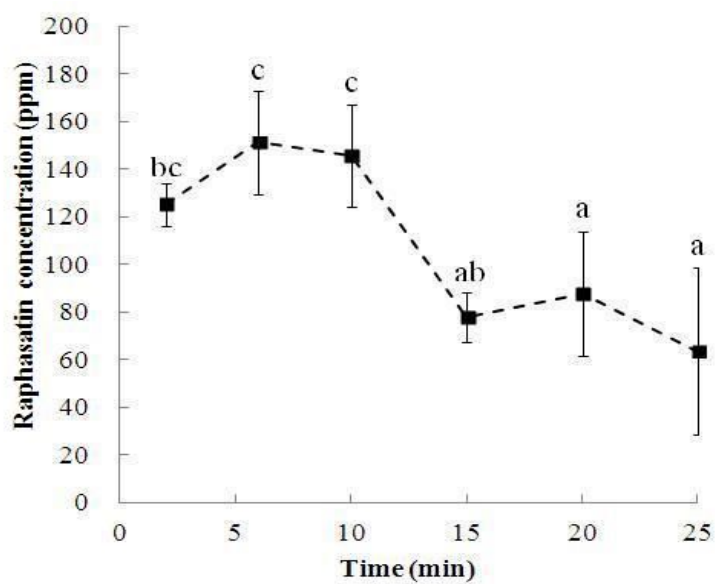


Fig. 4. Concentrations of sulforaphene (A) and raphasatin (B) after hydrolysis reaction (vortexing) without nitrogen filled (Hydrolysis was carried out at 25°C for 5 min and 20% NaCl solution was added for inactivating myrosinase after hydrolysis reaction).

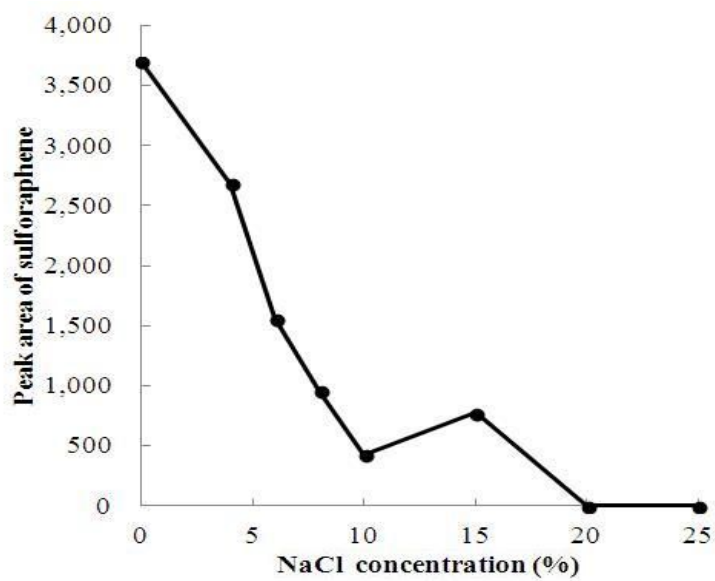
(2) NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

1) 가수분해 반응 전 NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

무의 내생효소인 myrosinase의 활성을 저해하여 가수분해 반응을 정지시키는데 필요한 NaCl의 첨가량을 결정하기 위하여, 동결건조 무 분말 0.5 g에 각각 5, 10, 15, 20, 25, 30%의 NaCl 용액을 8 mL 가하여 원심분리 한 후 sulforaphene과 raphasatin의 생성량을 측정하였다(Fig. 5).

첨가한 NaCl 용액의 농도 증가에 따라 sulforaphene과 raphasatin의 생성량은 감소하였다. NaCl을 첨가하지 않았을 때는 sulforaphene과 raphasatin의 peak area가 각각 3,698과 32,929였는데, 5~15%의 NaCl 농도에서는 점점 감소하였다. 이는 myrosinase가 NaCl에 의해 완전히 불활성화 되지 않아 효소의 가수분해 작용에 의해 sulforaphene과 raphasatin이 생성되는 것으로 나타났다. 그러나 20% 이상의 NaCl 농도에서는 sulforaphene은 생성되지 않았고, raphasatin은 소량 생성되어 무의 내생효소인 myrosinase가 불활성화 되었음을 알 수 있었다. Masaru 등(43)과 Li 등(44)은 NaCl의 농도가 증가할수록 myrosinase가 불활성화 되었으며, Zhao와 Yang(45)도 0.5% NaCl 용액에서 myrosinase의 활성이 억제되었으며, 4% NaCl 용액에서는 완전히 실패되었다고 보고하였다. Prakash 등(46)은 NaCl에 의하여 효소의 활성이 저해되는 이유로 myrosinase의 활성 부위(active site)에 알칼리토 금속(alkaline earth metal) 이온인 NaCl의 나트륨 이온이 결합되어 myrosinase의 활성을 억제된다고 보고하였다.

(A)



(B)

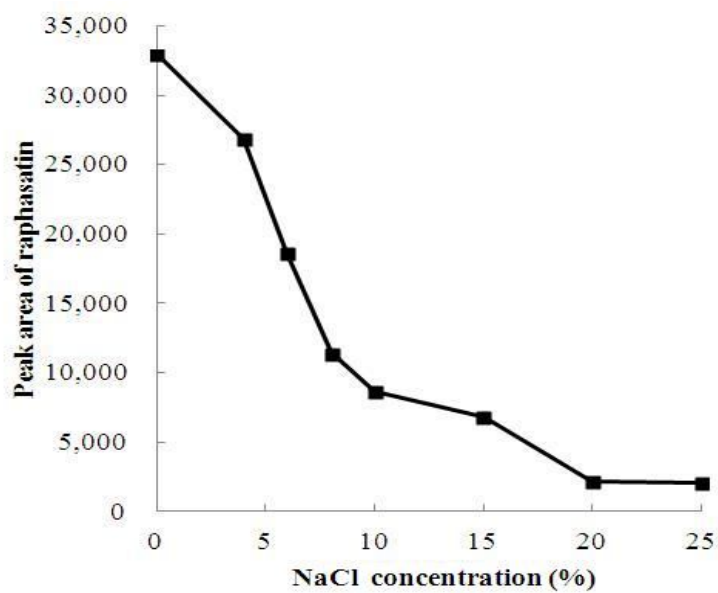


Fig. 5. Peak area of sulforaphene (A) and raphasatin (B) with the addition of different NaCl solutions before the hydrolysis reaction.

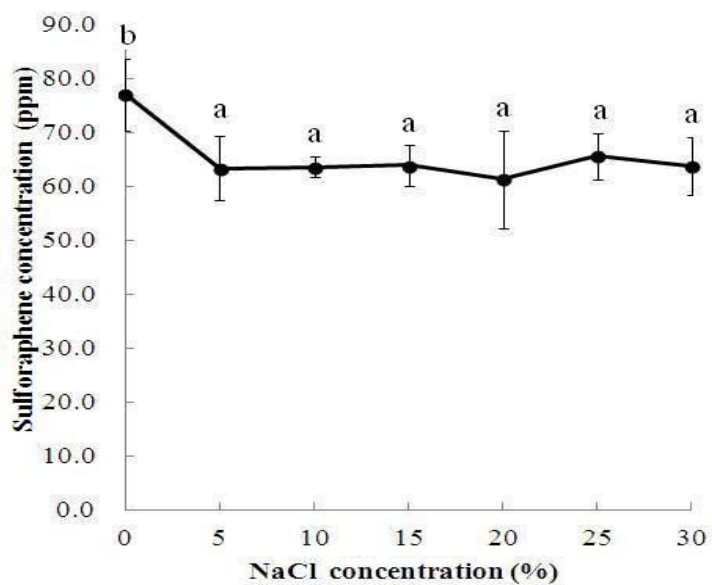
2) 가수분해 반응 후 NaCl 첨가량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

가수분해 반응 조건에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량을 측정하기 위해서는 시료 전처리 과정으로서 가수분해 반응 후 원심분리 공정을 거치게 된다. 만약 가수분해 반응 후 효소활성이 실활되지 않으면 원심분리 공정에서도 가수분해 반응이 일어나게 되므로, 가수분해 반응 조건에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량을 측정하기 위해서는 가수분해 반응 후 효소활성을 실활시킨 후 원심분리 공정을 실시하여야 한다.

가수분해 반응 후 효소활성이 실활시키는 데 필요한 NaCl의 농도를 알기 위하여, 동결건조 무 분말 0.5 g에 3차 증류수를 8 mL 가한 후 25°C에서 5분간 정치하여 가수분해 반응시키고 그 후 NaCl 농도가 5, 10, 15, 20, 25, 30%되게 소금 용액을 가하여 원심분리한 후 sulforaphene과 raphasatin의 생성량을 측정하였다 (Fig. 6).

Sulforaphene의 농도는 NaCl을 첨가하지 않았을 때에는 77.0 ppm이었으나, 5~30% NaCl을 첨가하였 때는 약 63 ppm으로 일정하여 NaCl 첨가 농도에 따른 변화가 없었다. 이러한 결과는 sulforaphene의 전구체인 glucoraphenin이 소량 존재하므로 myrosinase에 의해 가수분해가 완료되어 원심분리 시 더 이상 효소활성에 의한 영향이 없었기 때문인 것으로 추정되었다. 한편 raphasatin의 농도는 NaCl을 첨가하지 않았을 때는 422.1 ppm이었으나, NaCl 첨가량의 증가에 따라 급격히 감소하였으며, 30% NaCl을 첨가했을 때는 83.5 ppm로 NaCl을 첨가하지 않았을 때 보다 약 80% 감소하였다. 따라서 raphasatin은 첨가한 NaCl 농도 증가에 따라 myrosinase가 불활성화되어 glucoraphasatin에서 raphasatin으로의 전환이 이루어지지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 이유는 무 자체가 함유하고 있는 glucoraphasatin과 glucoraphenin의 함량이 다르기 때문이며, glucoraphenin의 함량이 glucoraphasatin에 비해 작기 때문인 것으로 추정된다. Barillari 등(22)에 의하면 새싹이 성숙되어 무가 됨에 따라 glucoraphenin은 29.8%에서 5%로 감소하였으며, glucoraphasatin은 60.5%에서 74.0%로 증가하였고 보고하였다.

(A)



(B)

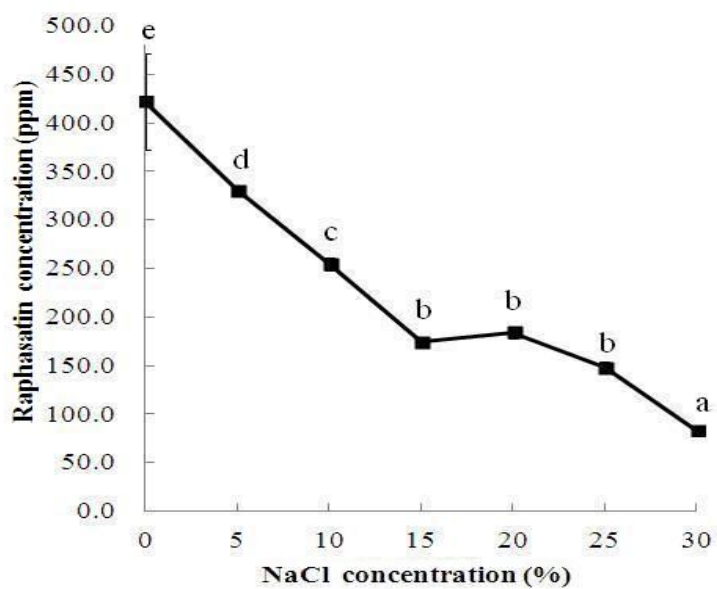


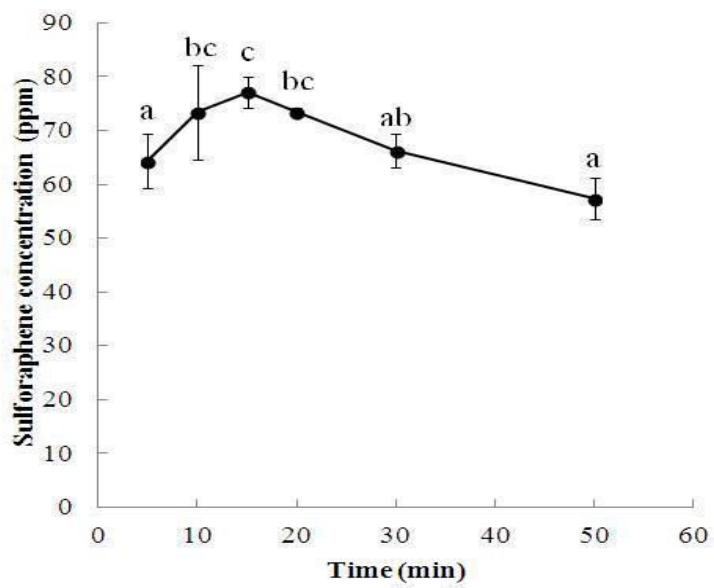
Fig. 6. Concentration of sulforaphene (A) and raphasatin (B) with the addition of different NaCl solutions after the hydrolysis reaction (Hydrolysis was carried out at 25°C for 5 min with nitrogen filled).

(3) 반응 시간에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

동결건조 무를 25℃에서 반응 시간(5, 10, 15, 20, 30, 50분)을 달리하여 정치 가수분해 반응 후 NaCl을 가하여 가수분해 반응을 정지시키고 dichloromethane을 가하여 3회 추출 후 GC/MS 분석하였다(Fig. 7). Sulforaphene은 5분에서 15분까지 반응 시간의 증가에 따라 증가하다가 15분 이후부터 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 myrosinase에 의해 생성되는 sulforaphene이 반응 시간 5분 내에 이미 생성이 완료되었기 때문인 것으로 추정되었다. Kim과 Rhee(47)에 의하면 무의 조직을 파괴시켰을 때 효소에 의해서 glucoraphasatin로부터 raphasatin의 생성이 단시간 내에 거의 완전히 이루어진다고 보고하였는데, 본 연구결과와 유사하였다. Montaut 등(42)은 모든 glucosinolates는 외부에서 myrosinase의 첨가 없이 수용액 상에서 37℃에서 5분 내에 완전히 가수분해 되었으며, 가수분해 후 ITCs는 protein thiol functions에 대한 강한 친화력 때문에 free form으로 대부분 존재하고 일부는 conjugate form으로 존재한다고 보고하였다.

Sulforaphene은 raphasatin에 비해 반응 시간의 증가에 따라 감소되는 속도가 완만한 것으로 나타났는데, 이는 sulforaphene이 수용액 상에서 raphasatin에 비하여 더 안정하다는 Matsuoka 등(48)의 결과와 유사하였다. 한편 raphasatin은 반응 시간이 경과할수록 급격히 감소하는 경향을 보였다. 반응시간 5분에 비하여 raphasatin의 농도가 50%가 되는 반응시간은 15분이었으며, 반응시간 30분 이상에서는 raphasatin이 완전히 분해되어 검출되지 않았으며, raphasatin의 생성 후 파괴 속도는 sulforaphene에 비하여 빠른 것으로 나타났는데, 이는 raphasatin이 수용액 상에서 매우 불안정하기 때문인 것으로 추정되었다.

(A)



(B)

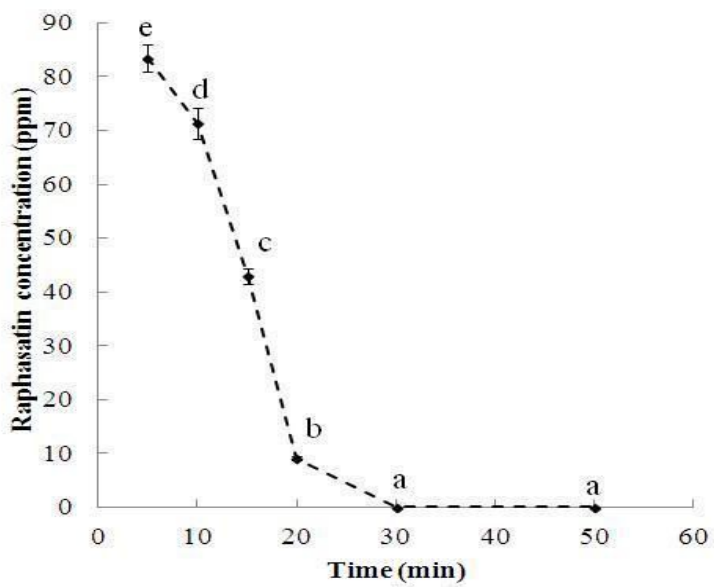


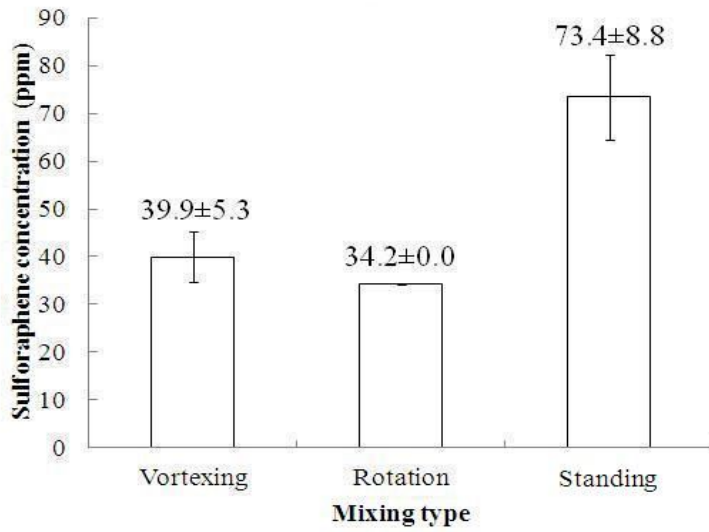
Fig. 7. Concentration of sulforaphene (A) and raphasatin (B) with different hydrolysis reaction periods (Hydrolysis was carried out at 25°C with nitrogen filled and myrosinase inhibition was carried out with 20% NaCl).

(4) 교반 형태에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

가수분해 반응 시 교반형태가 sulforaphene과 raphasatin의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 intelli mixer를 이용하여 반응 시간 10분에서 vortexing과 rotation하여 정치 반응 결과와 비교하였다(Fig. 8).

교반형태에 따른 sulforaphene의 생성량은 정치 반응은 73.4 ppm, vortexing 반응은 39.9 ppm, rotation 반응은 34.2 ppm으로 정치 반응에서 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 vortexing과 rotation 반응은 정치 반응에 비해 교반에 의한 물리적인 충격이 커서 생성된 sulforaphene이 다른 물질로 전환이 빨리 이루어졌을 것이라고 추정되었다. 한편 raphasatin은 vortexing 반응이 144.1 ppm으로 rotation 반응(113.0 ppm)과 정치 반응(71.3 ppm)에 비해 높은 함량을 나타내었는데, 이는 vortexing이 rotation과 정치 반응에 비해 혼합의 세기가 커서 무시료 자체에 많이 함유되어 있는 glucoraphasatin이 myrosinase의 active site와 접촉하는 기회가 상대적으로 많아져서 raphasatin의 생성이 많아졌을 것으로 추정되었다.

(A)



(B)

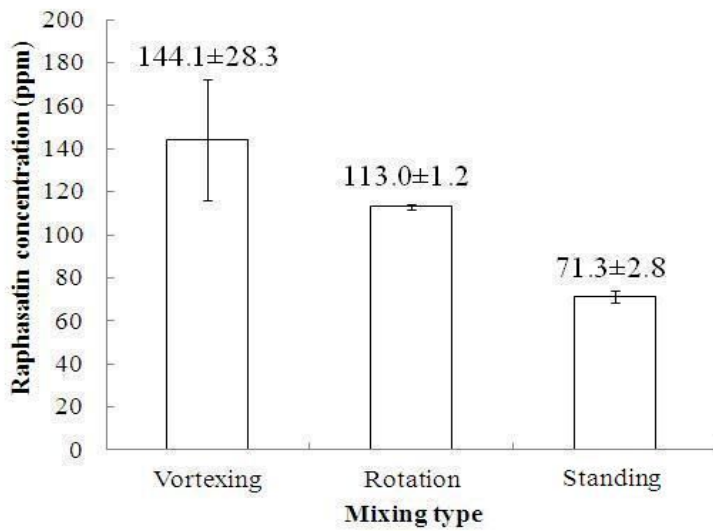


Fig. 8. Concentration of sulforaphene (A) and raphasatin (B) with different mixing types during the hydrolysis reaction (Hydrolysis was carried out at 25°C for 10 min and myrosinase inhibition was carried out with 20% NaCl).

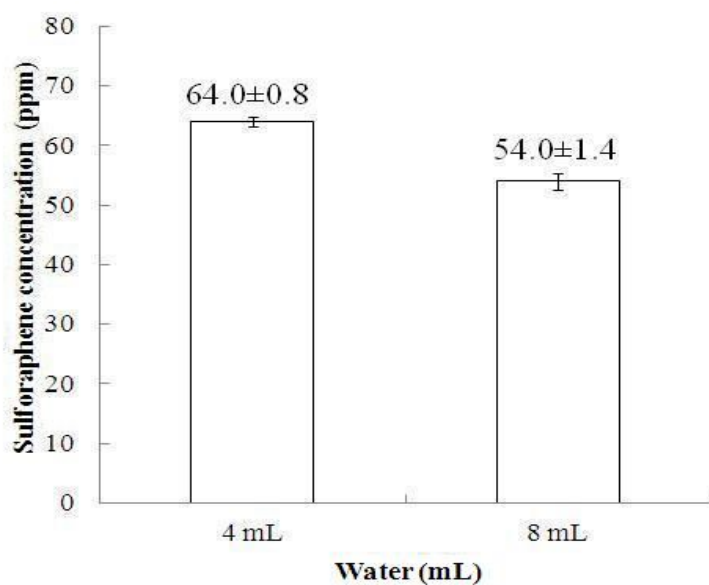
(5) 가수량에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화

동결건조 무 0.5 g에 가수량(4 mL, 8 mL)을 달리하여 vortexing mode에서 10분(25℃) 반응시킨 후 20% NaCl을 가하여 반응정지시키고 추출 분리하여 sulforaphene과 raphasatin 함량을 GC/MS 분석하였다(Fig. 8).

Sulforaphene은 가수량 4 mL에서 64.0 ppm로 8 mL에서 54.0 ppm 보다 1.2배 높았고, raphasatin은 가수량 4 mL에서 116.0 ppm로 8 mL에서 145.9 ppm 보다 1.3배 낮았다. 가수량 4 mL에서는 sulforaphene 농도가 높았고, 가수량 8 mL에서는 raphasatin 농도가 높았는데, 이러한 이유는 반응이 일어나는 용기 내에 질소를 충전하지 않아서 동결건조 무 시료와 증류수의 양이 차지하는 부피 이외에 반응 용기의 head space의 산소가 가수량 4 mL에서 8 mL에 비해 상대적으로 크기 때문에, 이러한 산소에 의해 glucoraphasatin이 glucoraphenin으로 전환되어서 이 glucoraphenin으로부터 생성되는 sulforaphene의 함량이 높아져 농도가 높아진 것으로 추정되었다. 한편 raphasatin은 가수량 4 mL에서 낮게 나타났는데, 이는 glucoraphasatin이 glucoraphenin으로 전환되었기 때문에 glucoraphasatin의 함량이 가수량 8 mL일 때와 비교하여 작아졌기 때문인 것으로 추정되었다(22).

결론적으로, 무의 내생효소에 의한 가수분해 반응으로 무의 기능성 성분인 sulforaphene과 raphasatin 생성의 최적 조건은 sulforaphene과 raphasatin의 생성 후 파괴를 방지하기 위하여 반응용액에 질소를 충전하여야 하며, 교반 형태는 정치를 하는 것이 바람직하였으며, 반응시간은 5분이었다.

(A)



(B)

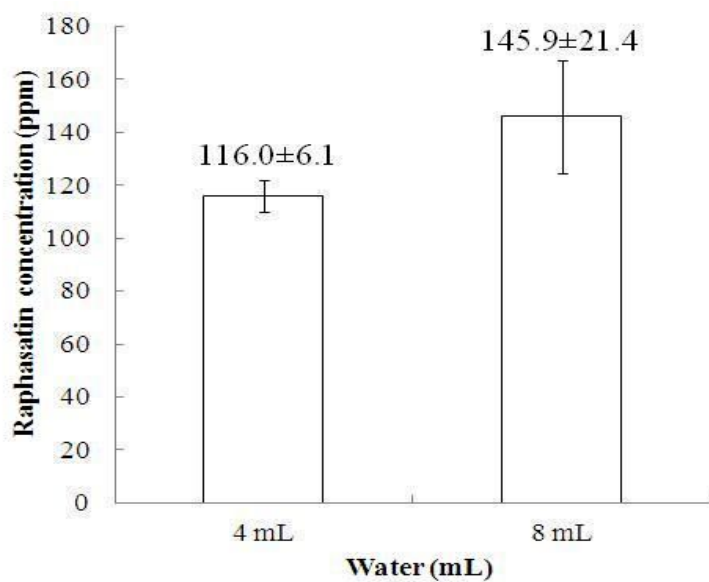


Fig. 9. Concentration of sulforaphene (A) and raphasatin (B) with different amount of water added (Hydrolysis was carried out at 25°C for 10 min without nitrogen filled, and myrosinase inhibition was carried out with 20% NaCl).

국문 요약

무의 내생효소인 myrosinase에 의한 가수분해 반응으로 무의 기능성 성분인 sulforaphene과 raphasatin을 생성 시 반응조건(질소충전 여부, 반응시간, 교반형태, 가수량)의 최적화 조건을 찾고자 하였다. 반응용액의 질소 충전에 따른 sulforaphene과 raphasatin의 생성량 변화는 질소를 충전한 시험군은 질소를 충전하지 않은 시험군에 비하여 sulforaphene 함량은 약 1.6배, raphasatin 함량은 약 2.0배 높았다. 가수분해 반응 후 NaCl 첨가에 따라 sulforaphene의 농도는 NaCl을 첨가하지 않았을 때에는 77.0 ppm이었으나, 5~30% NaCl을 첨가하였 때는 약 63 ppm으로 일정하여 NaCl 첨가 농도에 따른 변화가 없었다. Raphasatin의 농도는 NaCl을 첨가하지 않았을 때는 422.1 ppm이었으나 NaCl 첨가량의 증가에 따라 급격히 감소하였으며, 30% NaCl을 첨가했을 때는 83.5 ppm로 NaCl을 첨가하지 않았을 때 보다 약 80% 감소하였다. 반응 시간에 따른 변화로 sulforaphene은 5분에서 15분까지 반응 시간의 증가에 따라 증가하였다가 15분 이후부터 감소하는 경향을 나타내었다. Raphasatin은 반응 시간이 경과할수록 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 반응시간 30분 이상에서는 raphasatin이 검출되지 않았다. 교반형태에 따른 sulforaphene의 생성량은 정치 반응은 73.4 ppm, vortexing 반응은 39.9 ppm, rotation 반응은 34.2 ppm으로, 정치 반응에서 높은 함량을 나타내었다. Raphasatin은 vortexing 반응이 144.1 ppm으로 rotation 반응(113.0 ppm)과 정치 반응(71.3 ppm)에 비해 높은 함량을 나타내었다. 가수량에 따라 sulforaphene은 가수량 4 mL에서 64.0 ppm로 8 mL에서 54.0 ppm 보다 1.2배 높았고, raphasatin은 가수량 4 mL에서 116.0 ppm로 8 mL에서 145.9 ppm 보다 1.3배 낮았다. 결론적으로, 무의 내생효소에 의한 가수분해 반응으로 무의 기능성 성분인 sulforaphene과 raphasatin 생성의 최적 조건은 sulforaphene과 raphasatin의 생성 후 파괴를 방지하기 위하여 반응용액에 질소를 충전하여야 하며, 교반 형태는 정치를 하는 것이 바람직하였으며, 반응시간은 5분이었다.

참고문헌

1. Nakamura Y, Iwahashi T, Tanaka A, Koutani J, Matsuo T, Okamoto S, Sato K, Ohtsuki K. 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, a principal antimutagen in daikon (*Raphanus sativus* Japanese white radish). *J Agric Food Chem* 49: 5755-5760 (2001).
2. Jeju special self-governing province agricultural research and extension services, 2012 status, <http://www.jeju.go.kr/contents/index.php?mid=01090513> (2012).
3. Carlson DG, Daxenbichler ME, Van Etten CH, Hill CB, Williams PH. Glucosinolates in radish cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 110: 634-638 (1985).
4. Curtis S. The noble radish: past, present and future. *Trends Plant Sci* 8: 305 - 307 (2003).
5. Jung DH. In biological efficacy of food. Seonjin Munwhasa, Seoul, pp.72-74 (1998).
6. Blazevic I, Mastelic J. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem* 113: 96-102 (2009).
7. Lugasi A, Blazovics A, Hagymasi K, Kocsis I, Kery A. Antioxidant effect of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var niger) in alimentary hyperlipidaemia in rats. *Phytother Res* 19: 587 - 591 (2005).
8. Wang LS, Sun XD, Cao Y, Wang L, Li FJ, Wang. YF. Antioxidant and

prooxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus* var. *niger*, Brassicaceae). *Food Chem Toxicol* 48: 2712 - 2718 (2010).

9. Hanlon PR, Webber DM, Barnes DM. Aqueous extract from Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. Var. *niger*) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line. *J Agric Food Chem* 55: 6439 - 6446 (2007).

10. Papi A, Orlandi M, Bartolini G, Barillari J, Iori R, Paolini M, Ferroni F, Grazia Fumo M, Pedulli GF, Valgimigli L. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *J Agric Food Chem* 56: 875 - 883 (2008).

11. Yamasaki M, Omi Y, Fujii N, Ozaki A, Nakama A, Sakakibara Y, Suiko M, Nishiyama K. Mustard oil in “Shibori aikon” a variety of Japanese radish, selectively inhibits the proliferation of H-ras-transformed 3Y1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2217 - 2221 (2009).

12. Beevi SS, Mangamoori LN, Subathra M, Edula JR. Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. *Plant Foods Hum Nutr* 65: 200 - 209 (2010).

13. Friis P, Kjaer A. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate, the pungent principle of radish root. *ACTA Chemica Scandinavia* 20: 698 - 705 (1966).

14. Visentin M, Tava A, Lori R, Palmieri S. Isolation and identification of trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (*Raphanus sativus* L.). *J Agric Food Chem* 40: 1887 - 1891 (1992).

15. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768–780 (2003).
16. Posner GH, Cho CG, Green JV, Zhang YS, Talalay P. Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: Correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *Chin J Med Chem* 37: 170–176 (1994).
17. Nastrozzi C, Cortesi R, Esposito E, Menegatti E, Leoni O, Iori R. In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *J Agri Food Chem* 44: 1014–1021 (1996).
18. Nastrozzi C, Cortesi R, Esposito E, Menegatti E, Leoni O, Iori R. In vitro antiproliferative activity of isothiocyanates and nitriles generated by myrosinase-mediated hydrolysis of glucosinolates from seeds of cruciferous vegetables. *J Agri Food Chem* 48: 3572–3575 (2000).
19. Shishu, Kaur IP. Inhibition of cooked food-induced mutagenesis by dietary constituents: Comparison of two natural isothiocyanates. *Food Chem* 112: 977–981 (2009).
20. Iori R, Barillari J, Gallienne E, Bilardo C, Tatibouet A, Rollin P. Thiofunctionalised glucosinolates: unexpected transformation of desulfoglucoraphenin. *Tetrahedron Lett* 49: 292–295 (2008).
21. Vaughn SF, Berhow MA. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind Crops Prod* 21: 193–202 (2005).

22. Barillari J, Cervellati R, Paolini M, Tatibouet A, Rollin P, Iori R. Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (*Kaiware Daikon*) and its redox properties. *J Agric Food Chem* 53: 9890–9896 (2005).
23. Lee SE. Investigation of cooking usage according to the physicochemical and textural characteristics in *Nabakkimchi* with different radish cultivars. *Korean J Culinary Res* 12: 284–298 (2006).
24. Ryu KD, Chung DH, Kim JK. Comparison of radish cultivars for physicochemical properties and *Kadugi* preparation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 681–690 (2000).
25. Kim MR, Rhee HS. Changes in the factors associated with decrease of pungency in "*Kagdugi*" during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 24: 361–366 (1992).
26. Kim SY, Kim KO. Effect of sodium chloride concentrations and storage periods on characteristics of *Kakdugi*. *Korean J Food Sci Technol* 21: 370–374 (1989).
27. Choi SH, Ryu DK, Park SH, Ahn KG, Lim YP, Ahn GW. Composition analysis between kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) and Radish (*Raphanus sativus*). *Kor J Hort Sci Technol* 28: 469–475 (2010).
28. Sim JS, Choi WS. Effects of temperature and CaCl₂ on the quality properties of salted radish during desalting process. *Food Eng Prog* 16: 299–305 (2012).

29. Jung HA, Park CS, Park SH. Monitoring of quality characteristics of *Danmooji* product storage temperatures for storage temperature establishment. *Korean J Food Preserv* 19: 818-824 (2012).
30. Kim MR, Lee HS. Purification and characterization of radish myrosinase. *Korean J Food Sci Technol* 21: 136-144 (1989).
31. Sim KH, Kang KS, Seo KI. Purification enzymatic properties of myrosinase abstracted from radish. *J Korean Agri Chem Soc* 36: 86-92 (1993).
32. Hwang KM, Park KY. In vitro antimutagenic and anticancer effects of Kakdugi prepared with different kinds of radish and salt. *Cancer Prev Res* 11: 73-78 (2006).
33. Choi SJ, Choi AR, Cho EH, Kim SY, Lee GS, Lee SS, Chae HJ. The glucosinolate and sulforaphane contents of land race radish and wild race radish extracts and their inhibitory effects on cancer cell lines. *J East Asian Soc Dietary Life* 19: 558-563 (2009).
34. Jung MS, Lee GS, Chae HJ. In vitro biological activity assay of ethanol extract of radish. *Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 67-71 (2004).
35. Shim KW, Kang KS, Ahn CW, Seo KI. Quantitative analysis of glucosinolates and thermal degradation product of indole glucosinolates in radish. *J Korean Agric Chem Soc* 36: 23-28 (1993).
36. Lee JH, Lim SY, Kim H, Kim JK. Comparison sulforaphene content in

radish seeds during germination. *Kor J Hort Sci Technol* 27: 77 (2009).

37. Lim SY, Lee JH, Gu EH, Kim JK. Changes in sulforaphene content during growth and storage from *Baemoochae* (\times *Brassicoraphanus*) and radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor J Hort Sci Technol* 29: 77 (2011).

38. Shen L, Su G, Wang X, Du Q, Wang K. Endogenous and exogenous enzymolysis of vegetable-sourced glucosinolates and influencing factors. *Food Chem* 119: 987-994 (2010).

39. Hanlon PR, Robbins MG, Hammon LD, Barnes DM. Aqueous extract from the vegetative portion of Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzyme expression in HepG2 cells. *J Funct Foods* 1: 356-365 (2009).

40. Scholl C, Eshelman BD, Barnes DM, Hanlon PR. Raphasatin is a more potent inducer of the detoxification enzymes than its degradation products. *J Food Sci* 76: 504-511 (2011).

41. Song D, Liang H, Kuang P, Tang P, Hu G, Yuan Q. Instability and structural change of 4-methylsulfinyl-3-butenyl isothiocyanate in the hydrolytic process. *J Agric Food Chem* 61: 5097-5102 (2013).

42. Montaut S, Barillari J, Iori R, Rollin P. Glucoraphasatin: chemistry, occurrence, and biological properties. *Phytochem* 71: 6-12 (2010).

43. Masaru O, Isao T, Tadao H. Studies on fungous myrosinase Part II. effects of various reagents on its enzymatic activities. *Agr Biol Chem* 33: 1315-1319 (1969).

44. Li J, Wang QZ, Zhou Q, Sun Y, Xie BJ. Study on properties of myrosinase from Radish. *J Chin Inst Food Sci Technol* 29: 451-455 (2008).
45. Zhao D, Yang F. Study on the flavour of pickled *Brassica juncea* Coss. *Food Ferment Ind* 24: 34-41 (1998).
46. Prakash O, Singh J, Rai AK. Effect of TNBS and alkali metal salts on the activity of myrosinase from Cauliflower seedings (*Brassica oleracea*) Var *Botrytis*. *Environ Ecol* 30: 961-966 (2012).
47. Kim MR, Rhee HS. Quantitative determination of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate in Radish root by RP-HPLC. *Korean J Food Sci Technol* 18: 475-478 (1986).
48. Matsuoka H, Toda Y, Yanagi K, Takahashi A, Yoneyama K, Formation of thioxopyrrolidines and dithiocarbamates from 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanates, the pungent principle of radish, in aqueous media. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 2109-2112 (1997).

감사의 글

2011년 3월 어느 날 저는 늦은 나이에 설레임과 기대감으로 대학원 생활을 시작하게 되었고 3년이라는 시간이 지난 지금 감사의 글을 쓰고 있습니다.

부족한 저에게 본 논문의 처음 연구계획에서부터 완성에 이르기까지 학문적 기틀을 잡아주시고 친절하고 소상한 가르침을 베풀어 주셨던 지도 교수님이신 임상빈 교수님은 제 인생의 커다란 선물이었습니다. 열정적인 지도는 저를 많이도 겸손하게 해 주셨고 실험실에서의 넓고 깊은 학문적 통찰력은 저를 성장시키는 큰 힘이 되었습니다. 지도 교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다.

석사과정을 마칠 수 있게 많은 가르침과 격려를 주셨던 하진환 교수님, 고영환 교수님, 박은진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 논문심사에서 세세한 부분까지 관심어린 애정을 보여주신 김현정 교수님께도 감사를 드립니다.

논문이 완성되기까지 실험에 대해 많이 부족한 저를 이끌어 주고 정성껏 가르쳐 준 이충우 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

다. 그리고 실험실 막내 재원이에게도 너무나 많은 은혜를 입었고 대학원에서 항상 응원을 해준 박경렬 선생님께도 감사를 드립니다.

늘 사랑과 격려를 보내주신 오영주 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 부족한 저에게 대학원에 진학 하도록 힘과 용기를 주신 최영진 교수님과 항상 어머니처럼 격려해주신 박희열 교수님께도 감사를 드립니다.

그 밖에 이름을 일일이 거론하지 못한 많은 분들께도 감사의 마음을 전해 드립니다.

마지막으로 항상 희망과 삶의 목표가 되게 해주는 사랑하는 아내 정영주와 유진, 민주와 이 기쁨을 함께 나누고자 합니다.