

Research Article

Open Access

유색 호박 (*Cucurbita* spp.) 유전자원별 카로테노이드 대사체 분석

이민기¹, 조수연¹, 조수정¹, 신재형¹, 김현웅¹, 김상규¹, 고호철², 노나영², 김정봉^{1*}, 백형진^{2*}

¹국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과, ²국립농업과학원 농업유전자원센터

Changes in Carotenoid Contents of Colored Pumpkin (*Cucurbita* spp.) Germplasms

Min-Ki Lee¹, Soo-Yeon Cho¹, Soo-Jung Cho¹, Jae-Hyeong Shin¹, Heon-Woong Kim¹, Sang-Gyu Kim¹, Ho-Cheol Ko², Na-Young Ro², Jung-Bong Kim^{1*} and Hyung-Jin Baek^{2*} (Functional food & Nutrition Division, Department of Agro-food Resources, National Academy of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea, ²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, Wanju 55365, Korea)

Received: 13 February 2015 / Revised: 17 June 2015 / Accepted: 22 June 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: Carotenoids which are a major source of vitamin A are contributed to have great potential role in anti-carcinogenic effects and eyesight. Carotenoids which can not synthesize in human body are required for food supply. The objectives of this study are to investigate compositions and contents of pumpkin (*Cucurbita* spp.) germplasms based on their pulp color.

METHODS AND RESULTS: Carotenoids were extracted with 0.2% ascorbic acid in ethanol and saponified with 80% potassium hydroxide. Insoluble compounds were extracted into hexane. A total of nine carotenoids (three xanthophylls and six carotenes) were identified from pumpkin germplasms using HPLC equipped with photodiode array detector (450 nm). Especially, lutein and β -carotenes were major compound in germplasms. Among isomers of β -carotene, all-*trans*- β -carotene (16-27% of total carotenoids) was predominant compositions. The

mean of total carotenoid contents was showed as brown (286.1 mg/100 g dw) > dark green (217.0) > orange (153.4) > primrose (85.8) > dark yellow (80.3). On the basis of carotenoid information, PLS-DA score plots showed different patterns by cluster in pumpkin germplasms. It was considered that these differences of phenotype were relative closely to genotype.

CONCLUSION: This study indicated that dark color of pumpkin pulp was presented in high-level of biological pigments. It may contribute to develop potentially beneficial functional food ingredients.

Key words: Carotenoids, Lutein, PLS-DA score plotting, Pumpkin germplasm, *Trans-carotene*

서론

호박 (*Cucurbita* spp.)은 전 세계적으로 소비되고 있는 작물로서 껍질, 잎, 씨를 볶음, 죽 등 그 자체를 요리에 이용하거나 잼, 식빵 등 부재료로서 첨가되어 사용되고 있다(Lee and Kim, 2004; Bae *et al.*, 2006; Provesi *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2013) 영양학적으로 무기성분, 비타민 A와 C, 식이섬유, 아미노산, 펙틴 등이 풍부하고 다이어트식으로도 알려져 소비가 증가되고 있다 (Park YK *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 2001). 또한 식물성스테롤, 페놀화합물, 카로테노이드

*Corresponding author: Jung-Bong Kim
Phone: +82-63-238-3701; Fax: +82-63-238-3844;
E-mail: jungbkim@korea.kr

*Co-corresponding author: Hyung-Jin Baek
Phone: +82-63-238-4940; Fax: +82-63-238-4939;
E-mail: hjbaek@korea.kr

(carotenoids) 등이 함유되어 있는 것으로 알려졌으며, 특히 항산화효과가 있는 β -carotene 함량이 높아 기능성 소재로 활용될 가치가 증가하고 있다 (Palozza *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2012)

카로테노이드는 isoprene에서 유도되어 C₄₀의 구조를 갖는 화합물이다. 주로 과일, 꽃, 잎에 존재하며 노란색, 주황색, 적색 등 다양한 색을 나타내는 천연 식물색소이다 (Khoo *et al.*, 2011). 카로테노이드는 탄소와 수소로만 구성되어있는 carotene과 산소를 가지고 있는 hydroxy, keto, epoxy가 포함된 xanthophyll (or oxycarotenoid)로 구분되어 진다 (Oliver and Palou, 2000). 구조 내에 이중 결합에 따라서 색과 생화학적 특성에 기여 한다(Britton, 1995). *cis*-형과 *trans*-형 구조적으로 다양한 이성질체가 존재하고 700종 이상이 알려져 있다(You *et al.*, 1996). 비타민 A의 전구체인 카로테노이드는 항산화, 항암 효과 등 다양한 생물학적 효과를 갖고 있어 이용가치가 높다. 활성산소의 소거제로 작용함으로써 항산화효과를 갖는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2005). β -Carotene은 심혈관질환, 폐암에 대한 활성을 갖는다고 알려져 있다 (Omenn *et al.*, 1996). 또한 lycopene은 전립선암에 대한 효과를 나타내고, lutein, zeaxanthin 등의 섭취는 백내장의 위험을 감소시켜주는 것으로 보고되었다 (Brown *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). 이런 카로테노이드 단일 성분보다 혼합물 형태로 섭취하였을 때 보다 효과적인 것으로 알려져 있다(Stahl and Sies, 2005).

카로테노이드는 체내에서 합성되지 않기 때문에 농 식품으로부터 섭취해야 한다. 따라서 본 연구에서는 호박 유전자원 내 카로테노이드 함량을 분석하여 카로테노이드 고함유 유전자원 선발 및 과육색에 따른 함량 비교를 통하여 고함유 품종 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였고 뿐만 아니라 기능성 소재로서 활용가치를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 재료

본 연구에 사용된 호박 시료는 농촌진흥청 국립농업과학원 유전자원센터로부터 총 100종을 분양받았다. 과육색에 따라 연노랑색 7종, 진노랑색 25종, 주황색 52종, 진녹색 6종, 황토색 10종으로 분류하였다. 분석 전 시료로 사용하기 위하여 모든 유전자원은 동결건조한 후 곱게 분말하였다.

기기 및 시약

추출 및 분석 용매로 사용한 ethanol (EtOH), hexane, methanol (MeOH) 및 초순수는 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)를 사용하였고 methyl *tert*-butyl ether (MTBE)는 JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. Triethylamine, ascorbic acid 및 내부표준품으로 *trans*-8'-apo- β -carotenal (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. Potassium hydroxide (KOH) Junsei Chemical Co., Ltd. (Kyoto, Japan)를 사용하였다. 호박 내

카로테노이드 분석은 2998 photodiode array detector (PDA)가 장착된 Alliance e2695 HPLC system (Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

시료 전처리

균질화된 시료 0.5 g을 50 mL Falcon-tube에 담고 0.2% ascorbic acid in EtOH 20 mL를 넣은 다음 항온수조(80°C)에서 15분간 추출 한 후 냉각(10분)한다. 추출액에 80% KOH 용액 5 mL을 넣고 항온수조에서 10분간 비누화 반응 후 냉각 (10분)한다. 냉각 후 반응이 정지된 tube에 초순수 5 mL, hexane 5 mL와 내부표준물질 (*trans*-8'-apo- β -carotenal, 25 ppm)을 1 mL를 넣은 후 진동혼합(vortex)하고 원심분리 (1800 rpm, 4°C, 10 min)한다. 상층액 (hexane층)을 micro-pipette으로 취해 50 mL Falcon-tube에 옮긴다. 동일한 조건으로 초순수 5 mL, hexane 5 mL를 넣고 상층액을 취하는 과정을 2회 더 실시한다 (총 3회). N₂ 가스로 추출총액 (hexane 15 mL)을 농축한다. MeOH:TBME (1:1, v/v) 1 mL을 넣어 완전히 녹인다. Syringe filter(PTFE, 0.45 μ m)로 여과 후 분석한다.

HPLC를 이용한 카로테노이드의 조성 및 함량 분석

분석 컬럼은 YMC carotenoid (250 × 4.6 mm, i.d., 5 μ m) (YMC Inc., Wilmington, USA)를 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C로 설정하였으며, 시료 주입량은 10 μ L, 검출과장은 210-600 nm (대표과장 450 nm)로 하였다. 이동상으로는 용매A (MeOH:MTBE:water:triethylamine=81:15:4:0.1, v/v/v/v)와 용매B (MeOH:MTBE:water:triethylamine=6:90:4:0.1, v/v/v/v)를 사용하였고, 유량은 1.0 mL/min로 하였다. 용매 구배조건은 B를 0%로 시작하여 5분까지 유지시켰고 35분까지 일정하게 50%로 증가시켰다. 45분까지 100%로 증가시켰고 5분 동안 유지하였다. 55분까지 다시 0%로 감소시키고 60분까지 유지하였다(modified from Kim *et al.*, 2014). 개별 카로테노이드 성분의 면적은 내부표준물질의 면적을 이용하여 상대적으로 정량(mg/g dry weight, DW)하였다.

다변량 통계 분석

모든 유전자원의 카로테노이드 정량 및 과육색 정보를 바탕으로 데이터를 표준화한 후, SIMCA-P 11.0 software (Umetrics, Umea, Sweden)의 부분최소자승판별법(partial least squares of discriminant analysis: PLS-DA) 모델을 통해 클러스터 분석을 하였다.

결과 및 고찰

호박 유전자원으로부터 총 9종 (lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, 13-*cis*- α -carotene, 15-*cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- α -carotene, all-*trans*- β -carotene, 9-*cis*- β -carotene)의 카로테노이드를 분리하였다 (Fig. 1). 각

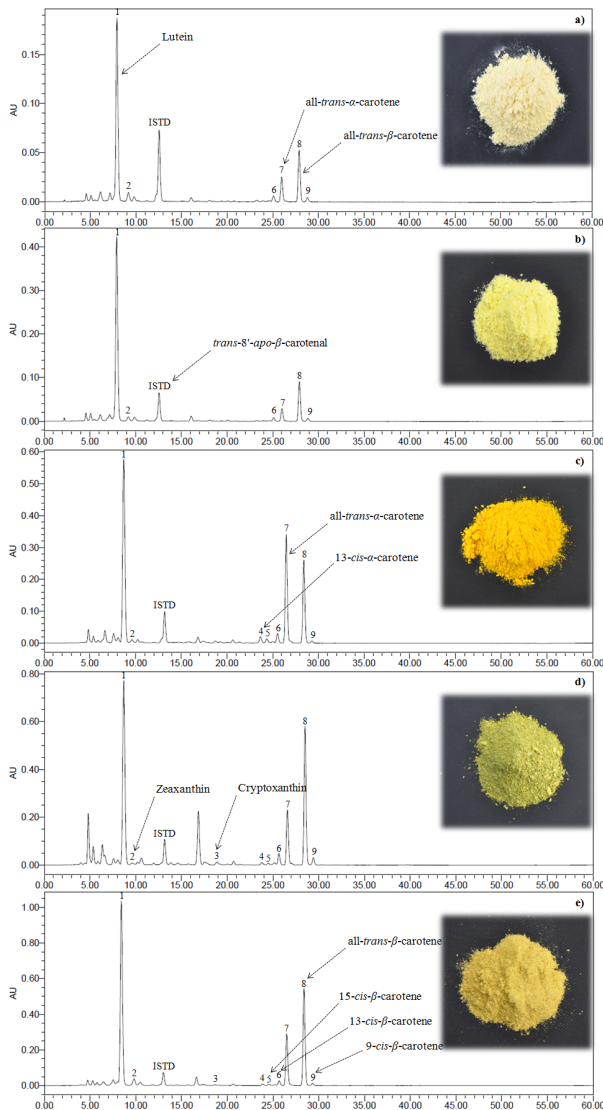


Fig. 1. HPLC chromatograms from different color of pumpkin (*Cucurbita* spp.) germplasms. a), primrose; b), dark yellow; c), orange; d), dark green; e), brown.

카로테노이드는 내부표준물질인 *trans*-8'-apo- β -carotenal를 사용하였으며, relative response factor를 고려하지 않고 정량 (mg/100 g dry weight, dw)하였다. 각 개별 성분은 (Kim et al., 2014)의 문헌을 참고하여 동정하였다.

과육색에 따른 호박 유전자원 내 카로테노이드 함량 분석 결과, 총 카로테노이드 함량 범위는 연노랑(23.0-193.5 mg/100 g dw), 진노랑(16.33-273.7), 주황색(20.8-689.7), 진녹색 (113.7-359.5), 황토색 (119.7-947.1)으로 비슷한 과육색 내에서도 유전자원 간 차이가 나는 것으로 나타났다 (Table 1). 그러나 총 함량 평균은 과육색이 진할수록, 황토색 (평균 286.1 mg/100 g dw) > 진녹색(217.0) > 주황색 (153.4) > 연노랑(85.8) > 진노랑(80.3) 순으로 높았다. 이는 종이 다른 호박(*Cucurbita maxima* L.) 내 카로테노이드 함량을 평가한(Kreck et al., 2006)의 연구결과와 마찬가지로 lutein과 β -carotene이 주요 성분임을 확인하였으나 luteoxanthin은 검출되지 않았다. 또한 총 카로테노이드 함량(4.4-57.0 mg/100 g dw)보다 높은 유전자원이 많은 것을 확인할 수 있었다. 과육색에 따라 특이적으로 검출된 성분은 없었고 함량 차이만 있었다. 과육색과 상관없이, 검출된 성분 중 xanthophyll류(lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin)와 carotene류(13-*cis*- α -carotene, 15-*cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- α -carotene, all-*trans*- β -carotene, 9-*cis*- β -carotene)의 총 카로테노이드 함량 비율은 각각 72, 28%로 xanthophyll류가 약 2.6배 높았다. 과육색에 따른 구분 없이 호박 내 주요 카로테노이드는 xanthophyll류에 속하는 lutein으로 총 함량의 62-74%를 차지하였고 all-*trans*- β -carotene (16-27%)와 all-*trans*- α -carotene (3-10%)의 순으로 높았다(Fig. 2). (Seo et al., 2005)에 의하면 β -carotene과 lutein의 함량이 총 카로테노이드 함량 중 각각 79, 2%로 다른 경향을 나타내었다. Lutein 함량은 황토색 (평균 201.0 mg/100 g dw)에서 최고값을 나타냈으며, 진노랑(55.9)보다 약 3.6배 높았다. 호박으로부터 검출된 α -carotene과 β -carotene은 모두 이성질체 형태로 다양하게 존재하는 것으로 확인되었으며, *trans*-형의 함량 비율이 *cis*-

Table 1. Carotenoid contents (mg/100 g dry weight) in different pulp color of pumpkin (*Cucurbita* spp.) germplasms

No.	Chemical names	Primrose		Dark yellow		Orange		Dark green		Brown	
		Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
1	Lutein	13.5-128.7	63.9	10.4-22.6	55.9	5.0-589.0	107.4	54.4-259.0	134.5	50.5-743.3	201.0
2	Zeaxanthin	0.4-4.0	1.3	0.8-13.7	1.7	0.5-129.8	5.1	0.7-3.1	1.5	0.7-9.0	4.5
3	Cryptoxanthin	0.8-1.1	0.3	0.3-3.7	0.2	0.2-8.4	0.7	0.7-4.4	2.3	1.2-7.2	1.9
4	13- <i>cis</i> - α -carotene	ND ^{a)}	ND	0.2-1.1	0.2	0.3-1.9	0.4	0.7-1.3	0.3	1.5-2.1	0.4
5	15- <i>cis</i> - β -carotene	ND	ND	0.3-0.6	0.1	0.1-1.1	0.2	0.3-0.8	0.2	0.7-1.6	0.2
6	13- <i>cis</i> - β -carotene	0.4-3.9	0.9	0.4-2.8	1.0	0.5-5.5	2.1	2.2-4.0	2.9	0.5-8.4	3.0
7	all- <i>trans</i> - α -carotene	1.1-8.7	2.7	0.6-20.3	8.1	1.9-41.7	11.5	3.1-38.8	14.3	1.7-74.1	24.1
8	all- <i>trans</i> - β -carotene	5.0-71.7	16.1	1.9-50.2	12.6	3.6-66.8	25.1	36.2-98.0	58.5	6.8-100.4	48.5
9	9- <i>cis</i> - β -carotene	0.4-2.5	0.6	0.1-1.7	0.4	0.2-2.7	1.0	1.4-3.5	2.4	0.9-11.4	2.5
Total		23.0-193.5	85.8	16.33-273.7	80.3	20.8-689.7	153.4	113.7-359.5	217.0	119.7-947.1	286.1

^{a)}ND, not detected.

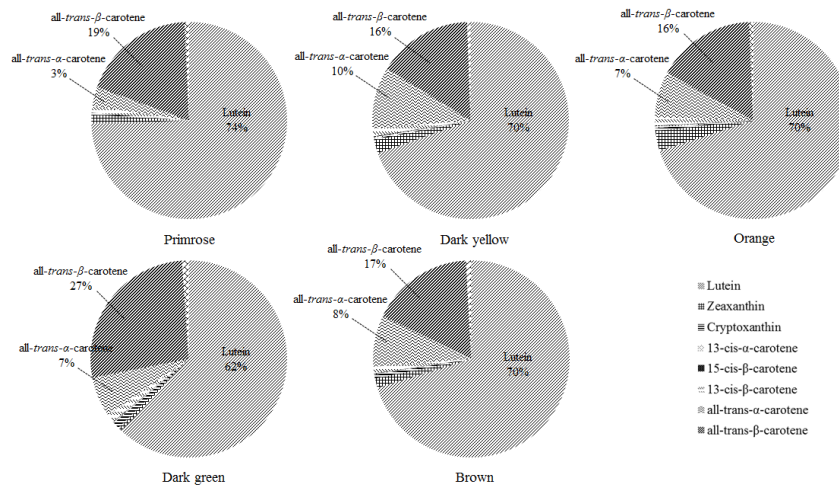


Fig. 2. Pie chart of ratio of carotenoid contents in different pulp color of pumpkin (*Cucurbita* spp.) germplasms.

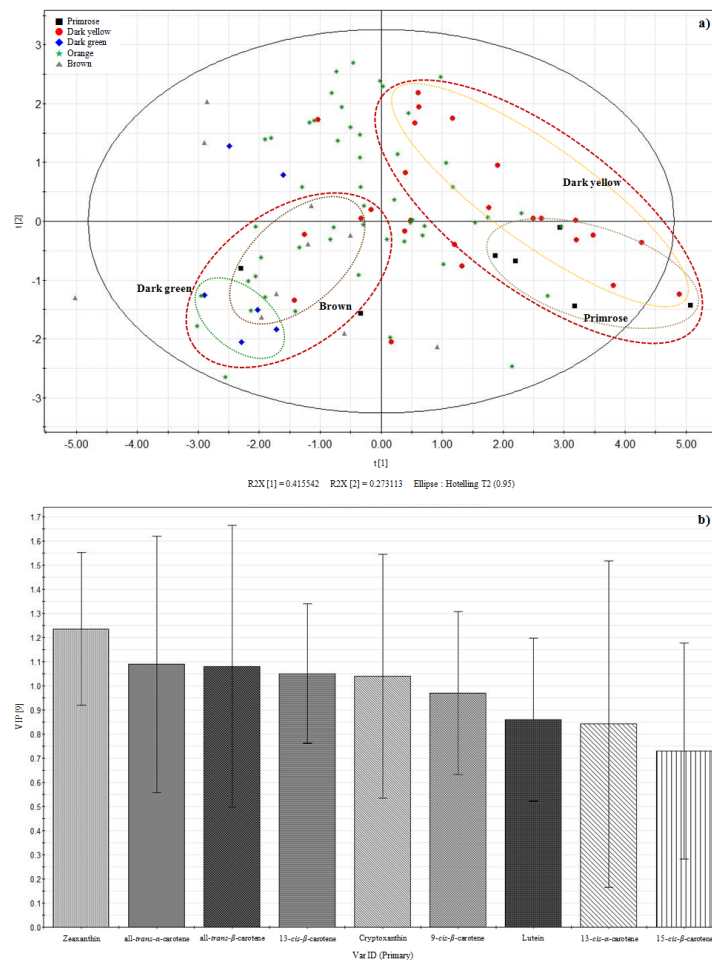


Fig. 3. Scores plotting chart of principal components 1 and 2 of the PLS-DA results obtained from the data set by carotenoid profiling of pulp color in Pumpkin (*Cucurbita* spp.) germplasms. a), classifications by origin of the all samples; b), influence of variable for this classifications.

형 보다 약 3배 높았다. *cis*-카로테노이드는 이중결합의 위치에 따라 최대흡수파장 330-350 nm를 갖기 때문에 *cis-trans* 이성질체 조성에 따라 색깔이 달라진다고 보고되어 있다

(Schieber and Carle, 2005). 따라서 과육색이 짙은 호박은 *cis*-carotene 함량이 노란색류의 호박보다 상대적으로 높아 짙은색을 띠는데 기인한 것으로 사료된다. *all-trans-β*-carotene

함량은 진녹색(평균 58.5 mg/100 g dw)이 가장 높았으며, 총 함량의 27%를 차지하였다. 그 다음으로 황토색 (48.5 mg/100 g dw) > 주황색 (25.1) 순으로 높았고 각각 총 함량의 17, 16%를 차지하였다. 농 식품 내 존재하는 카로테노이드는 *trans*-형이 *cis*-형보다 안정하고 *all-trans-β-carotene*은 9-*cis* or 13-*cis-β-carotene*보다 생물학적 효과가 높다고 알려져 있다 (Deming *et al.*, 2002). 또한 *all-trans-β-carotene*이 *cis-β-carotene*보다 체내에 흡수가 잘된다고 알려져 있다 (Ben-Amotz and Levy, 1996). 따라서 *all-trans-carotene* 함량이 높은 호박 유전자원은 향후 품종 육성 및 기능성 소재로 활용 가치가 있다고 사료된다.

과육색에 따른 각 집단 간의 카로테노이드 조성 및 함량에 대한 상관관계를 PLS-DA score plotting을 확인하였다 (Fig. 3). 과육색이 주황색인 집단은 유전자원별 편차가 크므로 넓은 분포를 나타내었다. 상대적으로 카로테노이드 함량이 높은 진녹색과 황토색 집단은 유사한 경향을 나타내었다. 또한 상대적으로 카로테노이드 함량이 낮은 집단에 속하는 진노랑은 넓은 범위의 분포를 나타내었으나 전체적으로 연노랑 집단과 클러스터를 형성하는 것을 확인하였다. 이러한 집단 간 분포에 가장 큰 영향을 미친 성분은 *zeaxanthin*, *all-trans-α-carotene*, *all-trans-β-carotene* 순으로 나타났다. 과육색이 짙을수록 *zeaxanthin*이 검출되는 유전자원 수가 많기 때문에 가장 큰 영향을 미친 것으로 사료된다.

결론

과육색이 다른 호박 유전자원 내 카로테노이드 조성 및 함량을 조사한 결과, 과육색에 따른 함량 변화만 있었고, 총 9 종이 검출되었다. 호박 내 주요 성분은 *lutein*, *all-trans-β-carotene*, *all-trans-α-carotene*임을 확인하였다. 검출된 *carotene*류 성분은 모두 이성질체 형태로 다양하게 존재하였고 보다 안정한 형태인 *trans-carotene*의 함량 비율이 높았다. 과육색에 따른 총 카로테노이드 함량 평균은 황토색 > 진녹색 > 주황색 순으로 과육색이 진할수록 높았다. 과육색에 따른 각 집단 간 상관관계를 PLS-DA score plotting 모델을 통하여 확인한 결과, 상대적으로 과육색이 짙은 진녹색과 황토색 집단이 유사한 경향을 나타내었다. 이에 가장 큰 영향을 미친 성분은 *zeaxanthin*, *all-trans-α-carotene*, *all-trans-β-carotene* 순으로 나타났다. 따라서 두 집단 간 유사 경향을 기반으로 한 우수 자원 선발을 통하여 향후 고기능성 품종 육성 및 다양한 기능성 소재로 활용 가치가 있다고 사료된다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of 'Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ010153)' Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Ben-Amotz, A., & Levy, Y. (1996). Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic *all-trans-β-carotene* in human serum. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 729-734.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
- Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., Van Breemen, R., Ashton, D., & Bowen, P. E. (2001). Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(24), 1872-1879.
- Deming, D. M., Teixeira, S. R., & Erdman, J. W. (2002). *All-trans β-carotene* appears to be more bioavailable than 9-*cis* or 13-*cis β-carotene* in gerbils given single oral doses of each isomer. *The Journal of Nutrition*, 132(9), 2700-2708.
- Jang, S. M., Park, N. Y., Lee, J. B., & Ahn, H. (2001). The comparison of food constituent in different parts of pumpkin. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30(6), 1038-1040.
- Khoo, H. E., Prasad, K. N., Kong, K. W., Jiang, Y., & Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*, 16(2), 1710-1738.
- Kim, H. W., Kim, J. B., Poovan, S., Chung, M. N., Cho, S. M., Lee, Y. M., Cho, Y. S., Kim, J. H., & Kim, H. R. (2014). Effect of processing conditions on the content of *cis/trans* carotene isomers as provitamin A carotenoids in Korean sweet potato varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(7), 821-826.
- Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y. N., Choi, C., & Lee, B. H. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutrition Research and Practice*, 6(1), 21-27.
- Kim, S. R., Ha, T. Y., Song, H. N., Kim, Y. S., & Park, Y. K. (2005). Comparison of nutritional composition and antioxidative activity for kabocha squash and pumpkin. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 171-177.
- Kreck, M., Kürbel, P., Ludwig, M., Paschold, P. J., & Dietrich, H. (2012). Identification and quantification of carotenoids in pumpkin cultivars (*Cucurbita maxima* L.) and their juices by liquid chromatography with

- ultraviolet-diode array detection. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 80(2), 93-99.
- Lee, K. J., & Kim, M. R. (2004). Quality evaluation of pumpkin jam replaced sucrose with sugar alcohols during storage. *Journal of East Asian Society of Dietary Life*, 14, 123-130.
- Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 543-555.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., & Hammar, S. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1150-1155.
- Palozza, P., Calviello, G., & Bartoli, G. M. (1995). Prooxidant activity of β -carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(6), 887-892.
- Park, Y. K., Kang, Y. H., Lee, B. W., & Seog, H. M. (1997). Changes of carotenoids of the pumpkin powder during storage. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 26(1), 32-36.
- Schieber, A., & Carle, R. (2005). Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 416-422.
- Seo, J. S., Burri, B. J., Quan, Z., & Neidlinger, T. R. (2005). Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal of Chromatography A*, 1073(1), 371-375.
- Shin, D. S., Park, B. R., Yoo, S. M., & Hwang, Y. (2013). The optimization of instant pumpkin gruel with pumpkin powder using response surface methodology. *Korean Journal of Food and Cookery Science*, 29(3), 291-300.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 101-107.