

순무백김치의 이화학적 특성 및 인체위암세포(AGS)의 항암효과

임금자* · 강순아**,**

호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, *호서대학교 보건산업연구소 연구원,
호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, *호서대학교 보건산업연구소 소장

Physicochemical of Turnip Baek-Kimchi and Anti-Cancer Effects of Human Gastric Cancer Cells (AGS)

Gum Ja Im* and †Soon Ah Kang**,**

Ph.D. Student, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

*Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

**Professor, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

***Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

Comparing the quality characteristics of kimchi were measured and anticancer effects using AGS human gastric cancer cells were observed. Five kinds of kimchi samples were made of Kanghwa Baek kimchi (KB), Kangwha Turnip kimchi (KT), Turnip: Chinese cabbage = 1:1 Baek kimchi (T1B1), Turnip:Chinese cabbage = 4:1 Baek kimchi (T4B1), Turnip mul kimchi (T). As a result T kimchi showed the best fermentation characteristics among the five samples. T kimchi had a lower percentage of the total number of aerobic bacteria, while the number of lactobacillus was higher than that of other samples. The mRNA and protein expression levels of apoptosis-related factors found that T kimchi significantly increases the mRNA expression levels of caspases-3 and caspases-9 in AGS human gastric cancer cells as compared to the other kimchi samples. It showed high anticancer effects in the order of T, T1B1, and KB kimchi. As the anticancer effect of Turnip mul kimchi made only of turnip was higher, the higher the turnip content, the higher the anticancer effect. These results show that there were changes in fermentation characteristics such as pH, acidity, number of lactic acid bacteria, and anticancer effects according to the ratio of turnip and cabbage.

Key words: physicochemical, turnip baek-kimchi, anti-cancer effects, human gastric cancer cells

서론

의학의 발전에도 불구하고 질병은 인간의 삶의 일부이며, 질병퇴치를 위한 의약품 발견의 주요 원천 중 하나는 식물이다. 순무(*Brassica rapa* L., *Brassica campestris* L.)는 세계에서 가장 오래된 재배 채소 중 하나로 십자화과에 속하는 채소로 무의 일종이면서 무보다 순한 맛을 가지지만 무와는 다른, 섬유질이 적고 독특한 맛을 나타낸다(Kang IH 1991; Paul 등 2019; Kim MR 2000). 원산지는 유럽 서남부의 해안 지방이며 우리나라는 삼국시대부터 재배하기 시작하였고 고려 중엽에 이규보의 가포육영에 김치재료로는 최초로 등

장한 순무가 기록되어 있으며 강화도는 조선 중엽 무렵부터 재배하기 시작하였다. 우리나라에서는 강화도와 개성의 특산물로 순무가 알려져있다(Kang IH 1991). 동의보감에 의하면 맛이 달며 독성이 없으며 황달과 오장에 좋으며 소변을 잘 통하게 하고 눈을 밝게 하며 미용에 좋은 생리활성이 있다고 전하고 있다(Heo J 1994).

순무의 주요 활성성분은 glucosinolates, iosthiocyanates, flavonoids와 phenylpropanoids로 이들은 항산화, 항암, 항균, 항당뇨, 간 보호효과 및 항염증과 같은 다양한 기능이 있다고 알려져 있다(Paul 등 2019). 강화도 재래 순무의 특징은 무보다 칼슘 혹은 칼륨 성분 함유량이 높고, 뿌리 윗부분은

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

자색을 띠는데 이 색소는 안토시아닌 색소에 기인하며(Kim MR 2000; Kim YJ 2000), 안토시아닌 함량을 순무의 부위별로 분석한 결과 껍질부분이 과육보다 약 3.5배 이상 함유되어 있으며 순무뿌리에는 glutamic acid 함량이 높다고 하였다(Park 등 1999). 또한 강화 순무는 일반 무와 다른 형태로 뿌리는 적자색이며 알싸한 맛이면서 매운맛이 적은 것이 특징이다(Hwang 등 2020). 알싸한 맛의 특성은 순무의 성분인 isocyanate와 indol에 의한 것으로 다양한 생리활성 및 항암 효능이 보고되어 있다(Kim 등 2006). 순무의 혈관내피세포 염증에 순무처리가 염증인자를 감소하면서 동맥경화 예방 및 개선효과 가능성도 보여주었다(Hwang 등 2020). 또한, 순무에 함유된 phytosterol에 의한 콜레스테롤함량 감소현상 효과를 관찰하면서 항고지혈효과를 보고하였다(Rhee 등 2005).

순무의 약성에 관한 연구는 다수 되어있으나 순무 김치에 대한 연구는 품종별 순무 김치의 이화학적 및 관능적 특성(Kim MR 2000), 생순무와 열처리순무의 아질산염소기작용(Park 등 1999), 순무 동치미 숙성과정 중 이화학적 · 관능적 특성 변화(Oh 등 2003)와 저장 중 품질변화(Lee & Oh 2002), 키토산 첨가에 의한 순무피클의 이화학 및 관능적 특성변화(Son 등 2003)와 순무 깎두기의 항 발암 효소 유도효과(Kim 등 1997; Kim 등 1998a), 아로니아 등 천연소재 분말을 첨가한 순무 물김치의 품질특성연구(Kim 등 2018)에 국한되어 있으며, 순무를 소재로 김치에 관한 기능성 연구는 아직도 부족한 실정이다.

김치는 소금에 절인 배추 및 무 등 채소를 고춧가루, 마늘, 생강 등의 다른 양념과 함께 발효하면서 생성된 젖산균 혹은 유산균이 생성되는 프로바이오틱 식품(probiotic food)이다(Park 등 2014). 김치는 항산화, 항암, 면역증진, 항비만, 항노화, 항당뇨 등 다양한 건강기능성 및 생리활성효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Park & Ju 2018), 사용되어지는 재료, 제조방법, 지리적 지역, 계절 등에 따라 약 300여종의 김치가 있다(Jeong 등 2015). 그 중 백김치는 고춧가루와 젓갈을 넣지 않고 여러 가지 고명을 넣어 맵고 짜지 않으며, 재료가 간편하고 손쉽게 제조해 먹을 수 있는 김치이다(Moon & Ryu 1997; So & Kim 1997). 김치의 강한 맛을 싫어하고 짜고 매운 것에 대한 불편함이 비교적 적어 어린이나 외국인들에게 선호도가 높은 경향이 있다(Park 등 2003; Yoon 등 2004). 그러나 지금까지의 김치에 관한 연구는 배추김치에 대한 연구가 대부분이며 백김치 관련 연구는 백김치가 숙성 과정 중 특성변화 연구(Moon & Ryu 1997; Park 등 2003), 발효 미생물 생육도 연구(Oh & Hong 2020), 백김치의 독성 억제효과 연구(Moon 등 2001), 고지방식에 의한 비만 쥐에서 백김치의 항비만 효과(Yoon 등 2004), 열무김치의 위암세포 성장억제효과(Kong 등 2006) 등 부분적으로

이루어져서 앞으로 많은 연구가 요구되어진다.

따라서 본 연구는 순무와 배추를 혼합하여 만든 순무백김치의 항암 기능성 증진에 대해 연구하였다. 순무와 배추를 여러 비율을 사용하여 김치를 제조하였을 때 발효 지표인 산도와 pH, 총균수, 유산균수의 변화를 측정하였으며 AGS 인체 위암 세포를 이용하여 항암 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용한 김치의 재료는 2021년 11월 강화도에서 수확한 것으로 강화섬 김치(Incheon, Korea)로부터 제공받았고 김치의 숙성기간은 5°C에서 15일 숙성 후 실험을 진행하였다. 제공받은 시료의 종류는 순무백김치로 강화섬 백김치(정제염 사용)(KB), 강화섬 순무물김치(정제염 사용)(KT), 순무:배추=1:1인 순무백김치(죽염 사용)(T₁B₁), 순무:배추=4:1인 순무백김치(죽염사용)(T₄B₁), 순무물김치(죽염사용)(T)로 실험을 진행하였으며 김치의 조성표는 Table 1에 제시하였다.

2. 김치 추출물 제조

김치가 최적의 숙성 기간인 pH 4.3 부근에 도달하면, 김치를 -20°C에서 냉동시킨 후, 동결건조기(FD5512, Ilshin BioBase Co., Korea)로 건조시켰다. 건조된 김치는 블렌더를 이용하여 마쇄하여 김치 가루를 만들었다. 김치 가루의 20배 메탄올을 첨가하고, 48시간 동안 교반기로 교반시킨 김치 메탄올 추출물 시료를 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축시킨 후, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 100 mg/mL의 농도로 만들어 *in vitro* 실험에 사용하였다(Kim 등 2013). 김치의 추출수율은 34.5%로 나타났다.

3. 염도 측정

시료의 염도 측정은 김치를 멸균된 비닐팩에 담아 착즙하여 300 μ L 김치시료액을 염분농도계(NS-3P, Merbabu, Japan)를 이용하여 염도를 측정하였다.

4. pH 및 산도 측정

착즙한 김치 시료액을 사용하여 pH 측정은 실온에서 pH meter(M220, Coming, MA, USA)로 측정하였다. 산도는 AOAC 표준시험법(AOAC 1990)의 방법에 따라 시료를 20배 희석한 후 0.1 N NaOH를 넣고 pH 8.4가 되도록 적정하였고, 이 과정에 사용된 0.1 N NaOH mL 양을 측정하여 적정 값은 젖산의 함량을 %로 환산하여 계산하였다.

Table 1. Ingredients of kimchi

Ingredient of kimchi	KB	KT	T ₁ B ₁	T ₄ B ₁	T
Baechu cabbage (g)	75		30	12	
Turnip (g)		60	30	48	60
Radish (g)	15				
Onion (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Garlic (g)	1.5	2	2	2	2
Ginger (g)	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1
Green onion (g)		0.5	0.9	0.9	0.9
Pear (g)	0.3				
Water (g)	5	35	35	35	35
Carrot (g)	0.04				
Jujube (g)	0.02				
Shredded red paper (g)	0.02				
Pine nut (g)	0.02				
Lactobacillus (CFU/g)			1×10 ⁶	1×10 ⁶	1×10 ⁶
Nano lactobacillus (g)			0.008	0.008	0.008
Extraction of mistletoe (g)			0.05	0.05	0.05
Taemyungcheong (g)			2	2	2
Purified salt (g)	1	0.5			
Bamboo salt (g)			0.5	0.5	0.5

KB: Kanghai Baek kimchi, KT: Kangwha Turnip kimchi, T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T₄B₁: Turnip:Chinese cabbage =4:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi.

Acidity (%) =

$$\frac{\text{mL of 0.1N NaOH} \times 0.1 \times \text{Dilution rate} \times 0.09^*}{\text{Weight of sample (g)}} \times 100$$

*0.09: conversion factor.

5. 총 균수 및 유산균 수 측정

시료의 총 균수는 착즙한 김치 시료액 1 mL를 멸균한 증류수를 이용하여 단계별로 희석하고 0.1 mL씩을 미리 가열 후 용해하여 냉각한 PCA(plate count agar; Difco, Detroit, MI, USA) 평판배지에 도말을 하였고, 48시간 동안 37°C incubator에서 배양 한 후 평판계수법(plate count technique)을 이용하여 colony 수를 계수하였다. 유산균수는 김치 시료 액체를 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe; Difco, Sparks, MD, USA)에 접종하여 혐기적 조건으로 만들기 위하여 wrapping하여 혐기적 조건으로 만든 후 48시간 동안 37°C incubator에서 배양 한 후 colony 수를 계수하였다(Lee 등 1992).

6. 암세포 배양

AGS 인체 위암세포(human gastric cancer cell)는 한국 세

포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포배양에 필요한 시약(RPMI 1640, fetal bovine serum: FBS)은 Welgene Inc.(Daegu, Korea)에서 구입하였고, 100 units/mL penicillin-streptomycin과 0.05% trypsin-0.02% EDTA는 Gibco BRL(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양실험은 RPMI 1640에 10%의 FBS와 100 units/mL penicillin-streptomycin을 혼합한 배지로 5% CO₂ incubator를 이용하여 세포배양을 하였다. 배양된 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하며, 2~3일 경과 후 PBS 용액으로 세척한 후, 부착된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 탈착한 후 원심분리하였다. 원심분리 후 축적된 암세포와 배지를 피펫으로 잘 혼합한 후 10 mL씩 75T cell culture flask에 주입하고, 2~3일 간격으로 계대 배양 하였다(Song JL 2012).

7. MTT assay 실험을 이용한 세포성장 및 성장 억제율 측정

배양된 AGS 인체 위암세포를 cell counter(Luna automated cell counter, Logos Biosystems, Gyunggi, Korea)를 이용하여 세포 수를 측정하였고 well당 5×10⁴ cells/mL가 되도록 100 μL씩 96 well plate에 분주한 후 24시간동안 배양하였다. 이후, 김치 추출물이 함유된 배지를 세포에 48시간 동안 처리하고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)의 농도를 5 mg/mL로 혼합시킨 배지를 well당 100 μL 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. 반응 이후, 형성된 formazan 은 DMSO를 이용하여 용해시켜 암실에서 30분 동안 반응시키고, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Skehan 등 1990).

8. RT-qPCR을 이용한 AGS 세포 내 mRNA 발현 측정

배양된 AGS 인체 위암세포는 cell counter(Luna automated cell counter; Logos Biosystems, Gyunggi, Korea)를 이용하여 세포 수를 측정하여 well당 1.0×10⁵ cells/mL의 세포들을 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 AGS 인체 위암세포는 250 μg/mL 농도의 김치 추출물이 함유된 배지를 첨가하여 48시간 동안 처리하였다. 이후 배지를 제거하고 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 세포에서 RNA를 분리하여, 0.1% diethyl-pyrocyanate에 용해시켰다. 총 RNA 측정은 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE)로 정량한 후, Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 유전자 발현을 분석하였다(Kim HY 2013; Song 등 2017). 유

전자로는 18S rRNA, Caspase 3와 Caspase 9을 사용하고, 사용한 primer 서열은 다음과 같다: 18S rRNA forward 5'-CAG CCA CCC GAG ATT GAG CA-3', reverse 5'-TAG TAG CGA CGG GCG GTG TG-3', caspase 3 forward 5'-TTT TTC AGA GGG GAT CGT TG-3', reverse 5'-CGG CCT CCA CTG GTA TTT TA-3', caspase 9 forward 5'-CTA GTT TGC CCA CAC CCA GT-3', reverse 5'-CTG CTC AAA GAT GTC GTC CA-3'.

9. Western blot을 이용한 AGS 세포 내 유전자의 단백질 발현 측정

세포의 배양 및 샘플처리는 mRNA 측정과 동일한 방식을 사용하였다. 샘플 처리과정을 거친 후 세포의 배지를 제거하고 Radio-immunoprecipitation assay(RIPA, Invitrogen) buffer로 단백질을 분리하였다. 단백질 농도 정량은 Bradford assay 방법을 이용하였다. 추출된 단백질은 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad) membrane에 이동시킨 후, 비특이적 단백질을 blocking하기 위하여 PBS-T를 함유한 5% skim milk를 처리하였다. Blocking시킨 후, PVDF membrane은 PBS-T 3회 처리, PBS 1회 처리로 세척한 후 4°C에서 overnight하면서 1차 항체를 반응시켰다. 다음 과정으로 PBS-T 3회 처리, PBS 1회 처리로 세척한 다음 실온에서 2시간 동안 2차 항체를 처리하였다. Caspase 3, Caspase 9 및 β -actin(Santa Cruz, Dallas, TX, USA) 1차 항체를 실험에 사용하였고, 각각의 종류에 적합한 2차 항체를 사용하여 LAS-4000(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)로 발현 정도를 확인하였다(Zhao 등 2013).

10. 통계 처리

실험결과 중 RT-qPCR 결과는 평균±표준오차(standard error, SE)로 표시하였고, 이를 제외한 실험 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 통계분석은 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시한 후 유의도는 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 처리 방법 간의 유의성을 검증하여 $p < 0.05$ 이하인 경우 유의성이 있다고 평가하였다. SPSS v18 statistical software package(SPSS Inc., Westlands, Hong Kong)를 이용하여 모든 실험을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 이화학적 특성 변화

김치를 5°C에서 4주간 발효하면서 염도를 측정하였다(Fig. 1A). 5종류의 김치 모두 1.0~1.4%의 염도를 나타냈으며 4주간 큰 변화는 없었다.

김치 숙성 과정 중 각종 효소와 미생물에 의해 생성되는 유기산 등은 김치의 특유한 신선한 맛을 주므로, 김치의 pH는 감소하면서 산도는 증가하여 김치가 숙성되어진 정도를 짐작할 수 있다(Ku 등 1988; Shim 등 1990; Lee 등 1999). 특히, 발효과정 중 산도에 의하여 유산균의 생육과 김치의 발효 정도를 예측할 수 있는데 본 실험에서 발효 시간이 경과함에 따라 김치 시료의 pH는 낮아졌다(Fig. 1B). T₄B₁ 김치와 T₁B₁ 김치는 거의 비슷하게 pH가 낮아졌다. T 김치는 0주차 때 제일 pH가 높았지만 발효 3주차가 되면서 다른 김치들과 비슷한 pH를 보였다.

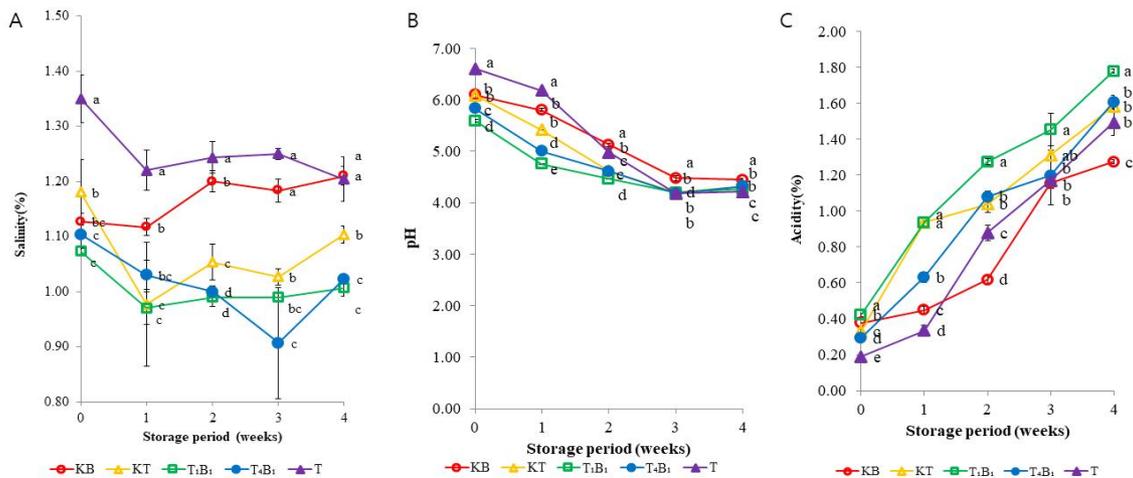


Fig. 1. Change of (A) salinity, (B) pH, (C) acidity in various kinds of kimchi fermented at 5°C. KB: Kanghwa Baek kimchi, KT: Kangwha Turnip kimchi, T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T₄B₁: Turnip:Chinese cabbage=4:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi. ^{a-e}Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

김치는 초기 발효 과정에서 *Leuconostoc* 속 및 *Weisella* 속 등의 유산균에 의해 이형발효가 진행되고, 적숙기 과정이 지나면 내산성이 강한 미생물에 의해 *Lactobacillus* 속 등에 의하여 동형발효가 진행되면서 유산균 생성량이 증가하여 (Lee JH 2008) 산도도 높아진다. 본 실험에서 산도는 모든 김치에서 시간이 지나면서 증가하였다. 3주차에 T₁B₁ 김치 1.45±0.09%, KT 김치 1.31±0.03%, T₄B₁ 김치 1.20±0.16%, T 김치 1.17±0.02%, KB 김치 1.16±0.03%로 나타났다(Fig. 1C).

Kim MR(2000) 연구에 의하면 강화도 재래 순무 중 적순무와 청순무 김치의 숙성기간 중 pH와 산도의 변화는 숙성기간이 경과할수록 pH의 감소효과를 보이면서 전형적인 김치의 숙성과정을 볼 수 있었으며 본 연구의 변화양상과도 흡사하였다. 숙성 기간 70일 동안 pH 변화는 청순무김치가 적순무김치보다 약간 낮게 나타났다. 본 연구에서는 적순무를 활용하여 백김치를 담그면서 수분의 함량이 있기 때문에 pH는 약간 높은 수치인 4.22~4.36 범위였다. 주재료와 부재료의 종류에 의한 차이가 있으며 온도의 영향에도 차이가 있을 것으로 사료된다. 순무동치미 숙성 중 pH 변화는 숙성이 진행됨에 따라 낮아지는 경향을 보이면서 산도는 완만하게 증가하여 0.36%에서 0.57%까지 증가하면서 저장온도, 저장기간에 따라 변화가 다르게 나타남을 보였다(Oh 등 2003).

2. 총 균수 및 유산균 수의 변화

다섯 종류의 김치시료를 4주간 5°C에서 발효하면서 총균(총 세균, 호기성균)수 변화를 살펴보았다(Fig. 2A). 담금 직후에 5 종류 김치 시료의 총 균수는 모두 10⁵ CFU/mL로

비슷하게 나타났다.

그러나, 5종류 김치 시료 모두 시간이 경과하면서 총 균수가 점차 증가하여 4주차에는 KB 김치 5.9×10⁵ CFU/mL, KT 김치 1.8×10⁶ CFU/mL, T₁B₁ 김치 1.0×10⁷ CFU/mL, T₄B₁ 김치는 1.4×10⁷ CFU/mL, T 김치는 1.6×10⁷ CFU/mL로 나타나 KB 김치가 가장 높게 나타났다. 총 균수의 변화가 비슷하게 진행되는 중에서도 T 김치는 KB, KT 김치에 비하여 가장 낮은 총 균수를 계속 유지하였다.

5종류의 김치시료를 4주간 5°C에서 발효하면서 유산균수 변화를 살펴보았다(Fig. 2B). 유산균도 시간이 경과하면서 모든 김치에서 증가하였다. 담금 직후의 유산균 수는 KB, KT 김치는 10⁵ CFU/mL, T₁B₁, T₄B₁, T 김치 10⁶ CFU/mL 정도로 비슷하게 나타났다. 발효 4주차에도 KB 김치 3.0×10⁷ CFU/mL, KT 김치 4.0×10⁷ CFU/mL, T₁B₁ 김치 3.4×10⁸ CFU/mL, T₄B₁ 김치 5.4×10⁸ CFU/mL, T 김치 7.5×10⁸ CFU/mL로 나타나 T 김치에서 유산균의 수가 가장 많이 나타났다. T 김치는 부패 유도성 총 균수는 가장 적은 수준을 유지하였고, 유산균수는 발효가 많이 진행되지 않은 초기상태에서도 발효가 진행된 김치와 비슷한 수준의 수치로 높게 나타내면서 김치가 발효 적정 조건이 형성됨에 따라 유산균의 증식을 증가한 것으로 보인다.

순무김치 숙성 중 유산균 수의 변화를 본 Kim MR(2000)의 연구에서는 숙성초기에는 유산균 수가 적순무김치와 청순무김치가 비슷하였으나 숙성 15일 이후 상승하여 30일에 최고에 달하였고 그 이후 서서히 감소함에 본 연구에서의 4주째 급격하게 상승하는 결과와 흡사하였다. 유산균의 상승하는 시점은 산도의 변화와도 밀접하게 관련이 되는데 발효

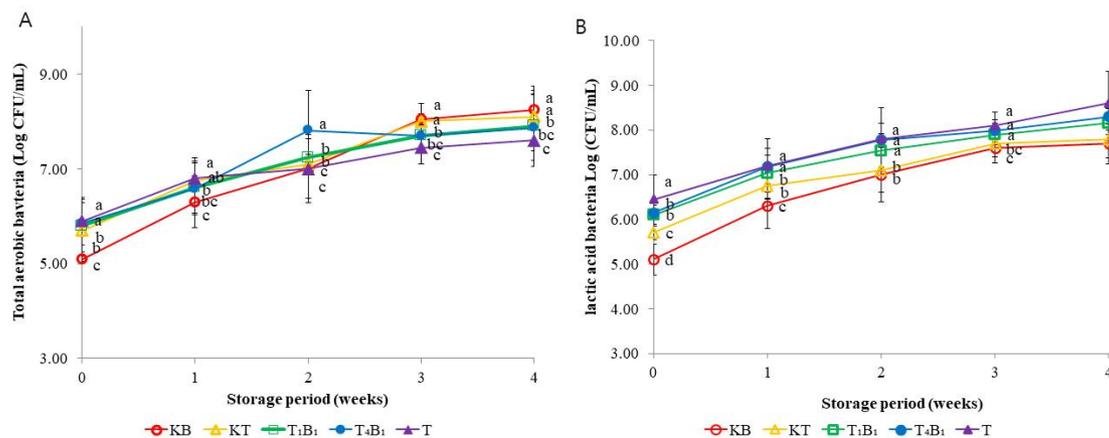


Fig. 2. Changes in (A) total aerobic bacteria, (B) lactic acid bacteria of various kinds of kimchi during fermentation at 5°C. KB: Kanghwa Baek kimchi, KT: Kangwha Turnip kimchi, T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T₄B₁: Turnip:Chinese cabbage=4:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi. ^{a-d}Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

숙성 초기에는 비휘발성 유기산이 생성되고 발효숙성 후기에는 lactic acid, pyroglutamic acid, succinic acid만이 잔존하면서 발효숙성이 되면서 맛이 좋아지는 시점에 lactic acid 함량이 높아진다고 하였다(Kim 등 1998a). 순무동치미 숙성 과정 중 유산균 수의 변화 연구에서는 숙성 10일 이후부터 유산균 수는 증가하여 숙성 40일에 최고치에 도달 후 서서히 감소하여 발효숙성이 되면서 유산균의 함량이 증가하는 연구와 유사한 결과를 보였다(Oh 등 2003). 이화학적 특성, 총 균 수 및 유산균 수 결과를 바탕으로 순무의 함량이 많으면 효능이 뛰어난 점을 고려하여 T₁B₁ 김치, KB 김치, T 김치 세 종류로 암세포 성장 저해효능을 세포실험으로 진행하였다.

3. 암세포 성장 저해 효과

암세포 성장 저해를 보기위한 MTT assay는 생존한 암세포의 효소작용에 MTT가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 변화 정도를 흡광도로 측정하여 암세포의 사멸 혹은 증식 억제 정도를 확인하는 방법이다.

AGS 인체 위암세포를 이용하여 세 종류의 김치(KB 김치, T₁B₁ 김치, T 김치) 즉 순무의 비율을 0%, 50%, 100%로 달리하여 제조한 물김치의 *in vitro* 항암 효과를 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 처리농도 2,000 µg/mL에서 KB 김치 56.37±5.52%, T₁B₁ 김치 72.92±0.29%, T 김치 70.81±1.62%로 나타내면서 순무의 비율이 증가함에 따라 암세포 성장 저해 효과 값이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 T₁B₁ 김치에서 세포에 처리하는 농도 250 µg/mL에서 45.06±2.92%, 1,000 µg/mL에서 66.18±0.80%, 2,000 µg/mL에서 72.92±0.29%로 세포에 처리하는 농도가 증가할수록 암세포 성장 저해 효과가 증가하는 것으로 나타났다.

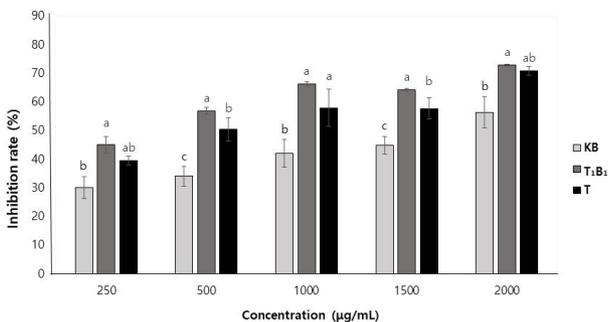


Fig. 3. Analysis of cell growth inhibition rate in AGS human stomach cancer cells. KB: Kanghwa Baek kimchi. T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi. ^{a-c}Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

순무는 disulfide, sulforaphane을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, 이는 위암과 위궤양 등 위장 질환을 일으키는 헬리코박터균을 파괴하는 것으로 알려져 있다(Haristoy 등 2003). 다양한 채소 추출물의 isothiocyanates 함량을 GC/MS 분석 결과 순무는 13.7%(area%)인데 반하여 배추에는 6.4%로 나타났으며 sulfides 함량도 순무가 배추보다 20배 이상 높게 나타났고 indole 함량은 비슷하였다(Kim 등 1997). 또한, 다양한 김치추출물의 sulforaphane 함량 분석 결과 순무김치가 일반 김치보다 함량이 높게 나옴을 볼 수 있었고 dimethyl trisulfide 함량도 순무김치가 더 높게 나온 결과(Kim 등 1998b)를 바탕으로 순무로 담근 김치는 높은 sulforaphane, isothiocyanates 및 sulfide 함량을 지니고 있음을 보였다. 국내 지역 특산품인 강화순무는 일반 무와 달리 적자색뿌리이고 매운맛은 적으나 특유의 알싸한 맛을 지니고 있는데 이는 isothiocyanate와 indol 성분에 의한 것으로 다양한 생리활성 및 항암효능이 보고되고 있고 특히 안토시아닌을 다량 함유하고 있어서 항암기능 및 생리활성 증진효과를 가지고 있다고 보고되고 있다(Kim 등 2006). 또한, 브로콜리와 브로콜리 새싹에서 glucosinolate 전구체 형태로 풍부한 isothiocyanate인 sulforaphane이 시험관 내에서 세포의 및 세포내 *H. pylori* (*Helicobacter pylori*)에 대한 강력한 항균제 역할을 한다는 보고가 있었다(Fahey 등 2002). 헬리코박터 감염을 억제하고 위종양 형성을 차단하는 sulforaphane의 효과 실험은 인간의 위암에 대한 식이 기반을 제공할 수 있으리라 기대해본다.

유황처리 열무로 만든 열무김치는 일반 열무김치에 함유된 isothiocyanate 등을 더 많이 함유하고 있으며 그중 sulforaphane 같은 유황배당체는 인체 위암세포의 성장을 억제하였고(Kong 등 2006) 동물의 간, 소장, 신장 등에서 항암작용을 나타내었다(Kim MR 1998). 또한 순무의 isothiocyanate들이 항암효과 및 알코올 분해능력이 있는 것으로 널리 알려져 있다(Kim 등 2006). 이상과 같이 순무에 함유된 dimethyl disulfide, sulforaphane 등이 위암세포의 암세포 성장 억제효과를 하는 것으로 본다.

4. RT-qPCR을 이용한 AGS 세포 내 mRNA 발현 측정

Caspase 3 및 caspase 9은 Bcl-2군에 의해 조절되는 전형적인 apoptosis(세포사멸) 유도 인자로 알려져 있다(Ghavami 등 2009). 세포사멸은 유전자에 의해 제어되는 세포 사멸의 한 형태로, 비정상 세포, 손상 세포 및 노화 세포는 이러한 현상으로 인해 스스로 사멸된다(Elmore S 2007). 암은 정상적인 세포와 달리 세포의 분열과 성장이 비정상적으로 높고 세포 사멸이 제대로 수행되지 않아 발생하게 된다(Norbury & Hickson 2001). 그러므로 암세포의 세포사멸을 활성화시키는 것은 암의 발달과 증식을 막는 효과적인 방법이라고

할 수 있다(Elmore S 2007). 그러한 의미에서 AGS 인체 위암 세포에서 apoptosis 관련 유전자인 caspase 3 및 caspase 9의 mRNA 발현 수준을 확인하였다(Fig. 4). 이들 apoptosis 관련 모든 유전자에서 대조군에 비해 세 종류의 김치(KB 김치, T₁B₁ 김치, T 김치) 처리한 군에서 높은 caspase 3 및 caspase 9의 mRNA 유전자 발현 수준을 보였다. 순무함량이 다른 비교는 Con군에 비하여 순무로만 물김치를 제조한 그룹인 T 그룹에서 3-4배 높은 발현을 보였다. KB 그룹과 비교하더라도 T 그룹이 caspase 3의 경우 3.5배, caspase 9은 2.9배 유의적으로 높은 유전자 발현을 보였으며($p < 0.05$), T₁B₁에 비해서도 T 그룹에서 각 유전자의 mRNA 발현이 1.7배 증가한 것을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 4). Jeong 등(2015)의 연구에 따르면 김치는 RGM-1 위점막 정상세포에서는 세포독성이 나타나지 않았지만 AGS 인체 위암세포에서는 세포독성이 높게 나타났으며 암세포의 apoptosis 발현을 증가시켰다고 보고하였다. 특수조제된 김치의 항산화, 항염 및 항돌연변이 활성에 의하여 H. pylori-위축성위염을 완화시키는 효과는 본 연구의 순무의 함량이 증가할수록 AGS 인체 위암 세포에서 apoptosis 관련 유전자의 발현 증가와 흡사하였음에 순무의 항염증 및 인체위암세포에서의 종양형성을 억제할 수 있는 예방적으로 효과적인 방법으로 사료된다.

5. Western blot을 이용한 AGS 세포 내 단백질 발현 측정

AGS 인체 위암 세포의 단백질 발현 수준은 mRNA 발현 수준과 동일한 경향을 보여 주었다(Fig. 5). Apoptosis(세포사멸) 조절제에 의해 조절되는 caspase는 전구체인 pro-caspase 형태로 존재하며, apoptosis(세포사멸) 활성화 경로에 의해 자극되면 caspase로 분해되어 세포사멸을 유도한다(Elmore

S 2007; Ghavami 등 2009). 따라서, 분해된 형태의 caspase 3 및 caspase 9를 분석하면, 세포사멸의 활성화 수준을 확인할 수 있다.

결과를 보면 AGS 인체 위암 세포 caspase 3의 발현 양은 순무가 들어가지 않은 강화섬 백김치(KB)보다 순무가 들어간 T₁B₁과 T 그룹에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 특히, 순무만으로 제조한 T 그룹이 다른 그룹(Con: 1.2배, KB: 1.5배, T₁B₁: 1.3배)에 비해 유의적으로 높은 발현 양을 나타내었다($p < 0.05$). caspase 9 역시 T₁B₁과 T 그룹에서 발현양이 증가하였고, Con에 비하여 T 김치는 2배 및 T₁B₁ 김치는 1.8 배로 통계적으로 유의적으로 높은 발현 양을 관찰하였다($p < 0.05$). 이는 mRNA 발현과 유사한 경향을 나타내었고, 순무의 첨가량이 증가할수록 더 높은 항암효과를 나타내었는데, 순무 속 glucosinolate, sulforaphane, flavonoids, phenolics, indoles 등과 같은 기능성 물질에 의한 생리활성이라고 볼 수 있으며 관련이 있는 것으로 보인다(Haristoy 등 2003; Paul 등 2019). 특히, 항암효과를 나타내는 것은 Paul 등(2019)은 순무의 2-phenylethyl isothiocyanate, phenylpropionitrile, brassicaphenanthrene A, 6-paradol, and trans-6-shogaol이 중요한 생리활성을 보이는 것으로 본다고 하였다.

AGS 인체 위암 세포의 *in vitro* 항암효과 측정 결과 T, T₁B₁, KB 김치 순으로 높은 항암효과를 보였으며 T 김치를 처리한 AGS 인체 위암 세포에서 caspase 3와 caspase 9의 mRNA와 단백질 발현이 증가하여 암 발생을 억제하는 효과를 보였다. 항암김치를 제조하기 위해서는 순무의 효과가 중요하다고 생각된다. 순무와 배추의 조합에 의하여 맛도 향상시키며 항암효과가 좋은 김치를 제조하는 것도 중요하지만 딱딱한 순무를 물김치처럼 조직이 딱딱하지 않고 사이

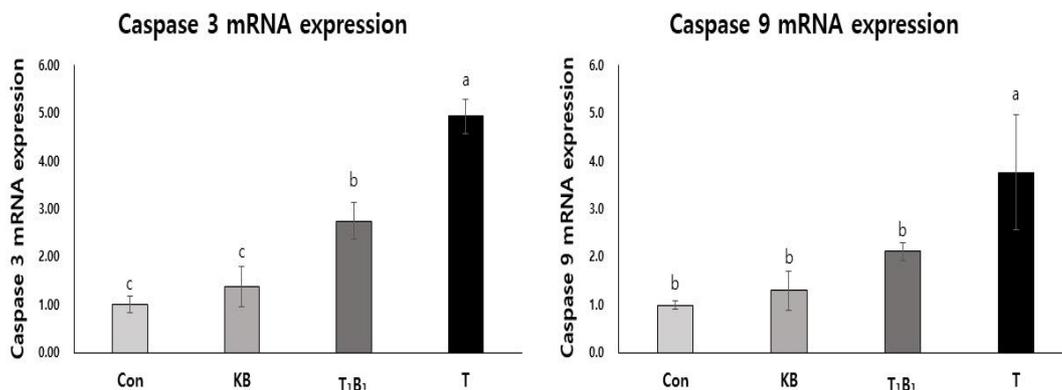


Fig. 4. mRNA expression levels of apoptosis related genes in the AGS human stomach cancer cells. KB: Kanghwa Baek kimchi. T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi. ^{a-c}Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

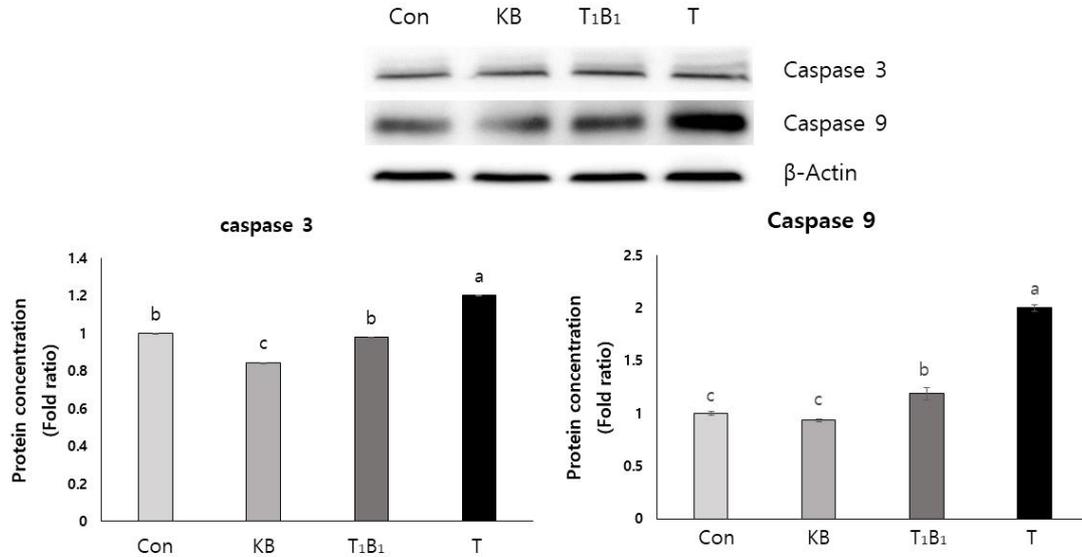


Fig. 5. Protein expression levels of apoptosis related protein in the AGS human stomach cancer cells. KB: Kanghai Baek kimchi. T₁B₁: Turnip:Chinese cabbage=1:1 Baek kimchi, T: Turnip mul kimchi. ^{a-c}Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests.

즈를 작게하여 섭취하기에 용이하도록 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 김치의 품질 특성 비교는 재료를 달리 첨가한 김치 제조 후 5°C에서 4주간 저장하면서 염도, pH, 산도, 총 균수와 유산균수를 측정하였고 AGS 인체 위암 세포를 이용한 항암효과를 보았다. 다섯 가지 김치 샘플은 강화백김치(KB), 강화순무김치(KT), 순무:배추=1:1 백김치(T₁B₁), 순무:배추=4:1 백김치(T₄B₁), 순무물김치(T)로 하였다. 4주간 발효시킨 후 측정된 결과 5개 시료 중 T가 가장 우수한 발효 특성을 보였다. T는 총 호기성 세균 수의 비율이 낮은 반면 유산균의 수는 다른 샘플보다 높았다. AGS 세포 성장 억제 활성 분석에서 3가지 김치 샘플 모두 농도 의존적으로 세포 성장 억제를 보였다. 세포사멸 관련 인자의 mRNA 및 단백질 발현량은 T 김치가 다른 김치에 비해 AGS 인체 위암 세포에서 caspase-3 및 caspase-9의 mRNA 발현량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. T, T₁B₁, KB 김치 순으로 높은 항암효과를 보였다. 순무만으로 제조된 순무김치(T 김치)의 항암효과가 높게 나타난 것으로 보아 순무함량이 높을수록 항암효과가 높았다. 이러한 결과는 순무와 배추의 비율에 따라 pH, 산도, 유산균수, 항암효과 등 발효특성 변화가 있음을 알 수 있었다.

References

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. p.79. Association of Official Analytical Chemistry
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo [a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci* 99:7610-7615
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. 2009. Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes. *J Med Genet* 46:497-510
- Haristoy X, Angioi-Duprez K, Duprez A, Lozniewski A. 2003. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3982-3984
- Heo J. 1994. Donguibogam. pp.2697-2698. Yeogang
- Hwang KA, Hwang YJ, Hwang HJ, Kim YJ, Choe JS, Lee SH, Jang HH. 2020. Improvement effects of turnip extracts (*Brassica rapa* L.) on TNF- α induced vascular inflammation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49:134-140

- Jeong M, Park JM, Han YM, Park KY, Lee DH, Yoo JH, Cho JY, Hahm KB. 2015. Dietary prevention of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer with kimchi. *Oncotarget* 6:29513-29526
- Kang IH. 1991. History of Culture in Korea (II). p.197. Samyoungsa
- Kim DH, Kim JH, Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Chung HG, Kang HY, Lee HJ, Lee HY. 2006. Effects of alcohol oxidation of *Brassica rapa* L. extraction process in Kang-Hwa. *Korean J Med Crop Sci* 14:45-48
- Kim HY, Kil JH, Park KY. 2013. Comparing the properties and functionality of kimchi made with Korean or Japanese baechu cabbage and recipes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:520-526
- Kim HY. 2013. Fermentation properties and inhibitory effects of anticancer functional baechu kimchi on AOM/DSS induced colitis-associated colon cancer in Balb/c mice. Master's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Kim MR, Lee KJ, Kim HY, Kim JH, Kim YB, Sok DE. 1998b. Effect of various kimchi extracts on the hepatic glutathione S-transferase activity of mice. *Food Res Int* 31:389-394
- Kim MR, Lee KJ, Kim YB, Sok DE. 1997. Induction of hepatic glutathione S-transferase activity in mice administered with various vegetable extracts. *J Food Sci Nutr* 2:207-213
- Kim MR. 1998. The 8th symposium of Kimchi Research Institute, Pusan National University, 1998: Quality characteristics and management of Kimchi; Sulfur compounds and anti-carcinogenic enzyme-inducing effect of Kimchi main ingredient (cruciferous vegetables). *Res Bull Kimchi Sci Technol* 4:117-118
- Kim MR. 2000. Physicochemical and sensory properties of turnip kimchi during fermentation. *Korean J Soc Food Sci* 16:568-576
- Kim SD, Hawer WD, Jange MS. 1998a. Effect of fermentation temperature on the free sugar, organic acid and volatile compounds of Kakdugi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:16-23
- Kim SH, Kim JH, Eom SA, Han YS, Heo MJ. 2018. Effect of aronia, beet and prickly pear powder on the quality characteristics and antioxidant activities of turnip mul-kimchi. *Korean J Food Cookery Sci* 34:287-294
- Kim YJ. 2000. Physiological function of turnip and turnip kimchi. *Korea Food Research Institute*. Report No. TRKO 200200052102
- Kong CS, Bak SS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2006. Fermentation properties of young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil containing sulfur and its inhibitory effect on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:158-163
- Ku KU, Kang KO, Kim WJ. 1988. Some quality change during fermentation of kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 20: 476-482
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 20:102-109
- Lee DS, Cheigh HS, Park WS. 1999. Analysis of variables influencing the pressure build-up and volume expansion kimchi package. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:429-437
- Lee HJ, Oh SD. 2002. Properties changes of Korea turnip dongchimi inoculated with *Leuconostoc citreum* IH22 during fermentation. *Korean J Food Nutr* 15:70-76
- Lee JH. 2008. Kimchi from Korean traditional food to global food. *Food Sci Ind* 41:23-27
- Moon SK, Ryu HS. 1997. Changes in physicochemical properties of baik-kimchi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:1013-1020
- Moon SK, Suzuki T, Jeong BY, Ryu HS. 2001 Inhibitive effects of baik-Kimchi against amaranth toxicity in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30:1246-1252
- Norbury CJ, Hickson ID. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401
- Oh SH, Yoon YM, Lee SK, Sung JH, Kim MR. 2003. Physicochemical and sensory properties of turnip dongchimi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 167-174
- Oh YJ, Hong J. 2020. Changes in the quality characteristics of kimchi broths and growth of the isolated strains due to blue light emitting diode irradiation. *Korean J Food Sci Technol* 52:538-545
- Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily JW 3rd. 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* 17:6-20
- Park KY, Ju J. 2018. Kimchi and its health benefits. In Park KY, Kwon DY, Lee KW, Park S (Eds.), *Korean Functional Foods: Composition, Processing and Health Benefits*. pp.63-98. CRC Press

- Park YH, Park SH, Lee JH, Jo JS. 2003. Effects of beef bone extracts on quality of baik-kimchi. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 19:188-194
- Park YK, Kim HM, Park MW, Kim SR, Choi IW. 1999. Physicochemical and functional properties of turnip. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:333-341
- Paul S, Geng CA, Yang TH, Yang YP, Chen JJ. 2019. Phytochemical and health-beneficial progress of turnip (*Brassica rapa*). *J Food Sci* 84:19-30
- Rhee YH, Lee EO, Park SY, Lee HJ, Yoon BS, Kim JH, Kim SH. 2005. Effect of *Brassica rapa* L. extracts and β -sitosterol on hyperlipidemic rats. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 19:1528-1533
- Shim ST, Kyung KH, Yoo YJ. 1990. Lactic acid bacteria isolated from fermenting kimchi and their fermentation of Chinese cabbage juice. *Korean J Food Sci Technol* 22:373-379
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112
- So MH, Kim YB. 1997. Isolation and identification of major microbial groups during Baikkimchi fermentation. *Korean J Food Nutr* 10:350-359
- Son EJ, Oh SH, Heo OS, Kim MR. 2003. Physicochemical and sensory characteristics of turnip pickle added with chitosan during storage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:1302-1309
- Song GH, Park ES, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2017. An atopic preventive drink (APD) reduces Th2 cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells. *CELLMED* 7:15.1-15.6
- Song JL. 2012. Anticancer effects of fermented sesame sauce. Ph.D. Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea
- Yoon JY, Jung KO, Kim SH, Park KY. 2004. Antiobesity effect of baek-kimchi (whitish baechu kimchl) in rats fed high fat diet. *J Food Sci Nutr* 9:259-264
- Zhao X, Kim SY, Park KY. 2013. Bamboo salt has *in vitro* anticancer activity in HCT-116 cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo*. *J Med Food* 16:9-1

Received 12 March, 2022

Revised 30 March, 2022

Accepted 06 April, 2022