

최 종  
연구보고서

기능성 열무김치 세계일류  
상품화 기술 개발

Development of Commercialization Technologies for  
Functional Yeol Mu(Young Radish) Kimchi to  
World-wide Products

연구기관  
경상남도농업기술원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 열무김치 세계일류 상품화 기술 개발” 과제 (세부과제 “기능성 열무 생산기술 연구”, “유용물질 탐색 및 추출”, “기능성 열무를 이용한 김치제조 기술개발 및 상품화 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 경남농업기술원

총괄연구책임자 : 노 치 응

세부연구책임자 : 노 치 응

연 구 원 : 김 수 경

연 구 원 : 최 경 락

연 구 원 : 황 해 준

연 구 원 : 이 상 대

연 구 원 : 이 영 한

연 구 원 : 이 성 태

연 구 원 : 김 낙 구

협동연구기관명 : 울산대학교

협동연구책임자 : 최 혜 선

연 구 원 : 박 민

위탁연구기관명 : 부산대학교

위탁연구책임자 : 박 건 영

연 구 원 : 공 창 숙

연 구 원 : 박 순 선

연 구 원 : 정 혜 경

# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 열무김치 세계일류 상품화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 과제는 기능성 물질을 함유한 열무의 새로운 재배기술 개발로 신수출작목의 육성  
성과 함께 농가소득을 증대코자 함에 있다. 또한 생리활성물질의 농도를 높인 열무의  
재배기술연구 및 유용한 기능성 성분의 분석을 통하여 그 작용의 메커니즘을 구명하고  
부가가치가 높은 가공품의 산업화로 한국 고유의 수출품으로 개발하여 국민건강 증진과  
함께 세계시장 공략을 위한 새로운 상품으로 육성하여 김치산업세계화에 의한 수출농업  
발전에 이바지하고자 한다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 1) 기술적 측면

- Codex에서 인증된 우리나라의 김치는 세계화의 기틀을 마련하였으나 가공기술에 의한  
기능성 부여에는 한계가 있어 우리 고유의 토양 환경과 재배기술에 의한 기능성 김치원료  
생산기술 개발로 우리 김치의 세계적 브랜드화가 필요하다.
- 국내시설재배 면적의 과다에 따른 국제화 대체작목의 개발이 필요하다.
- 기능성 물질을 함유한 채소 생산을 위해서는 시장성, 재배의 용이성, 재료의 저가 및  
구입의 편리성 등을 고려할 때 기능성 열무에 의한 가공품의 생산은 구비조건을  
충족하고 있어 산업화의 경우 고도의 우위성을 확보할 수 있다.
- 열무는 배추과에 속하는 야채로 북반구의 온대와 난대에 퍼져있고 우리나라에서는  
15속 45종, 15개의 변종이 자란다. 이 과의 식물들은 물분해에 의해 시니그린,  
시날빈, sulforaphane 같은 유황배당체를 가지고 있고 불포화락톤고리가 있는  
steroid 골격의 화합물인 강심배당체를 가진 것도 있다. 배당체는 알콜성, 페놀성

수산기를 가진 물질이 유리상태에 있지 않고 한 개 또는 몇 개의 당과 아세탈 형태로 결합되어 물분해에 의해 당과 비당부분으로 분해되고 비당부분의 종류에 따라 여러 형태로 나누어져 있다.

- 열무는 민간요법으로 원기를 돋우는 보양제로 신체허약, 고혈압, 신경통, 시력부족에 탁월한 효과가 있고 오래 복용시 시력, 청각, 기억력도 크게 향상된다고 알려져 있다.
- 지구상에 존재하는 30만종의 고등식물 가운데 4만여 종은 약용으로 알려져 있다. 이 가운데 1만여종의 약용식물이 전통의약품으로 사용되고 있으나 현대과학에 의해 체계적으로 연구된 약초는 불과 500여종에 불과한데 지난 10여년간 발견된 항암제의 45%가 이런 천연약물연구에서 탄생했다는 점은 이 분야의 가능성을 여실히 보여주고 있다.

## 2) 경제·산업적 측면

- 세계 시장에서의 기능성 채소 및 가공품의 수요가 급속한 증가 추세에 있으므로 이에 대한 연구가 필요하며 한국고유의 고기능성 김치 등 가공식품개발은 기능성 야채생산 분야의 세계적인 혁명의 초석이 될 것이다.
- 가공품의 원료인 채소의 기능성 다함유 재배를 위한 연구는 동서양을 막론하고 자연상태에서의 유용성분으로 그 안정성이 확인되어 있으므로 민간대체의학으로 활용되고 있는데 이를 과학화·산업화하는 연구가 시급한 실정이다.
- 특수 유용성분을 다 함유한 채소의 생산과 가공품의 개발에 의한 산업화는 농산물의 수출경쟁력을 높이는데 대단히 중요하다.
- 한국 열무는 농경전통 사회에서부터 식이섬유의 공급원이었고 비타민C의 양이 많아 영양의 공급원으로서도 중요한 산업으로 유용성분추출 및 가공품이 개발될 경우 타 산업에 파급효과가 매우 클 것이다.

## 3) 사회·문화적 측면

- 열무를 일반야채에서 고기능성 건강식품으로의 소비확대와 신 수출시장 개척을 위한 과학적 접근은 대단히 중요하며 고기능성 열무에 의한 국민건강증진 기여도는 아주 클 것이다.
- 미국은 고비용의 질병치료보다 질병예방에 초점을 맞춘 ‘건강보조식품 건강교육법 (Dietary Supplements Health & Education Act)’을 제정(1994년) 후 세계적으로 천연약물을 활용한 생명과학에 관심을 기울이고 있다. 우리나라도 한국자생 식물의 다양성 확보와 신소재 개발을 위한 ‘건강식품법’이 제정되어 시행되고 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 기능성 열무의 생산기술을 연구하고 유용물질을 탐색 및 추출하며, 이 열무를 이용한 김치제조 기술개발을 위해 수행되었다. 이를 위해 유향처리 함량에 따른 열무의 생육반응을 탐색하고 재배시기별 생산성 및 유용성분 차이를 검정하였으며, 생산현장 실증시험을 통한 생산기술을 확보하였다. 또 다양한 처리에 따른 열무의 이화학적 특성을 조사하고 유용물질을 추출하여 *in vivo* 활성을 평가하였다. 생산된 기능성열무로 열무김치를 제조하고 기능성을 측정하였으며 세계적인 상품화를 위한 열무김치제조 표준화연구를 병행하여 수행하였다.

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 기능성이 향상된 열무재배기술은 먼저 개별 농가단위에 지도 활용하여 재배를 추진하고, 작목반이나 생산자 단체와 동시에 김치 수출업체의 육성을 추진하여, 장기적으로 볼 때 친환경 기능성 김치소재 단지가 조성되어 우리나라가 기능성 김치의 세계적 브랜드의 중심이 될 수 있을 것으로 기대한다.

여기서 개발된 생산 또는 기능성과 관련된 각종 기술자료들이 소비자들에게 적극적으로 홍보된다면 생산농가에게는 소비확대에 따른 안정적인 소득증대를 줄 수 있을 것이다.

또한 기능성 열무를 이용한 표준화된 김치제조법은 산업재산권(특허)을 출원하여 법률적 권리를 확보하는 동시에 필요한 가공농가나 기업체에 보급하여 상품화 지원을 할 예정이며, 새로운 수출품목으로서의 확고한 지위확보를 위해 미국 FDA 승인을 추진함으로써 수출길을 확대하는 것이 좋을 것으로 생각한다.

## SUMMARY

### I. Title

Development of Commercialization Technologies for Functional Yeol Mu(Young Radish) Kimchi to World-wide Products

### II. Results and discussion

Yeol Mu(Young radishes) were cultivated in the yellow soil with 1,818 g/m<sup>3</sup> sulfur, 1,818 g/m<sup>3</sup> sulfur + 2 cm soil covering, and in normal soil for control. There were differences of leaf number and plant height by treatments. Yeol Mu cultivated in the yellow soil with sulfur showed lower growth and development, compared with control, the yield of that were 75% against control. But It seemed to be improved with proper temperature and water control. Upon investigation by interview, most of the young radish have been cultivated from the greenhouse which was less than 1ha and shipped to Department store or large discount store. Judging from the acute oral toxicity test, there were no treatment-related effects on mortality, gross finding and so forth in ICR mice treated with a single oral dose of kimchi made from Yeol Mu cultivated with sulfur.

When Yeol Mu was sowed seeding in the yellow soil with sulfur in spring, summer and autumn, germination percentage was similar in each soil treatment, but showed lower level in autumn. This reason would be that temperature which gives the biggest effect in germination was lowest in autumn.

In demonstration at farmers field cultivation, Yeol Mu seed was purchased in the market. The seed size and the shape of the young radish were different in seed company. so the required seed quantity was different.

Germination percentage at 10th day after sowing was 87.6~100% in cultivar, and leaf number or plant height was different in growth, also. the yield of Yeol Mu was highest in cultivar C that is 2,669kg/10a , but statistical significantly different was not found in each variety.

The content of each sample's water, protein, lipid and ash were 89.5~95.2,

1.1~2.7, 0~0.4 and 1.1~1.9% respectively, and Mineral contents were different in the dried sample.

Young radishes which were grown in the soil containing sulfur increased quinine reductase (QR) activity in Hepa 1c1c cells and isothiocyanate-like compound analyzed by HPLC. QR inducing activity was maximum in young radishes grown with 1,818 g/m<sup>3</sup>sulfur and was decreased when the soil was neutralized with lime mortar in order to improve recovery. These results have suggested that consumption of young radishes, especially grown in the presence of sulfur, would prevent from cancer incidence through inducing detoxification enzymes and could have therapeutic effects for chemoprevention. The oral administration of extracts of young radishes cultivated with sulfur after intravenous tumor cell injection achieved a marked reduction of pulmonary colonization in mice. Treatment of the mice with extracts of young radish cultivated with sulfur did not show any increase in the number of CD8<sup>+</sup> or NK T cells in the spleen, indicating no influence on host immunity. Sulforaphane, which could be a candidate for an active compound from young radishes cultivated with sulfur, inhibited cell growth of B16-F10 melanoma cells. In addition, extracts of the young radish cultivated with sulfur-fed group showed enhanced quinine reductase (QR) activities in the liver and lung and a slight increase of glutathione S-transferase (GST) activity in the liver. These results have suggest that the administration of extracts of young radishes cultivated with sulfur suppressed pulmonary tumorigenesis, possibly due to increased the activity of detoxification enzymes in the liver and lung and partly due to cell cytotoxicity. The oral administration of extracts of young radishes cultivated with sulfur after subcutaneous CT26 tumor cell injection achieved a marked reduction of tumor size in mice. However, no effect were observed with extracts of fermented pickle using young radishes cultivated with sulfur in both murine models.

Manufacturing method and ingredient ratios for young radish(YR) kimchi and young radish mul(YRW) kimchi were standardized from literatures. Fermentation properties and *in vitro* anticancer effects of YR kimchi and YRW kimchi were investigated during fermentation at 5°C. Ingredients having frequency of use greater than 50% were only used in the standardization process. Green onion, red pepper, red pepper powder, garlic, ginger, and anchovy juice were included in YR

kimchi. Green pepper, red pepper, garlic, ginger, and starch were included in YRW kimchi. Standardized ingredients ratio of YR kimchi on young radish 100 g was as follows: green onion 8.0±3.8 g, crushed garlic 2.9±1.3 g, crushed ginger 1.6±0.7 g, red pepper 7.0±1.7 g, red pepper powder 4.2±1.2 g, and anchovy juice 3.7±0.5 g. Standardized ingredients ratio of YRW kimchi on added water 100 was as follows: young radish 50.6±10.8 g, crushed garlic 3.0±0.7 g, crushed ginger 1.5±0 g, green onion 3.3±1.3 g, green pepper 3.3±1.9 g, red pepper 2.4±1.3 g, and starch 1.5±0.6 g. Fermentation of YR kimchi during 2-3 weeks led to the decrease of pH down to pH 4.3, the increased acidity, and the highest *Leuconostoc* sp. counts. YR kimchi showed the acidity of 1.04-1.27% at the pH 4.3, when the kimchi was ripened properly. Fermentation of YRW kimchi during 9 days led to the decrease of pH down to pH 4.3 and the acidity of 0.20%. Inhibitory effects of YR kimchi and YRW kimchi juices on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in MTT assay were increased with the added concentration. On considering of moisture contents, YR kimchi might be showed similar inhibitory effects on the growth of AGS human gastric and HT-29 human colon adenocarcinoma cells in MTT assay to YRW kimchi, which the inhibition rates were greater than 50%. YR kimchi juice showed a higher inhibitory effect on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells than that of Bae Chu(Korean chinese cabbage) kimchi at same concentration. That is, YR kimchi and Bae Chu kimchi juices indicated inhibition rates of 50% and 58%, respectively.

Young radishes (YR, Yeol Mu) were cultivated in the soil with and without sulfur. YR-control, YR-A and YR-B samples were grown in the soil without sulfur, with 1,818 g/m<sup>3</sup> sulfur and 1,818 g/m<sup>3</sup> sulfur + soil 2 cm, respectively. YR kimchies were prepared using YR-control, YR-A and YR-B. Fermentation properties of the YR-kimchis were investigated during fermentation at 5°C for 8 weeks. *In vitro* growth inhibitory effects of YR samples and YR-kimchis were also investigated in HT-29 human colon and AGS human gastric adenocarcinoma cells. *In vivo* antitumor effects of methanol extracts from the young radish kimchies were investigated in sarcoma-180 cell transplanted mice. Juices from YR-A and YR-B showed higher growth inhibitory effects in AGS human gastric and HT-29 human colon adenocarcinoma cells than the juice from YR-control at the same concentration. The inhibitory effect of YR-A was similar to that of the YR-B. YR kimchis after 4-5 weeks at 5°C showed higher acidity of 0.88-1.20% with pH 4.3-4.5 and the kimchis kept approximately pH 4.0 until 8 weeks. The



kimchi-A and kimchi-B showed faster fermentation time, higher levels of *Leuconostoc* sp. and lower of *Lactobacillus* sp. during the fermentation, comparing to the control kimchi. The YR-A and YR-B juices exhibited higher inhibitory effects(88% and 87%) on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells than that of the control kimchi(59%) at the higher concentration of 20  $\mu\text{l}$ /assay. The YR-A and YR-B juices also exhibited higher inhibitory effects(74%) on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells than that of the control kimchi(57%) at the higher concentration of 20  $\mu\text{l}$ /assay. Methanol extracts from the kimchies also led to the similar results to the those of the juices. Young radish kimchis inhibited the growth of cells in a concentration and time dependent manner. YR-A induced apoptosis as determined by DAPI staining and showed the increased Bax and decreased Bcl-2 in expression of active anticancer compounds, comparing to control kimchi. These results suggested that preparing of kimchi using differently cultivated YR especially in the presence of sulfur, which can help to synthesize sulfur-containing compounds, could increase the anticancer effect *in vitro*. Methanol extracts from the young radish kimchies were investigated in sarcoma-180 cell transplanted mice. The solid tumor growth was inhibited most effectively by the kimchi prepared using young radish grown in the soil with sulfur, especially YR-B. The treatment of the methanol extracts from YR-A and YR-B induced the high glutathione S-transferase (GST) activities and glutathione contents, comparing to control kimchi. These results suggested that the antitumor effects of young radish kimchi might be enhanced by using young radish cultivated in the presence of sulfur, which can help to produce sulfur-containing compounds in young radish. In order to investigate effect of the Yeol Mu cultivated in the sulfur containing soil on a texture and taste of kimchi, Yeol Mu kimchi with different ingredients and grades were prepared. The effects were determined from the results of sensory evaluation test. From the results of sensory evaluation test, increased ingredients content induced the good acceptability as kimchi and anticancer effects. Therefore, since kimchi added total ingredients in ratios of 1:1.5 improved the functional properties and tastes of kimchi, it is possible to develop manufacturing method of Yeol Mu kimchi with improved functionality and good taste.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	19
Section 1 Subject and contents .....	19
Chapter 2. Present Condition of Technical Development .....	21
Chapter 3. Contents and Results of Research .....	22
Section 1 Study for production of functional Yeol Mu(Young radishes) .....	22
1. Methods and plan .....	22
1-1 Growth reaction in Yeol Mu cultivated in different methods and sulfur content ..	22
1-2 Yield test in different growing season .....	24
1-3 Demonstration at farmers field cultivation .....	24
2. Result and discussion .....	25
1-1 Growth reaction in Yeol Mu cultivated in different methods and sulfur content ·	25
1) Germination rate .....	25
2) Physical and chemical properties of bed soil .....	25
3) Mineral contents of plant .....	26
4) Changes of plant height and leaf number .....	26
5) Growth and yield .....	27
6) Investigation for young radish cultivation farmhouse .....	28
7) Acute oral toxicity in mice .....	30
1-2 Yield test in different growing season .....	32
1) Germination percentage .....	32
2) Physical and chemical properties of bed soil .....	32
3) Mineral contents of plant .....	33
4) Leaf number in different growing season with soil condition .....	33
5) Growth and yield .....	35
1-3 Demonstration at farmers field cultivation .....	36
1) Required seed quantity in different cultivars .....	36
2) Physical and chemical properties of soil .....	36
3) Growth in different cultivars .....	36

4) Growth and yield at harvest .....	37
5) Yield trials at farmers field .....	38
6) Proximate composition in different cultivars .....	39
Section 2 Search and extraction of available ingredients .....	41
1. Methods and plan .....	41
1-1 Physical and chemical properties and search for available ingredients in Yeol Mu cultivated by different sulfur content .....	41
2. Results and discussion .....	42
1-1 Physical and chemical properties and search for available ingredients of Yeol Mu cultivated in different sulfur content soil .....	42
1) Quinone reductase(QR) inducing activity of Yeol Mu cultivated in different sulfur content soil .....	42
2) QR inducing activity of Yeol Mu cultivated by different growing season .....	45
3) QR inducing activity of Yeol Mu varieties .....	47
4) Search for available ingredients of Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	47
5) Physical and chemical properties of Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	49
6) Effect of Yeol Mu extracts in mouse melanoma model .....	50
7) Effect of isothiocyante from Yeol Mu extracts .....	52
8) Effect of Yeol Mu extracts by long oral administration in mice .....	53
9) Effect of Yeol Mu extracts in CCl <sub>4</sub> -induced liver toxicity model .....	54
10) Effect of isothiocyante from Yeol Mu extracts .....	57
11) <i>In vivo</i> Activity of Yeol Mu kimchi in murine melanoma model .....	60
12) <i>In vivo</i> Activity of Yeol Mu kimchi in murine colon cancer model .....	63
13) <i>In vivo</i> Activity of Yeol Mu extracts in murine colon cancer model .....	66
14) Phase II enzyme induction in the liver by Yeol Mu extracts administration .....	67
Section 3 Studies on development of manufacturing method of Yeol Mu kimchi using functional Yeol Mu cultivated in the soil containing sulfur .....	69
Subsection 1 Standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi .....	69
1. Methods and plan .....	69
1-1. Proximate contents of Yeol Mu and standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi .....	69
1-2. Functional properties of Yeol Mu kimchi .....	70

2. Results and discussion .....	73
2-1. Standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi .....	73
1) Standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi and mul-kimchi ..	73
2) Changes in pH and acidity .....	75
3) Changes in <i>leuconostoc</i> sp. and <i>lactobacillus</i> sp. counts .....	77
2-2. Functional properties of Yeol Mu and Yeol Mu kimchi due to different cultural practice and sulfur content .....	79
1) Proximate contents of Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil	79
2) Cell growth inhibition effect of Yeol Mu and Yeol Mu kimchi .....	80
3) Changes in pH and acidity during fermentation .....	81
4) Changes in <i>leuconostoc</i> sp. and <i>lactobacillus</i> sp. counts of kimchi during fermentation .....	82
5) Antimutagenic effect of Yeol Mu and Yeol Mu kimchi .....	84
6) Anticancer effect of Yeol Mu .....	85
7) Anticancer effect of Yeol Mu kimchi .....	86
 Subsection 2 Development Processing method and products .....	89
1. Methods and plan .....	89
1-1. Standardization of manufacturing of Yeol Mu kimchi using Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	89
1-2. Functional properties of standardized Yeol Mu kimchi .....	90
1-3. <i>In vitro</i> anticancer effect of Yeol Mu kimchi due to the harvest period of Yeol Mu .....	91
1-4. <i>In vivo</i> anticancer effect of Yeol Mu kimchi due to the harvest period of Yeol Mu .....	92
2. Results and discussion .....	94
2-1. Standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi .....	94
1) Standardized manufacturing method of Yeol Mu kimchi and Yeol Mu mulkimchi ..	94
2-2. Fermentation properties of kimchi prepared using Yeol Mu harvested in summer ..	97
1) Changes in pH and acidity .....	97
2) Changes in <i>leuconostoc</i> sp. and <i>lactobacillus</i> sp. counts .....	100
2-3. Fermentation properties of kimchi prepared using Yeol Mu harvested in autumn .....	103
1) Changes in pH and acidity .....	103
2) Changes in <i>leuconostoc</i> sp. and <i>lactobacillus</i> sp. counts .....	106
2-4. <i>In vitro</i> anticancer effects of Yeol Mu kimchi prepared using	

functional Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	110
1) Antimutagenic effect of Yeol Mu kimchi .....	110
2) Anticancer effect of Yeol Mu kimchi prepared using Yeol Mu harvested in summer .....	111
3) Anticancer effect of Yeol Mu kimchi prepared using Yeol Mu harvested in autumn .....	114
2-5. <i>In vivo</i> anticancer effect of Yeol Mu kimchi prepared using functional Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	116
1) Antitumor activities of Yeol Mu kimchi .....	116
2) Changes in body weight and organ .....	116
3) GST activitiest .....	117
Subsection 3 Establishment of processing process for commercialization ·	118
1. Methods and plan .....	118
1-1. Manufacturing of Yeol Mu kimchi using functional Yeol Mu .....	118
1-2. Coloring matter and Vt C contents of functional Yeol Mu kimchi	119
1-3. Increased functional effect of Yeol Mu kimchi .....	119
1-4. <i>In vitro</i> anticancer effect of Yeol Mu kimchi due to the grades of Yeol Mu .....	121
2. Results and discussion .....	122
2-1. Development of sulfur treated Yeol Mu kimchi with the different ingredients .....	122
1) Manufacturing of sulfur treated Yeol Mu kimchi .....	122
2) Physico-chemical properties .....	123
3) QDA profile .....	125
4) Anticancer effect .....	127
2-2. Coloring matter and Vt C contents of functional Yeol Mu kimchi	131
1) Carotenoids content .....	131
2) Chlorophyll content .....	131
3) Vitamin C content .....	131
2-3. Propertoes of Yeol Mu kimchi due to the cultivar of Yeol Mu ·	132
1) Manufacturing of Yeol Mu kimchi .....	132
2) Physico-chemical properties .....	132
3) QDA profile .....	134
4) Anticancer effect with the different ingredient ratio .....	138
5) Anticancer effect with the different grades .....	142
2-4. <i>In vivo</i> anticancer effect of Yeol Mu kimchi prepared using	

functional Yeol Mu cultivated in sulfur containing soil .....	143
1) Viability and Antitumor activities of Yeol Mu kimchi .....	143
2) Changes in body weight and organ .....	145
3) GST and GSH activitiest .....	145
2-5. <i>In vitro</i> anticancer effects and induced apoptosis of Yeol Mu kimchi ·	147
1) Cell growth inhibition effect .....	147
2) Induction of apoptosis .....	148
3) Induction of Bcl-2 family .....	149
Chapter 5 Achievement and contribution for related field .....	151
Chapter 6. Application plan for the results .....	153
Chapter 7. Scientific information from abroad collected through the project ...	154
Chapter 8. References .....	155

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제1절	연구개발 목표와 내용	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	22
제1절	기능성 열무 생산기술 연구	22
1.	연구수행방법	22
가.	유황처리 함량 및 방법에 따른 생육반응 연구	22
나.	재배시기에 따른 생산성 검증	24
다.	생산현장 실증시험	24
2.	연구결과	25
가.	유황처리 함량 및 방법에 따른 생육반응 연구	25
1)	발아세	25
2)	상토 이화학적	25
3)	식물체 무기성분	26
4)	처리별 초장 및 엽수의 경시적 변화	26
5)	생육 및 수량	27
6)	열무재배 및 생산 실태조사	28
7)	마우스를 이용한 급성경구독성시험	30
나.	재배시기에 따른 생산성 검증	32
1)	발아율	32
2)	상토 이화학적	32
3)	식물체 무기성분	33
4)	재배시기 및 토양처리별 엽수	33
5)	생육 및 수량	35

다. 생산현장 실증시험 .....	36
1) 품종별 종자 소요량 .....	36
2) 재배지 토양특성 .....	36
3) 열무 품종에 따른 생육 .....	36
4) 수확시 품종별 생육 및 수량 .....	37
5) 농가 생산시험 .....	38
6) 열무 품종별 성분분석 .....	39
제2절 유용물질 탐색 및 추출 .....	41
1. 연구수행방법 .....	41
가. 유향처리 농도별 열무의 이화학적 특성 및 유용물질탐색 .....	41
1) 열무의 유효성분의 추출 .....	41
2) quinone reductase (QR)의 inducer potency .....	41
3) Isothiocyanate와 glucosinolate의 측정 .....	42
4) melanoma tumor development .....	42
2. 연구결과 .....	42
가. 유향처리 농도별 열무의 이화학적 특성 및 유용물질탐색 .....	42
1) 생육조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정 ..	42
2) 생육시기와 재배조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정 ·	45
3) 열무품종별과 재배조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정	47
4) 유향처리 열무에서 유용물질의 탐색 .....	47
5) 유향처리열무의 유용물질의 물리, 화학적 특성조사 .....	49
6) mouse melanoma model에서 열무추출액의 효과 .....	50
7) 열무추출액중의 active compound인 isothiocyante의 효과 :	
B16F10 melamoma cell에 대한 cytotoxicity .....	52
8) 쥐에 장기 투여시의 열무추출액의 효과 .....	53
9) CCl <sub>4</sub> -induced liver toxicity model에서 열무추출액의 효과 .....	54
10) 유향열무추출액중의 active compound인 isothiocyante의 효과 :	
과골세포분화 .....	57



11) 열무김치의 <i>in vivo</i> 활성 (murine melanoma model) .....	60
12) 열무김치의 <i>in vivo</i> 활성 (murine colon cancer model) .....	63
13) 유황열무추출액의 <i>in vivo</i> 활성 (murine colon cancer model) .....	66
14) 유황열무 <i>in vivo</i> 투여시 간에서 phase II enzyme 의 유도 .....	67
제3절 기능성 열무를 이용한 김치제조 기술개발 및 상품화 연구 .....	69
제1세부 열무김치 제조방법의 표준화	
1. 연구수행방법 .....	69
가. 열무의 영양성분 분석 및 열무김치 제조의 표준화 .....	69
나. 표준화 열무김치의 생리기능성 검증 .....	70
2. 연구결과 .....	73
가. 열무김치의 표준화 연구 .....	73
1) 문헌에 의한 열무김치 및 열무물김치의 표준화 .....	73
2) pH 및 산도의 변화 .....	75
3) 젖산균 수의 변화 .....	77
나. 유황처리 농도 및 방법별 열무김치 기능성 연구 .....	79
1) 기능성 열무의 일반 성분 분석 .....	79
2) 일반 열무, 열무김치, 열무물김치의 암세포의 성장 억제 효과 .....	80
3) 발효과정 중 기능성 열무물김치 pH 및 산도의 변화 .....	81
4) 발효과정 중 기능성 열무물김치의 젖산균 수의 변화 .....	82
5) 기능성 열무 및 열무물김치의 항돌연변이 효과 .....	84
6) 기능성 열무의 항암 효과 .....	85
7) 기능성 열무물김치의 항암 효과 .....	86
제2세부 가공방법 및 가공제품개발	
1. 연구수행방법 .....	89
가. 기능성 열무를 이용한 열무김치 및 열무물김치의 제조 표준화 .....	89
나. 표준화 열무김치의 생리기능성 검증 .....	90
다. 재배시기별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 및 열무물김치의 <i>in vitro</i> 의 항암효과검토 .....	91
라. 재배시기별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 및 열무물김치의 <i>in vivo</i> 항암효과검토 .....	92

2. 연구결과	94
가. 열무김치의 표준화 연구	94
1) 열무김치의 재료 배합비 및 제조 표준화	94
나. 여름에 파종한 열무로 제조한 기능성 열무김치 및 열무물김치의 발효 특성	97
1) pH 및 산도의 변화	97
2) 젖산균 수의 변화	100
다. 가을에 파종한 열무로 제조한 기능성 열무김치 및 열무물김치의 발효 특성	103
1) pH 및 산도의 변화	103
2) 젖산균 수의 변화	106
라. 유향 기능성 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 및 <i>in vitro</i> 항암 기능성 연구	110
1) 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 효과 및 항돌연변이 효과	110
2) 여름에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 항암효과	111
3) 가을에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 항암효과	114
마. 유향 기능성 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 및 <i>in vivo</i> 항암 기능성 연구	116
1) 열무김치 및 열무물김치의 세포독성 및 고형암 성장 저지 효과	116
2) 열무김치 및 열무물김치의 마우스의 장기무게 변화	116
3) 열무김치 및 열무물김치의 Glutathione S-transferase (GST) 활성	117
제3세부 가공 공정 확립 및 산업화 제품 개발	118
1. 연구수행방법	118
가. 기능성 열무를 이용한 열무김치의 제조	118
나. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 색소 및 비타민 C 함량	119
다. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 기능성 증진효과	119
라. 품종별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 <i>in vitro</i> 의 항암효과검토 (MTT test, cell growth inhibition test)	121
2. 연구결과	122
가. 부재료 배합에 따른 유향처리 열무김치의 개발	122
1) 유향처리 열무김치의 제조 연구	122
2) 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 조절에 따른 이화학적 특성	123
3) 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 조절에 따른 관능검사	125

4) 부재료 첨가 농도에 따른 유향처리 열무김치의 암예방 효과 .....	127
나. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 색소 및 비타민 C 함량 .....	131
1) Carotenoids 함량 .....	131
2) Chlorophylls 함량 .....	131
3) Vitamin C 함량 .....	131
다. 유향처리 열무의 품종에 따른 제조연구 .....	132
1) 품종에 따른 유향처리 열무김치의 제조 연구 .....	132
2) 유향처리 열무 품종에 따른 이화학적 특성 .....	132
3) 유향처리 열무 품종에 따른 관능검사 .....	134
4) 재료 배합비에 따른 열무김치의 암예방 효과 .....	138
5) 유향처리 열무김치의 품종에 따른 암예방 효과 비교 .....	142
라. 유향처리 농도를 달리한 열무김치의 <i>In vivo</i> 항암 효과 .....	143
1) 세포독성 작용 및 고형암 성장 억제 효과 .....	143
2) 마우스의 장기무게 변화 .....	145
3) 간에서 GST활성 및 GSH 함량의 변화 .....	145
마. 유향처리 농도를 달리한 열무김치의 <i>In vitro</i> 항암 효과 및 apoptosis ...	147
1) 암세포 증식 억제 효과 .....	147
2) Apoposis 유도 효과 .....	148
3) Bcl-2 family의 발현에 미치는 영향 .....	149
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	151
제 5 장    연구개발결과의 활용계획 .....	153
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	154
제 7 장    참고문헌 .....	155

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제1절 연구개발 목표와 내용

열무의 학명은 *Raphanus sativus* L.로 십자화과 무속의 작물로, 우리나라에서는 15속 45종, 15개의 변종이 재배되고 있으며 김치원료, 기타 요리원료로서 대중적으로 이용되고 있는데 재배면적은 2005년 기준으로 3,771ha이다.

우리나라에서 열무는 농경전통 사회에서부터 식이섬유의 공급원이었고 비타민C의 양이 많아 영양의 공급원으로서도 중요한 산업으로 유용성분을 찾아 추출하고 그것을 이용한 가공품이 개발될 경우 타 산업에 파급효과가 매우 클 것이다. 열무를 일반야채에서 고기능성 건강식품으로의 소비확대와 신 수출시장 개척을 위한 과학적 접근은 대단히 중요하며 고기능성 열무에 의한 국민건강증진 기여도는 아주 클 것이다.

열무가 속하는 십자화과의 식물들은 물분해에 의해 시니그린, 시날빈, sulforaphane 같은 유황배당체를 가지고 있고 불포화락톤고리가 있는 steroid 골격의 화합물인 강심배당체를 가진 것도 있다. 배당체는 알콜성, 페놀성 수산기를 가진 물질이 유리상태에 있지 않고 한 개 또는 몇 개의 당과 아세탈 형태로 결합되어 물분해에 의해 당과 비당부분으로 분해되고 비당부분의 종류에 따라 여러 형태로 나누어져 있다. 또 이 과의 식물들은 가수분해에 의해 시니그린, 시날빈, sulforaphane 같은 유황배당체를 가지고 있고 불포화락톤고리가 있는 steroid 골격의 화합물인 강심배당체를 가진 것도 있다. 배당체는 알콜성, 페놀성 수산기를 가진 물질이 몇 개의 당과 아세탈 형태로 결합되어 있고 이러한 성분이 생리활성을 나타내는데 기여한다고 알려져 있다.

민간요법에서 열무는 원기를 돋우는 보양제로 신체허약, 고혈압, 신경통, 시력부족에 탁월한 효과가 있고 오래 복용시 시력, 청각, 기억력도 크게 향상된다고 알려져 있다.

또 Codex에서 인증된 우리나라의 김치는 세계화의 기틀을 마련하였으나 가공기술에 의한 기능성 부여에는 한계가 있어 우리 고유의 토양 환경과 재배기술에 의한 기능성 김치원료 생산기술 개발로 우리 김치의 세계적 브랜드화가 필요하다. 또한 기능성 물질을 함유한 채소 생산을 위해서는 시장성, 재배의 용이성, 재료의 저가 및 구입의 편리성 등을 고려할 때 기능성 열무에 의한 가공품의 생산은 구비조건을 충족하고 있어 산업화의 경우 고도의 우위성을 확보할 수 있다.

그리고 현재 세계 시장에서는 기능성 채소 및 가공품의 수요가 급속한 증가 추세에 있으므로 이에 대한 연구가 필요하므로 한국고유의 고기능성 김치 등 가공식품개발은 기능성 야채생산 분야의 세계적인 혁명의 초석이 될 것이다. 따라서 특수 유용성분을 다량 함유한 채소의 생산과 가공품의 개발에 의한 산업화는 농산물의 수출경쟁력을 높이는데 대단히 중요하다.

그래서 본 연구는 기능성 열무의 생산기술을 연구하고 유용물질을 탐색 및 추출하며, 이 열무를 이용한 표준화된 김치제조 기술개발을 위해 수행되었다. 이를 위해 유향처리 함량에 따른 열무의 생육반응을 탐색하고 재배시기별 생산성 및 유용성분 차이를 검정하였으며, 생산현장 실증시험을 통한 생산기술을 확보하였다. 또 다양한 처리에 따른 열무의 이화학적 특성을 조사하고 유용물질을 추출하여 *in vivo* 활성을 평가하였다. 생산된 기능성열무로 열무김치를 제조하고 기능성을 측정하였으며 세계적인 상품화를 위한 열무김치제조 표준화연구를 수행하였다.

또한 본과제에서 도출된 결과로 기능성 물질을 함유한 열무의 새로운 재배기술을 농가에 보급하여 소득 증대와 신 수출작목으로 육성하고, 유용한 기능성 성분의 추출을 통하여 기능성 가공품을 개발하고 산업화하여 고부가가치 한국 고유의 수출품으로 육성하여 국민건강 증진과 세계시장 공략의 새로운 상품으로 육성하여 수출농업에 이바지하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

열무의 재배방법에 대한 국내연구는 거의 없으며, 최근 들어 다른 채소분야에서 기능성과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

현재 국내에서 연구된 바로는 일반재배 무, 열무, 냉이 등 십자화과 채소에서 K-562 인체 혈액 암세포에 대해 70% 이상 저해효과를 보였고 M9-63 인체골수 암세포에서는 K-562 인체혈액 암세포보다 저해 효과가 적었다고 보고하고 있다.

국외에서도 열무자체에 대한 연구는 많지 않으나, 열무가 속한 십자화과 식물에 대해서는 다양한 연구가 이루어져 있다. 즉 십자화과에 속하는 Saga brocccoli에서 항암 성분인 sulforaphane [(-)-1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane] 이 유기용매 추출액에서 발견되었고, 간에 있는 중요한 phase 2 detoxification enzyme인 glutathione transferase, NADH:quinone reductase, UDP-glucuronosyl transferase, epoxy hydrolase의 활성은 동물이나 세포가 발암물질에 노출시 반응을 조절해 줄수 있다고 하였다. 또 sulforaphane은 일상적으로 섭취할수 있는 자연상의 야채에 존재하고 강력한 phase 2 enzyme inducer이고 cytochrome P-450의 합성을 현저히 바꾸지 않고 phase 2 detoxication을 상승시키기 때문에 많은 흥미를 끌고 있다. 이는 sulforaphane의 phase 2 enzyme induction은 Raf-1이 직접적으로 활성화되어 일어나고 새로운 Ras에 비의존적인 경로의 존재를 암시하였다.

십자화과 식물에서 발견되는 isothiocyanate는 laboratory animal에서 일어나는 carcinogenesis에 강력한 inhibitor로 알려져 있다. 항암효과의 주기작은 carcinogen metabolic activation에 포함된 cytochrome P450 enzyme을 선택적으로 억제하고 phase II enzyme을 유도하며 apoptosis를 유발한다고 하였다.

benzyl isothiocyanate (BITC)는 A/J mice에서 benzopyrene에 의해 유도되는 lung rigenesis 를 억제하는 반면 phenethyl isothiocyanate (PEITC)에는 효과가 없다고 보고되고 있는데, BITC에 의한 효과는 benzopyrene이 활성화되어 benzopyrene-DNA adduct를 형성하는 것을 억제하기 때문으로 추정하였다. PEITC는 Fisher rat에서 8 mmol/kg으로 투여시 carcinogen인 4-(methylnitrosoamine)-1-(3-pyridol)-1-butanone (NNK)에 의한 lung tumorigenesis의 율을 투여하지 않은 model에서 67% 발생율을 9%로 감소시켰다고 보고되어 있다.

또한 PEITC와 allyl isothiocyanate는 in vitro system에서 human leukemia HL60과 human myeloblastic leukemia cell에서 apoptosis를 유도하여 성장억제 효과를 보였으며, serum 부재시에는 GC50이 0.8-0.9 uM이고 serum이 있을 때는 1.49-3.22 uM로 측정되어 야채의 암발생률을 낮추는 기작에 대한 하나의 증거라고 하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 기능성 열무 생산기술 연구

열무는 북반구의 온대와 난대에 걸쳐 재배되고 있는데 우리나라에서는 15속 45종, 15개의 변종이 있고 예로부터 주로 김치로 이용되어 왔다. 열무는 십자화과 채소로 학명이 *Raphanus sativus* L.이며 비타민 A, C 및 필수 무기질이 풍부하여 혈액의 산성화를 방지하고 식욕증진과 만복감으로 다이어트에도 좋은 식품이다. 또 이 과의 식물들은 가수분해에 의해 시니그린, 시날빈, sulforaphane 같은 유황배당체를 가지고 있고 불포화락톤고리가 있는 steroid 골격의 화합물인 강심배당체를 가진 것도 있다. 배당체는 알콜성, 페놀성 수산기를 가진 물질이 몇 개의 당과 아세탈 형태로 결합되어 있고 이러한 성분이 생리활성을 나타내는데 기여한다고 알려져 있다. 특히 우리나라 남도지방의 민간요법에서는 유황을 첨가하여 재배한 열무가 원기를 돋우는 보양제로 신체허약, 고혈압, 신경통, 시력부족에 탁월한 효과가 있고, 장기 복용시 시력, 청각, 기억력도 크게 향상시킬 수 있다고 알려져 있다.

#### 1. 연구수행 방법

##### 가. 유황처리 함량 및 방법에 따른 생육반응 연구

열무재배시 토양에 유황을 처리하였을 때 그 함량에 따른 열무의 생육반응을 조사하기 위하여 생육을 관찰하고, 수량 등을 조사하였다

##### 1) 토양처리

황토 및 일반토양의 흙을 체에 쳐서 입자를 고르게 한 후  $0.58 \times 0.38 \times 0.08\text{m}$ 의 상자에 물 빠짐이 좋게 한 후 황토 + 유황( $1,818\text{g}/\text{m}^3$ ) + 표준시비 + 유기물, 황토 + 유황( $1,818\text{g}/\text{m}^3$ ) + 표준시비 + 무비황토 복토 2cm, 일반토양 + 표준시비 + 유기물 등 처리별 양에 따라 고루 섞어 상자에 담았다.

##### 2) 파종방법 및 재배관리

$0.58 \times 0.38 \times 0.08\text{m}$ 의 재배상에 3줄씩 10cm 간격으로 줄뿌림으로 1줄에 10립씩, 1상자당 30립되게 파종하였다. 하우스의 온도는 발아시에는  $18\sim 20^\circ\text{C}$ 를 유지하여 주고, 그 후부터는  $20\sim 23^\circ\text{C}$ 되게 관리하며, 토양수분은 용수량의 65~70%, 건조, 다습하지 않게 관리 하였다.

3) 생육조사 및 수량조사

엽수 및 초장 등 본엽 7엽시까지 생육상태를 경시적으로 조사하고, 수확 후 생체중 및 건물중을 조사하였다.

4) 토양 및 식물체 무기물 분석

토양의 분석은 농촌진흥청 토양화학분석법(1998)에 준하여 pH 는 토양과 증류수의 비율을 1:5로 하여 pH meter로 측정하였고, 유기물은 Tyurin 법으로, 유효인산은 Lancaster 법으로, 치환성칼륨, 칼슘 마그네슘 등의 양이온은 1N Ammonium acetate 로 침출하여 AA 및 ICP로 분석하였다.

5) 열무재배 생산 실태조사

경남, 전남의 남부지방 및 도시근교의 열채류 재배가 발달한 경기 지방의 22농가에 대하여 열무재배농가의 일반현황과 재배개요, 출하유통, 재배상의 문제점 등을 설문조사하였으며, 실태조사의 방법은 그림 1과 같은 설문지를 만들어 개별농가에 대해 면담 조사방식을 택했다.

<b>열무재배실태조사표</b>				
<b>1. 일반현황</b>				
○ 성 명 :	○ 년 령 :	○ 연락처 :		
○ 주 소 :				
○ 재배작물 :				
<b>2. 재배면적 :</b>				
<b>3. 재배품종 :</b>				
<b>4. 재배경력 :</b>				
<b>5. 연작년수 :</b>				
<b>6. 작형 :</b>	<b>파종</b>	<b>정식</b>	<b>수확</b>	
<b>7. 재배방법</b>				
- 환경(노지, 비가림, 하우스 등)				
- 시비량				
◇ 기비 :	퇴비	석회	요소	염가 용인 기타
◇ 추비(시기 및 량) :				
- 기타 사용 비료 및 약제(유기, 저농약, 무농약 등 포함)				
<b>8. 재식주수 및 재식거리 :</b>				
<b>9. 일반재배시 병해충방제</b>				
- 충방제 약제 및 회수 :		- 병방제 약제 및 회수 :		
<b>10. 생산량 :</b>				
<b>11. 출하(수확당일, 간이저장, 임시저장 등)</b>				
<b>12. 판매방법(포전, 경매, 일반시장 등)</b>				
<b>13. 출하단가 :</b>				
<b>14. 경제성 :</b>	<b>조수익</b>	<b>경영비</b>	<b>소득</b>	
<b>15. 재배상 문제점 및 건의사항</b>				

그림 1. 열무실태조사표



#### 6) 마우스를 이용한 급성경구독성시험

유황처리한 토양에서 재배한 열무의 독성여부를 판단하기 위하여, 본시험에서 생산한 열무로 만든 김치의 동결건조분말을 만들고, ICR 계통의 마우스 암수 각 군당 5마리씩 0~2000mg/kg/day의 용량으로 1회 경구투여한 후 15일간의 사망률, 일반증상 및 체중변화와 부검소견을 관찰하여 시험하였다.

#### 나. 재배시기에 따른 생산성 검증

##### 1) 재배시기

열무는 경남농업기술원 내 하우스 2동에서 봄(3~4월), 여름(7~8월), 가을(9~10월) 3차례 파종하여 생육을 관찰하고 생산성을 조사하였다.

##### 2) 토양처리 및 재배관리

토양은 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 표준시비 + 유기물 등 4처리로 하고, 재배 상에 3줄씩 10cm 간격으로 파종하여 발아시 18~20℃, 생육시에는 20~23℃로 유지하였다.

##### 3) 생육조사 및 수량조사

생육 및 수량조사도 전 시험에서 처럼 본엽 7엽이 되는 시기를 수확기로 하고 생육 및 수량을 조사하였다.

#### 다. 생산현장 실증시험

##### 1) 재배방법

농가에 직접 적용할 수 있는 실증시험을 위해 2005년 가을(9~10월)과 2006년 봄(3~5월) 두차례에 걸쳐 경남 통영군 용남면 삼화리에 위치한 농가의 비닐하우스 3동을 임차하여 실시하였다. 임차한 농가의 토양은 자연상태의 황토이며, 하우스는 방충망을 설치하여 재배기간 동안 온도관리와 간이 스프링클러로 물만 공급하고, 농약은 전혀 사용하지 않았다. 비료는 10a 기준으로 요소 15kg, 용성인비 41kg, 염화加里 13kg, 퇴비 2,760kg 및 유황 270kg을 파종전 시용하였고, 본엽이 7~9매일 때 수확하여 최종 조사하였다.



그림 2. 농가실증시험포

## 2) 품종

열무종자는 당년에 생산된 것을 사용하였고, 품종은 이전 시험에서 사용하였던 K사의 품종 A와 N사, H사에서 추천받은 각 품종 B, C의 3품종을 사용하였다. 시험구는 난괴법 3반복으로 배치하고 각 구는 다시 4 처리구로 나누어 시험하였다.

## 3) 열무 성분분석

수확한 열무는 품종별로 성분을 측정하였는데, 단백질은 Auto-Kjeldahl법으로 단백질추출기(Büchi 315, Deutschland)를 이용하여 측정하였고, 회분은 직접회화법으로, 지질은 시료를 원통여지에 넣고 100℃에서 건조한 후 ethyl ether를 가하여 Soxhlet로 16시간 추출한 다음 감압농축하여 측정하였다.

## 2. 연구결과

### 가. 유황처리 함량 및 방법에 따른 생육 반응 연구

#### 1) 발아세

그림 1은 열무 파종 7일 후의 발아세를 나타낸 것으로 유황처리구에서 다소 발아세가 약한 편이었다.

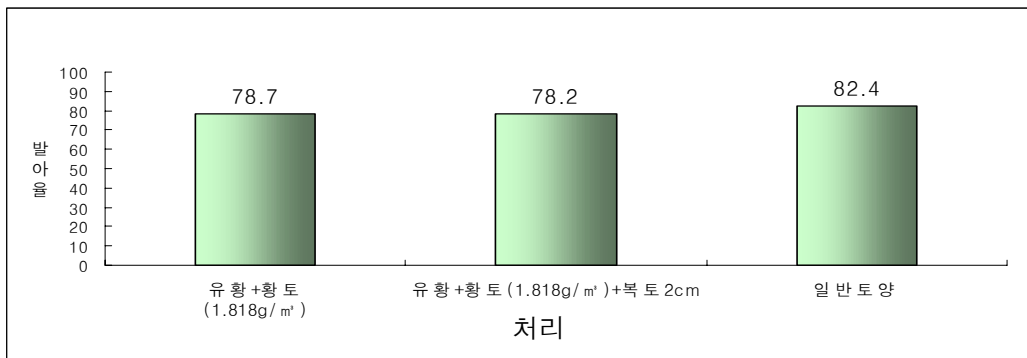


그림 3. 발아세

#### 2) 상토 이화학성

표 1은 처리별 상토의 이화학성을 나타낸 것으로 pH는 황토 + 유황(1,818g/m<sup>2</sup>)과 황토 + 유황(1,818g/m<sup>2</sup>) + 무비황토 복토 2cm 처리가 일반토양 처리에 비해 현저히 낮았는데, 이는 유황처리의 영향이라 판단할 수 있으며, 유기물 함량도 유황 처리구가 일반토양에 비해 낮았다.

표 1. 처리별 상토의 이화학성

처 리	pH (1:5)	OM (g/kg)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	K <---->	Ca cmol + /kg	mg	Na ---->
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	3.8	10.1	255	0.96	0.1	1.2	0.6
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 무비황토복토2cm	3.7	6.8	100	0.23	0.0	0.7	0.5
일반토양	6.5	18.8	1073	0.54	0.3	2.0	0.3

3) 식물체 무기성분

표 2는 처리에 따른 식물체 무기성분을 분석한 것으로 처리간 큰 차이는 없었다.

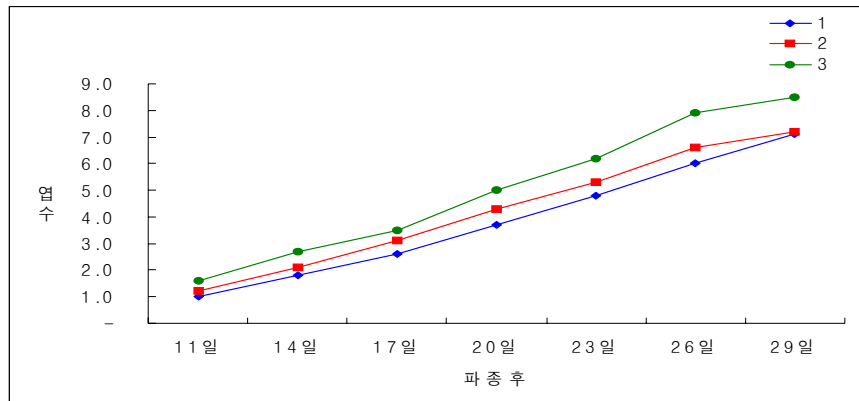
표 2. 처리별 식물체 무기 성분

(%)

처 리	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	mgO	N <sub>2</sub> O
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	0.83	2.56	0.063	0.57	0.862
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 무비황토복토2cm	0.62	1.53	0.027	0.57	0.884
일반토양	0.71	3.21	0.203	0.53	0.852

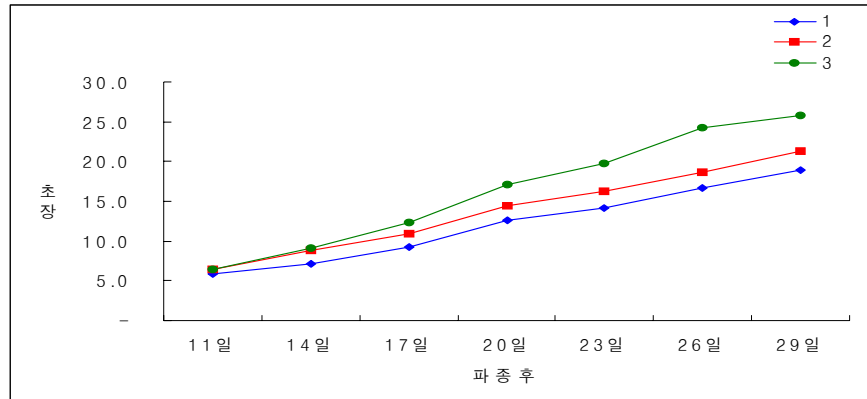
4) 처리별 초장 및 엽수의 경시적 변화

그림2와 그림3은 파종 후 엽수와 초장의 경시적 변화를 나타내는데 처리간 차이를 보이나 생육 진행은 일정한 경향이였다.



\* 1 : 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 표준시비 + 유기물 2 : 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 표준시비 + 2cm 복토  
3 : 일반토양 + 표준시비 + 유기물

그림 4. 파종후 생육(엽수)



\* 1 : 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 표준시비 + 유기물 2 : 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 표준시비 + 2cm 복토  
 3 : 일반토양 + 표준시비 + 유기물

그림 5. 파종후 생육(초장)

#### 5) 생육 및 수량

표 3은 수확시 생육 및 수량을 나타낸 것으로 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>)과 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 무비황토 복토 2cm 처리간의 지하부 및 지상부 생육은 차이가 없었으며, 수량도 유의한 차이가 없었다. 일반토양간의 수량 비교는 두 처리 공히 일반토양 대비 75%수준 이상으로서 본과제를 수행하기 전의 예비시험 결과에서 나타난 일반토양 대비 45% 수준보다 수량이 높아 졌는데 이는 온습도 관리와 물관리 기술 등 재배 기술연구 측면에서 기술 수준이 향상되어서 수량 향상을 기할 수 있었다.

표 3. 생육 및 수량

처 리	생체중(g)/1주		건물중(g)/1주		수량 (kg/10a)
	지상부	지하부	지상부	지하부	
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	10.4	0.50	0.76	0.094	1,415a <sup>z</sup>
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 무비황토 복토 2cm	10.8	0.64	0.84	0.12	1,470a
일반토양	13.8	0.82	1.06	0.196	1,878b

<sup>z</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



그림 6. 토양처리별 열무 모습

6) 열무재배 및 생산 실태조사

열무재배농가를 대상으로 설문지를 작성하여 일반현황과 재배개요, 출하유통, 재배상의 문제점 등을 직접 면담으로 조사하여 과제수행에 참고하였다.

가) 호당 재배면적

통계에 따르면 우리나라의 열무 재배면적은 3,771ha('05년)로 전체 무 재배면적의 13.9%를 차지하고 있고, 대부분 시설재배를 하고 있는데 그 중 도시근교의 교통과 유통망이 유리한 경기지방이 전국의 50.8%로 가장 많이 재배되고 있다.

본 조사에서도 도시근교 채소농업이 발달한 경기지방(10호)을 위주로 경남(8호), 전남(4호) 등 전체 22농가를 조사하였다. 호당 재배면적은 0.1ha 미만이 3농가로 13.6%였으며, 1ha이상의 대규모농가는 22.7%였다. 재배면적이 중간인 0.1 ~ 1ha미만이 63.6%를 차지한 대부분이었다. 이는 가격과 공급의 전망을 예측하여 재배하는 관계로 관리와 경제적인 측면을 고려한 재배면적인 것으로 추정된다(표 4).

표 4. 농가당 재배면적

면적	계	0.1ha미만	0.1ha이상~ 0.5ha미만	0.5ha이상~ 1ha미만	1ha이상
농가수	22	3	7	7	5

나) 재배경력

열무의 재배경력은 표 5에서 보듯이, 5년미만 및 15년이상 이 각각 18.1%를 점하고 있었으며, 10년~15년미만이 36.4%로 가장 많았다. 따라서 5년이상 열무를 재배한 농가가 81.8%를 차지하여 인체에 유용한 기능성을 갖춘 열무가 보급되면 생산에는 문제가 없을 것으로 사료되었다.

표 5. 재배년수

재배년수	계	5년미만	5년이상~ 10년미만	10년~ 15년미만	15년이상
농가수	22	4	6	8	4

다) 재배방법 및 유통

표 6에서와 같이 재배양식은 조사한 전 농가가 비가림하우스에서 재배하고 있었으며, 농약을 사용하지 않는 무농약 재배였다. 열무 단일 작목으로 재배하지 않고 타 채소작물과 같이 돌려가며 재배하는 방식이었다. 출하는 신선도를 유지하기 위하여 당일 출하하고 있었고, 백화점, 마트, 대형유통점 등에 납품하는 경우가 86.4%로 주류를 있었으며, 직판은 13.6%를 점유하고 있었다.

표 6. 재배방법 및 출하형태(농가수)

재배방법	- 환경 : 비가림 하우스(22)	*경제성 분석
	- 농약사용여부 : 무농약재배(22)	-조수입 2,700천원/10a
	- 연작여부 : 윤작재배(22)	-경영비 100천원/10a
출하시기	- 수확당일 출하(22)	-소 득 2,600천원/10a
판매방법	- 직판(3), 납품(19)	
판매단가	- 직판 : 3,000원/kg, 납품 : 1,500원/kg	

라) 기능성 열무재배농가는 없었음.

7) 마우스를 이용한 급성경구독성시험

본 시험에서 열무김치분말 투여군의 2000mg/kg/day의 용량은 OECD guideline 및 국립환경연구원 고시에서 추천하는 급성경구독성시험의 한계용량이다. 시험결과, 암수 마우스에서 시험물질 투여와 관련된 사망률, 일반증상, 체중변화 및 육안적 부검소견에서 이상소견은 관찰되지 않았다(표 7~10).

즉 암수 마우스에 대한 열무김치분말의 2000mg/kg/day 용량으로 경구투여한 것은 사망률 등에 있어서 어떠한 독성소견도 유발하지 않아, 암수 마우스에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 2000mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단되었다.

표 7. Mortality of mice(Group summary)

성별	투여량 (mg/kg)	Days on test															Final Mortality (Dead/used)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
수컷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
암컷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

표 8. Clinical signs of mice (Group summary)

GROUP: DOSE: (mg/Kg )	V. CONTROL			T1		
	0			2000		
수컷	No. of animals	5			5	
	normal	#	(%)	#	(%)	
		5	100.00	5	100.00	
암컷	No. of animals	5			5	
	normal	#	(%)	#	(%)	
		5	100.00	5	100.00	

표 9. Body weights of mice (group summary)

(g)

GROUP:		V.CONTROL	T1	
PERIOD	DOSE: (mg/Kg)	0	2000	
수컷	DAY1	MEAN	28.2	28.2
	Dosing	S.D.	2.10	1.50
		N	5	5
수컷	DAY2	MEAN	28.7	29.5
	Dosing	S.D.	2.14	1.10
		N	5	5
수컷	DAY5	MEAN	30.1	31.5
	Dosing	S.D.	2.00	1.33
		N	5	5
수컷	DAY8	MEAN	31.7	32.8
	Dosing	S.D.	2.38	1.38
		N	5	5
수컷	DAY15	MEAN	34.0	35.0
	Dosing	S.D.	2.10	1.75
		N	5	5
암컷	DAY1	MEAN	23.1	23.1
	Dosing	S.D.	1.90	1.04
		N	5	5
암컷	DAY2	MEAN	24.2	23.9
	Dosing	S.D.	1.51	1.36
		N	5	5
암컷	DAY5	MEAN	25.4	24.9
	Dosing	S.D.	1.90	1.75
		N	5	5
암컷	DAY8	MEAN	26.1	26.2
	Dosing	S.D.	1.88	1.88
		N	5	5
암컷	DAY15	MEAN	28.6	27.7
	Dosing	S.D.	1.87	1.37
		N	5	5

Ftst : NSg-05/T-test;NSg-05/No unplanned test performed

표 10. Incidence of gross findings of mice(Group summary)

Group	투여량(mg/kg)	대조	투여군
		0	2000
수컷	시험동물 수	5	5
	관찰수	5	5
	No remarkable finding	5	5
암컷	시험동물 수	5	5
	관찰수	5	5
	No remarkable finding	5	5



나. 재배시기에 따른 생산성 검증

열무의 재배시기에 따른 생육과 생산성을 검증하기 위해 열무를 봄, 여름, 가을에 각각 파종하여 시험하였다.

1) 발아율

표 11는 파종시기에 따른 토양처리별 발아율인데, 파종 후 7일 경과 후 발아율은 토양처리별로는 일정한 경향이나 파종시기가 9월 18일 일 때가 가장 낮았다. 이는 발아에 큰 영향을 주는 온도가 낮았기 때문인 것으로 보인다.

표 11. 파종시기에 따른 토양처리별 발아율

처리내용	황토 + 유황			황토+ 유황+ 2cm복토			황 토			일 반 토 양		
파종기 (월.일)	3.25	7.20	9.18	3.25	7.20	9.18	3.25	7.20	9.18	3.25	7.20	9.18
발아율(%)	92.2	96.6	63.3	91.1	97.7	53.3	92.2	94.3	63.3	92.5	95.5	62.2

2) 상토 이화학적

처리별 상토의 이화학적은 표 12에서와 같이 pH는 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>)과 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 무비황토 복토 2cm 처리가 전시험에서와 같이 일반토양 처리에 비해 현저히 낮았으며 유기물 함량도 대체로 낮았다.

표 12. 처리별 상토의 이화학적

처 리	pH	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K	Ca	mg	Na
	(1:5)	(g/lg)	(mg/kg)	<-----	cmol + /lg	----->	
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	3.6	29.9	123	1.21	5.1	1.7	0.6
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 무비황토 복토2cm	3.6	17.1	88	0.83	7.0	2.1	0.5
일반토양	6.1	34.2	1234	0.67	7.7	2.9	0.5
황토	5.3	16.5	72	0.47	4.1	2.0	0.3

3) 식물체 무기성분

표 13은 처리에 따른 식물체 무기성분을 분석한 것으로 처리간 큰 차이는 없으나, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, CaO의 함량은 일반토양에서 현저히 높았다.

표 13. 처리별 식물체 무기 성분 (%)

처 리	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	CaO	mgO
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	0.9	3.2	0.4	0.9
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 2cm 복토	1.1	4.8	0.7	0.9
일반토양	2.0	5.1	4.3	1.1
황토	1.4	5.3	0.3	0.9

4) 재배시기 및 토양처리별 엽수

그림 7, 그림 8과 그림 9는 파종 후 엽수의 경시적 변화를 나타내는데, 재배시기에 관계없이 일반토양에서 생육의 진행이 가장 빨랐고, 그 다음이 황토 단용 처리였으며, 황토+유황 처리 및 복토 2cm 가 가장 늦었는데 이는 유황 첨가에 따른 작물체의 스트레스 때문인 것으로 보였다.

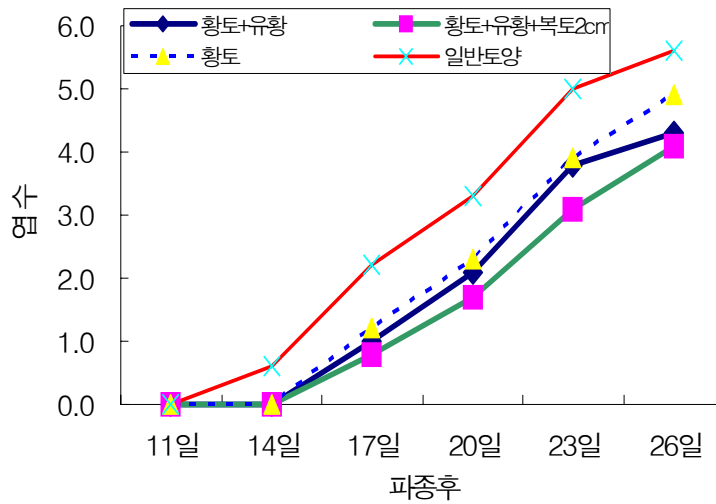


그림 7. 3월 25일 파종기의 엽수

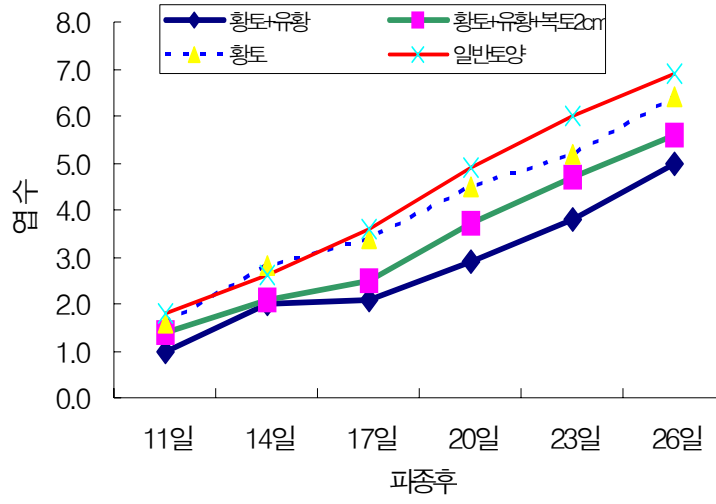


그림8. 7월 20일 파종기의 엽수

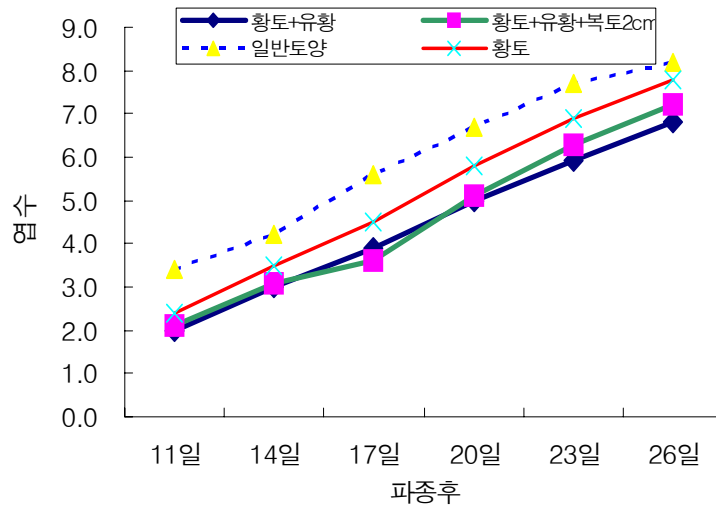


그림9. 9월 18일 파종기의 엽수

5) 생육 및 수량

표 14, 15 및 16은 파종시기에 따른 처리별 생육 및 수량을 나타낸 것으로 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>)과 황토 + 유황(1,818g/m<sup>3</sup>) + 2cm 복토 처리간의 지하부 및 지상부 생육은 차이가 없었고, 수량도 유의한 차이가 없었으며, 일반토양간의 수량 비교는 두 처리 공히 일반 토양 대비 약 50~70% 정도 었다.

표 14. 생육 및 수량(3월 25일 파종)

처 리	생체중(g)/1주		건물중(g)/1주		수량 (kg/10a) <sup>z</sup>
	지상부	지하부	지상부	지하부	
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	10.7	1.00	1.20	0.181	1,455a <sup>z</sup>
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 2cm 복토	11.1	0.92	1.15	0.092	1,510a
일반토양	29.6	1.70	2.01	0.200	4,025b
황토	22.5	1.33	1.85	0.187	3,060b

<sup>z</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 15. 생육 및 수량(7월 20일 파종)

처 리	생체중(g)/1주		건물중(g)/1주		수량 (kg/10a) <sup>z</sup>
	지상부	지하부	지상부	지하부	
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	12.3	0.63	0.89	0.082	1,674a <sup>z</sup>
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 2cm 복토	12.4	0.62	0.96	0.080	1,687a
일반토양	23.3	1.01	1.70	0.182	3,171b
황토	22.1	0.84	1.40	0.096	3,007b

<sup>z</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 16. 생육 및 수량(9월 18일 파종)

처 리	생체중(g)/1주		건물중(g)/1주		수량 (kg/10a) <sup>z</sup>
	지상부	지하부	지상부	지하부	
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> )	15.2	0.70	0.97	0.091	2,067a <sup>z</sup>
황토 + 유황(1,818g/m <sup>3</sup> ) + 2cm 복토	16.0	0.72	1.13	0.092	2,176a
일반토양	23.8	1.10	1.87	0.210	3,236b
황토	22.5	0.90	1.68	0.117	3,082b

<sup>z</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

다. 생산현장 실증시험

1) 품종별 종자 소요량

생산 현장 실증시험은 종자회사 3곳에서 각각 열무 1품종씩을 추천받아 시험 하였는데, 시판되고 있는 열무의 종자는 종자회사에 따라 크기와 모양이 달랐다. 따라서 하우스 내에 30cm 간격으로 이랑을 짓고, 5cm 간격으로 2립씩 파종하였을 때 필요한 종자는 표 17과 같이 종자의 크기에 따라 소요량이 달랐다.

표 17. 품종별 종자 소요량

구분	품종 A	품종 B	품종 C
10a 당 소요량()	2,292	1,792	4,000

2) 토양특성

시험지는 해안가에 위치한 천연적인 황토 땅으로, 품종별 시험전의 각 재배구의 토양특성은 표 18에서 보는 바와 같이 전체적으로 큰 차이는 보이지 않았다.

표 18. 토양특성

구분	pH (1:5)	OM (g/kg)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	K Ca mg		
				<----- cmolc/kg ----->		
품종 A 재배구	7.5	8.1	118	0.5	16.8	1.1
품종 B 재배구	7.5	6.2	103	0.4	17.6	1.2
품종 C 재배구	7.4	8.1	98	0.5	17.4	1.2

3) 열무 품종에 따른 생육

가) 품종별 발아율

파종후 10일째의 발아율은 품종 B가 100%를 나타내었으나, 품종 A와 C는 각각 89.3%와 87.6%로서 품종 간 차이를 보였다.

나) 엽수 및 초장

농가 하우스 내에서 생육 중인 열무의 품종별 엽수의 분화는 품종 A가 가장 빨랐고, 그다음으로 품종 B, C 순이었으며 초장은 품종 C, A, B 순으로 빨리 자라서 품종 간 차이를 보였다(그림 10).

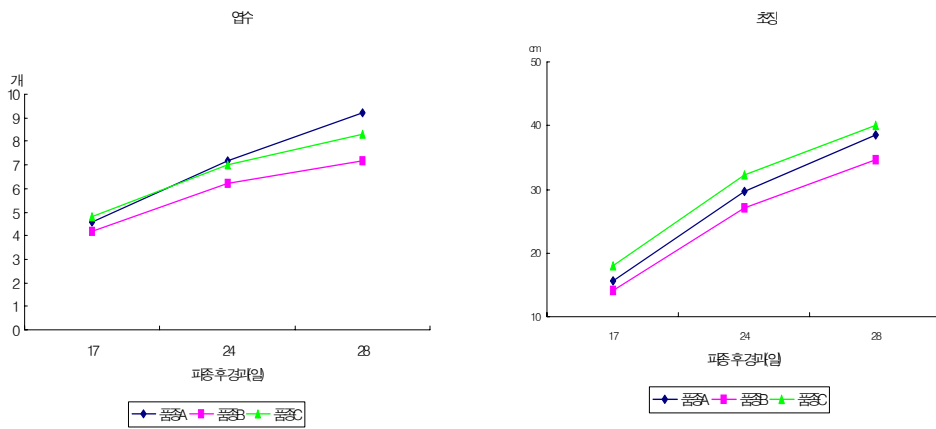


그림10. 엽수 및 초장

4) 수확시 품종별 생육 및 수량

같은 날 파종을 하였으나 엽수가 가장 늦게 7매 이상이 된 품종을 수확일의 기준으로 하여 생육을 조사하여 표 19에 나타내었다. 엽수는 품종 A>C>B 순이었고 초장은 품종 C>A>B 순이었고, 주당 생체중은 품종 C가 50.4g으로 가장 높았다.

수량은 처리구 12m<sup>2</sup>를 전수조사하였는데 품종 A는 24.6kg, B는 26.9kg이었고 품종 C는 32kg으로서 가장 많았는데, 이들을 10a 기준으로 환산한 것은 표에서와 같다.

이들에 대한 품종간의 기능성 물질과 맛 등의 기호도에 대한 비교시험은 유용물질 탐색 및 기능성 열무를 이용한 김치제조 기술개발 편에서 설명하기로 한다.

표 19. 열무 수확시 품종별 생육 및 수량

구분	엽수	엽폭	초장	근장	근경	생체중(g)/1주		수량 (kg/10a) <sup>z</sup>
						지상부	지하부	
품종 A	9.2	8.9	38.5	12.3	0.8	45.8	2.5	2,050a <sup>z</sup>
품종 B	7.2	8.7	34.7	10.6	0.6	40.0	1.6	2,242a
품종 C	8.3	9.9	40.1	11.9	0.7	50.4	1.7	2,669a

<sup>z</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

5) 농가 생산시험

농가에서 실제로 어떤 한 품종을 재배하여 수확하였을 때, 생육과 경제성을 알아보기 위하여 한 품종(품종 A)만 줄뿌림으로 파종하여 시험하였다. 또 열무는 저장성이 매우 약하기 때문에 한꺼번에 수확하는 것 보다는 일정 간격을 두고 수확하는 것이 실제 수송과 판매에 유리할 것이다. 그래서 본시험에서도 2006년 봄인 3월 27일에 하우스 한 동 전체에 파종 후 다른 하우스에는 2일 간격으로 파종하여 조사하였다.

가) 발아 및 생육

발아시는 1차, 2차 및 3차 파종 후 각각 4, 6 및 7일이었는데, 이렇게 발아소요일이 다른 것은 따로 가온을 하지 않는 상태에서 발아에 가장 큰 영향을 미치는 외기온도의 영향이라 생각된다.

엽수는 그림 11에서 보는 바와 같이 1, 2차 파종한 것에 비해 3차 파종한 것이 파종 후 25일 경과시 까지는 차이를 보였으나 28일 이후는 차이가 없었으며, 초장의 증가도 3차 파종한 늦었는데 이 모두 발아시와 마찬가지로 기온의 영향으로 보였다.

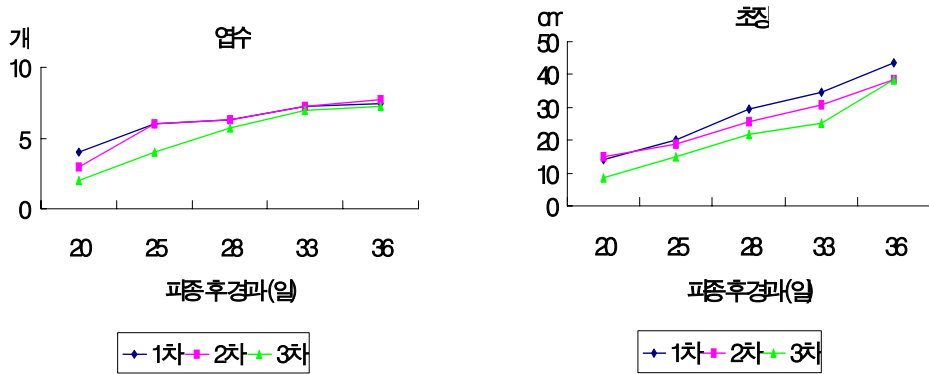


그림 11. 엽수 및 초장

나) 생육 및 수량

수확기는 엽수가 7매 이상이 되었을 때를 기준으로 하고 시험지의 열무를 전수 조사하였다. 표 20에서 보는바와 같이 수확기의 평균 초장은 40.1cm, 엽폭은 8.5cm 이었다. 3차에 걸친 평균 수량은 10a를 기준으로 2,916kg이었다.

표 20. 생육 및 수량

구분	엽수	엽폭	초장	근장	근경	생체중(g)/1주		건물중(g)/1주		수량 (kg/10a)
						지상부	지하부	지상부	지하부	
1차 파종(3.27)	7.4	8.6	43.6	14.5	0.7	44.9	5.0	2.6	0.4	3,096
2차 파종(3.29)	7.7	8.6	38.5	14.9	0.8	43.6	4.8	2.9	0.4	2,913
3차 파종(3.31)	7.2	8.3	38.3	13.6	0.6	42.6	4.8	2.5	0.4	2,740
평균	7.4	8.5	40.1	14.3	0.7	43.7	4.9	2.6	0.4	2,916

또한 비교를 위해 시장에서 열무를 구입하여 조사하였는데, 구입한 열무의 초장은 40.2cm로 본시험과 비슷하였으나 평균 엽수는 6.5매, 생체중은 평균 35.5g으로 본시험보다 적었는데, 이는 일반적으로 열무를 수확하고 출하할 때 잎을 다듬기 때문일 것으로 생각된다(표 21).

표 21. 시장구입 열무의 생육

구분	엽수	엽폭	초장	근장	근경	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
재래시장	6.4	8.0	39.6	10.9	0.8	33.3	2.7	1.9	0.3
대형마트(E)	6.6	8.4	40.8	11.0	0.8	37.6	3.1	1.8	0.2
평균	6.5	8.2	40.2	11.0	0.8	35.5	2.9	1.8	0.3

다) 경제성 분석

시장에서의 열무는 단(묶음)으로 판매되고 있는데, 시장가격은 판매처에 따라 1단의 무게와 가격에 많은 차이를 보였다. 진주시에 소재한 대형마트(T)의 경우 열무가격은 4월 29일 kg당 2,080원이었던 것이 5. 15일에는 1,800원, 5. 30일에는 1,200원으로 내렸는데, 봄철에 열무의 출하가 많아지는 시기라서 지속적으로 가격이 떨어진 결과로 보인다.

그러나 기능성이 높은 열무라면 재배농가의 출하가로서 이 가격을 충분히 적용할 수 있을 것이며, 따라서 1회 재배시 3,500~6,000천원/10a의 조수입을 올릴 수 있고, 하우스에서 연간 5회는 충분히 재배가능하므로 17,500~30,000천원/10a 이란 매우 높은 조수입을 올릴 수 있을 것이다.

6) 열무 품종별 성분분석

가) 일반성분

열무의 품종, 재배에 따른 생체의 성분을 비교한 것은 표 22에 나타내었다. 열무의



수분함량은 시판열무에 비해 조금 낮았으나, 품종간에는 차이가 없었다. 단백질은 품종 B가 높았으며, 지질은 전 품종이 소량함유하고 있었다. 회분함량은 품종 간에는 비슷하였으나, 시판열무에 비해서는 높았다.

표 22. 열무의 품종별 일반성분 (단위 : %)

구분	수분	단백질	지질	회분
품종 A	89.9	1.9	0.1	1.9
품종 B	90.4	2.7	0.1	1.6
품종 C	89.5	2.0	0.1	1.8
재래시장	93.2	1.4	0.4	1.4
대형마트(E)	95.2	1.1	0.1	1.1

나) 무기성분

무기성분은 시료를 건조한 후 측정하였는데, 품종간에 각종 성분함량의 차이를 보였으며(표 23) 특히 Ca의 경우 품종 A가 912mg/100g로 다른 품종에 비해 높은 함량을 보였다. 무기성분은 인체에서도 다양한 역할을 하고 있는데 예로 K는 일반 식물체에 널리 분포하고 있는 성분으로 세포의 삼투압 유지작용 외에 고혈압을 방지하는 효과가 있고, 칼슘은 뼈의 주성분이며 신경자극전달과 근수축에도 관여하며, 마그네슘은 신경안정과 체내 여러 효소의 보조인자로 작용하여 효소기능을 활성화시킨다고 알려져 있다. 본시험을 통해서도 알 수 있듯 이런 무기성분을 다양하게 갖고 있는 열무는 영양학적으로도 매우 가치를 가지는 작물이라 할 수 있을 것이다.

표 23. 열무의 품종별 무기성분 (단위 : mg/100g)

구분	P	K	Ca	mg	Na	Fe
품종 A	162	2,354	912	474	434	16
품종 B	189	2,018	497	562	535	28
품종 C	203	1,942	603	592	470	25
재래시장	308	2,750	799	423	654	20
대형마트 (E)	313	5,674	821	395	535	15

## 제2절 유용물질 탐색 및 추출

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 유향처리 농도별 열무의 이화학적 특성 및 유용물질탐색

##### 1) 열무의 유효성분의 추출

열무를 재배후 수확하여 즉시냉동후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다. 물에 녹는 분획을 얻기 위해서는 열무잎을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2배의 물을 넣고 ice-chilled bead beater(Bio-Spec)를 이용하여 5분간 pulse를주고 homogenization시키고, homogenate는 A-8.24 rotor를 이용한 T-324 refrigerated centrifuge를 이용하여 10,000 xg 에서 40분간 원심분리시켜 상등액을 얻어냈다. 상등액을 분자 량 10,000 dalton을 기준으로 가르기 위해서는 PM-10 membrane을 이용한 ultrafiltration을 시켜 10,000 dalton이하의 filtrate와 10,000 dalton 이상의 물질을 갈라 각 분획을 조사하였다. 유기용매에 녹는 분획을 추출하기 위해서는 위에서 얻어진 상등액을 methanol,과 섞은 후 partition flask에 방치하여 각 용매에 용해도가 있는 분획을 가른 후 각각을 evaporator를 이용하여 농축시켰다. 각 분획의 무게를 측정하고 각 분획을 배지에 녹인 후 각 assay에 대한 영향을 측정하였다.

긍정적인 결과가 나온 분획을 유기용매를 연속적으로 사용하여 불순물을 없애고 어느 정도 정제를 한 후 thin-layer chromatography를 해서 원하는 물질을 용출할 수 있는 조건을 잡아 이 결과를 바탕으로 preparative scale의 TLC를 통해 정제를 거치고 마지막으로 HPLC에서  $\text{C}_{18}$  column을 이용한 reversed phase 에서의 여러 가지 용매를 가지고 용출을 시도하여 정제를 시도하였다.

##### 2) quinone reductase(QR) reductase의 inducer potency

96 well에서 Hepa 1c1c7 murine hepatoma cell을 사용하여 측정하였다. 세포를 10,000/well로 넣어 24시간 배양후 조사하고자 하는 물질을 투여하여 48시간 더 배양한 후 유기용매에서 추출한 액의 경우 배양액으로 500배정도 희석하여 2배씩 농도를 낮추어서 사용하였다(유기용매는 농도가 0.2%이하로 존재하도록 하였음). Inducer activity의 1 unit는 150 ul 배양액을 포함한 1개의 well에 더해졌을 때 QR의 specific activity를 2배로 하는 양으로 정했고 처리 후 세포를 ice-cold PBS로 2번 씻고 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 125 mM sucrose를 포함한 buffer로 현탁액을 만들었다.

세포현탁액은 13,000×g, 20분,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하고 상등액으로 단백질농도와 QR활성을 Rosenthal (1987)의 방법으로 측정하였다. 5ug의 cytosolic protein을 총부피가 1에 되도록 assay buffer (25mM Tris-HCl, pH 7.4, 60 ug BSA, 5uM FAD, 0.2 mM NADH, 80uM, 2,6-dichloroindophenol, 0.01% Tween 20)에 넣고 상온에서 5분 처리후

30 uM dicumarol로 반응을 끝내고 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Isothiocyanate와 glucosinolate의 측정

열무추출액의 isothiocyanate의 농도는 1,2-benzenedithiol과 cyclo-condensation으로 1,3-benzenodithiole-2-thione을 형성하여 spectrophotometer로 365 nm에서 측정하였다. 수용액층은 그냥 사용하고 유기용매층은 evaporation 시킨후 물에 녹여 사용하였다. 추출액의 glucosinolate는 정제된 myrosinase를 37°C 에서 2시간 처리하여 isothiocyanate로 전환시켜 cyclocondensation 시켰다

### 4) melanoma tumor development

7주령의 male C57BL/6 mice를 사용하고 온도는 25°C, 12시간 light/12시간 dark cycle을 유지하고 각 그룹당 20마리를 사용하고 control과 조사하고자 하는 분획을 농도별로 나누었다. -2, -4, -6일에 각쥐에 0.5 Emulphor EL-620을 하나만이나 조사하고자 하는 분획을 농도별로 섞어서 gavage에 의해 투여하였고 0일에 모든 쥐에 B16 melanoma cell을 투여하여 암을 발생시켰다. 매일 만질수 있는 크기의 암이 발생했는지를 조사하고 carcinogen투여 후 14 일이 지난후 몸무게를 측정하고 폐를 제거하여 melanoma colony를 세고 spleen에서 CD4와 CD8 cell의 분포를 조사하고 폐와 간에서 phase I, II enzyme의 활성을 측정하였다.

## 2. 연구결과

### 가. 유향처리 농도별 열무의 이화학적 특성 및 유용물질탐색

#### 1) 생육조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정

사전연구에 의하면 열무에는 HPLC정제시 isothiocyanate-like compound를 보유하고 이 분획은 Hepa 1c1c cell line에 투여시 quinone reductase inducing activity를 보유하고 있었다. 열무에 존재하는 quinone reductase inducing activity를 보유하고 있는 분획의 농도를 열무의 생육조건에 따라 변화시킬 수 있는지를 보았다.

토양의 조건을 달리하고 유향의 농도를 변화시켜 열무를 재배하여 다양한 처리에 대한 재배방법과 quinone reductase inducing activity의 관계를 측정 했다. 각 조건에서 재배한 열무를 수확하여 그중 100g을 취하여 80% methanol에 담그어 homogenization 시킨 후 soluble fraction을 evaporation시키고 물에 녹여 YM10 membrane을 이용한 ultrafiltration으로 분자량이 10,000 이하인 분획만을 모았다. 농축시킨후 용질의 무게를 측정하고 syringe filtration을 통해 멸균후 Hepa 1c1c cell 에 처리하여 quinone reductase inducing activity를 측정했다.

표 1-1 에서는 유향의 농도를 변화시켰을 때 quinone reductase inducing activity를

측정시 일반토양에 열무를 재배했을 때보다 황토에 재배시 활성이 높아졌고 유황의 농도가  $909\text{g}/\text{m}^3$ 까지는 quinone reductase inducing activity의 증가가 없었으나 유황의 농도가  $1,818\text{g}/\text{m}^3$ 로 증가시 일반토양에서 재배시에 비해 활성이 1.5배 증가되었다.

표 1-2 에서는 유황첨가시 토양의 산성화로 열무의 생육이 저해되므로 토양을 석회로 quinone reductase inducing activity를 측정했다. 황토에 석회를 첨가시 quinone reductase inducing activity가 약간 감소되었고 가장 quinone reductase inducing activity가 높았던  $1,818\text{g}/\text{m}^3$ 의 유황첨가후 석회를 넣어주었을 때도 quinone reductase inducing activity가 전혀 증가하지 않았다.

표 1-3 에서는 표 1 에서 가장 높은 유황의 농도인  $1,8188\text{ g}/\text{cm}^3$ 에서 Quinone reductase inducing activity가 가장 증가했으므로 유황의 농도를 더 증가시켜 Quinone reductase inducing activity를 측정했다. 유황의 농도가 증가시 생육이 현저히 감소했을 뿐만아니라 Quinone reductase inducing activity도 감소되어 유황의 농도가  $3,600\text{ g}/\text{cm}^3$ 에서는 유황을 첨가하지 않았을 때보다 Quinone reductase inducing activity가 41%로 낮아졌고 유황의 농도인  $1,8188\text{ g}/\text{cm}^3$ 에서의 19%만을 보유했다.

표 1-4 에서는 이전까지는 열무의 잎에서 Quinone reductase inducing activity를 측정했는데 열무의 줄기에도 Quinone reductase inducing activity가 존재하는지를 측정했다. 가장 Quinone reductase inducing activity가 높은 유황의 농도인  $1,8188\text{ g}/\text{cm}^3$ 에서 열무의 줄기는 잎에 비해 29%의 활성만을 보유하고 있었다.

열무의 엽수에 따른 Quinone reductase inducing activity를 유황농도별로 키운 열무에서 측정했다 (표 1-5). 가장 활성이 좋은 유황  $1,818\text{g}/\text{m}^3$ 에서 열무를 5엽 상태에서 수확시에 7엽 상태까지 기다리는 것보다 1.7배 활성이 높았고 이는 brocolli에서 얻어진 isothiocyanate역시 어린잎에서 활성이 높은 것과 일치 했다.

다음은 가장 활성이 좋은 유황  $1,818\text{g}/\text{m}^3$ 에서 열무를 재배시 생육의 저해를 완화하려고 유황을 처리후에 일반 복토를 달리하여 덮어준 후 열무를 재배하여 Quinone reductase inducing activity를 측정하였다. 표 6에서 보는 것과 같이 토양을 덮어주면 Quinone reductase inducing activity가 유황  $1,818\text{g}/\text{m}^3$ 에서 열무를 재배시보다 낮아졌는데 3 cm 토양부터는 활성이 50% 이하로 내려가므로 적용하기 어렵고, 2 cm 토양까지는 약간의 활성이 떨어지기는 하나 수확률을 고려시 괜찮은 것으로 보인다.

표 1-1. 유황의 농도에 따른 생육조건에서 재배한 열무에서 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g
황토+유황 1,818g/m <sup>3</sup>	8.0
황토+유황 909g/m <sup>3</sup>	5.2
황토+유황 455g/m <sup>3</sup>	5.0
황토단용	6.2
일반토양	5.4

표 1-2. 토양의 중화시의 생육조건에서 재배한 열무에서 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g
황토+유황 1,818g/m <sup>3</sup>	8.0
황토+유황 909g/m <sup>3</sup>	5.2
황토+유황 455g/m <sup>3</sup>	5.0
황토단용	6.2
황토+유황 1,818g/m <sup>3</sup> 와 기본시비의 2배의 석회	5.6
황토+유황 909g/m <sup>3</sup> 와 기본시비의 2배의 석회	5.9
황토+유황 455g/m <sup>3</sup> 와 기본시비의 2배의 석회	6.3
황토+ 기본시비의 2배의 석회	5.7

표 1-3. 유황의 농도에 따른 생육조건에서 재배한 열무에서 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g
유황 909 g/m <sup>3</sup>	3.6
유황 1,818 g/m <sup>3</sup>	5.8
유황 2,790 g/m <sup>3</sup>	2.6
유황 3,600 g/m <sup>3</sup>	1.1
일반토양	2.7

표 1-4. 열무의 부위에 따른 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g
유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 처리시의 잎	5.8
유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 처리시의 줄기	1.8

표 1-5. 열무의 엽수에 따른 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g	
	5잎	7잎
황토+유황 1,818g/m <sup>3</sup>	3.1	1.80
황토+유황 909g/m <sup>3</sup>	0.9	1.10
황토+유황 455g/m <sup>3</sup>	1.0	0.92
황토	1.3	0.39
일반토양	1.4	0.49

표 1-6. 열무재배시 유황첨가후 복토에 따른 Quinone reductase inducing activity

처 리	QR inducer specific activity/ g	%
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup>	6.4	100
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 와 토양 1.0 cm 첨가	5.9	91
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 와 토양 2.0 cm 첨가	4.7	74
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 와 토양 3.0 cm 첨가	2.7	42
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 와 토양 4.0 cm 첨가	3.9	60
황토+유황 1,818 g/m <sup>3</sup> 와 토양 5.0 cm 첨가	1.2	19

2) 생육시기와 재배조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정  
그림 2-1에서는 재배시기에 따른 유황열무의 quinone reductase inducing activity를 측정시 흥미롭게도 3월, 6월, 8월, 10월의 순으로 biological activity가 감소된다. 각 시기에 따른 재배량을 알수 없으나 3월 수확시 2월에 재배를 시작하므로 상대적으로 온도가 낮아 생육이 늦어 어린잎의 비율이 많기 때문이 아닌가로 추정된다. quinone reductase inducing activity를 발견한 브로콜리의 경우 싹이 튼 직후의 어린 잎의 경우 안전 성장을 했을 때 보다 10배 가량의 높은 활성을 보이는 것이 보고되었다.

그림 2-2에서는 토양에 유황을 처리시 재배량이 현격히 떨어지므로 2cm 가량의 복토를 덮고 기르고 (지난해에도 시행), 토양에 유기물비료를 첨가하여 유기농법으로 키워 활성을 비교시 복토를 덮은 것은 지난해와 유사하게 현격히 활성이 떨어지고 유기농법으로 키운 열무의 경우 현저히 활성이 증가한다.

그림 2-3에서는 재배환경을 바꾸어 비닐하우스와 유리온실을 비교시 유리온실이 평균값은 높으나 통계처리시에 유의적 차이를 두고 증가하지 않았다 (별 차이가 없음).

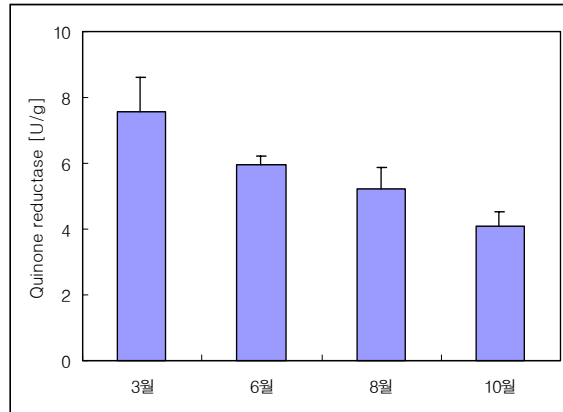


그림 2-1. 재배시기에 따른 유황처리 열무에서 Quinone reductase inducing activity

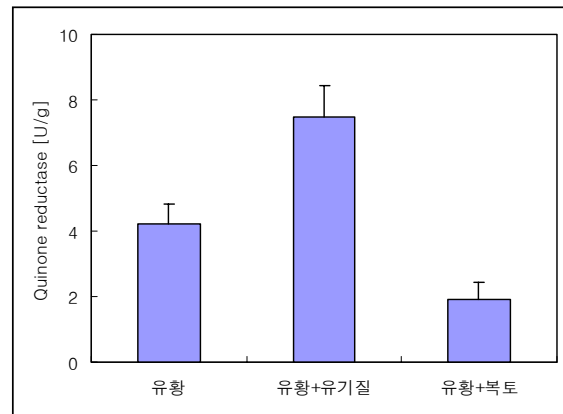


그림 2-2. 유황열무의 재배조건에 따른 Quinone reductase inducing activity

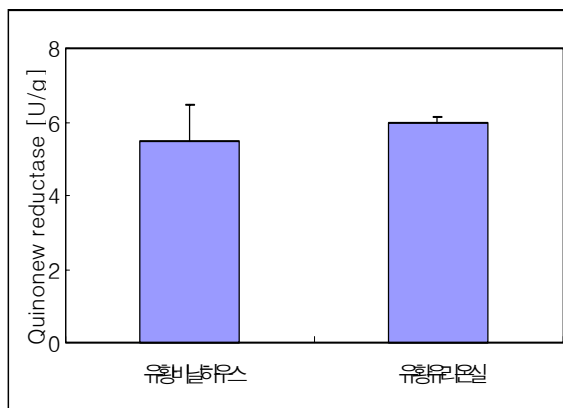


그림 2-3. 재배환경을 달리한 유황처리 열무에서 Quinone reductase inducing activity

3) 열무품종별과 재배조건에 따른 열무에서 quinone reductase inducing activity의 측정  
 그림 3-1에서는 품종에 따른 유향열무의 quinone reductase inducing activity를 측정시 품종 B, 품종 A, 품종 C의 순으로 biological activity가 감소된다. 모두가 같은 시기에 재배하여 수확하였으므로 품종에 따라 quinone reductase inducing activity가 상당히 차이가 나고 품종 B는 quinone reductase inducing activity이 품종 A, 품종 C보다 월등한 것을 알 수 있다.

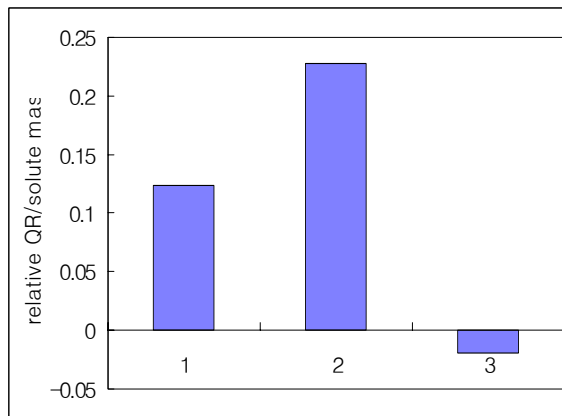
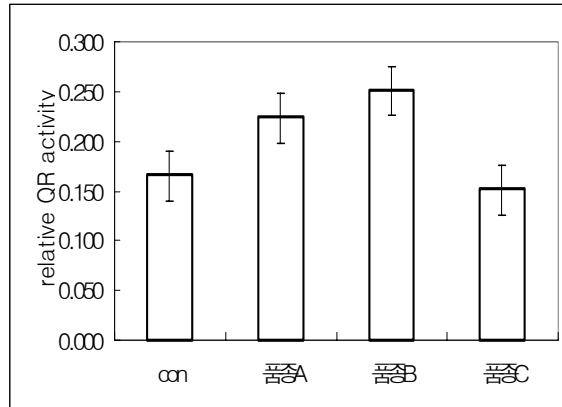


그림 3-1. 품종에 따른 유향처리 열무에서 Quinone reductase inducing activity

4) 유향처리 열무에서 유용물질의 탐색

A. saponine-like compound의 측정

열무를 유향함유 토양에서 재배시 산삼의 효력을 가진 채소를 얻을 수 있다는 문헌의 고증에 따라 재배된 열무 extract를 HPLC로 saponine-like compound를 검출할 수 있는 조건에서 측정하였다. 열무의 50% ethanol의 추출액에서 saponine-like compound



가 발견되었다. saponine standard의 경우 C18 column 사용, 1-10 min은 물, 10-50 min은 물에서 50% acetonitrile, 50-60 분은 50% acetonitrile로 용출하는 HPLC elution조건에서 retention time 41 분에서 발견되었고 각종 조건에서 수확한 열무추출액에서도 retention time 41 분에서 peak가 발견되었고 면적은 다음과 같다 (표 4-1). saponine-like compound는 황토에서 재배시에는 일반토양보다 1.3배 증가되었고 유황 처리시 급격하게 증가했다. HPLC에서 peak가 saponine과 유사한 위치의 peak인지 saponine인지는 차후 연구되어야 할 사항이나, 상기한 saponine-like compound가 유황 909g/cm<sup>3</sup>와 유황 1,818g/cm<sup>3</sup> 처리시 황토에서보다 485배와 550배의 증가를 보였다.

표 4-1. 열무에서 saponine-like compound의 양

처 리	Area of saponine-like compound / g
황토 + 유황 1,818g/cm <sup>3</sup>	11,000
황토 + 유황 909g/cm <sup>3</sup>	9,700
황토	20
일반토양	15

B. 열무에서 Quinone reductase (QR) inducing activity fraction (QR inducer)의 정제 현재까지의 결과에 의하면 QR inducer는 열무의 잎에 존재하고 열무를 1,818 g/cm<sup>3</sup>의 유황을 첨가한 황토에 재배시 가장 높았다. 열무의 재배를 촉진시키기 위해 유황 흡위에 2cm의 일반흙을 덮어주면 열무재배는 촉진되나 QR inducer의 양이 낮아지므로 QR inducer의 정제와 구조분석을 위해서는 1,818 g/cm<sup>3</sup>의 유황을 첨가한 황토에 재배한 열무의 잎을 사용했다. 열무에서 채취한 잎을 가지고 정제과정을 거치는데 1) 유기용매추출 2) evaporation 3) methanol에 녹여 분자량 10,000을 기준으로 낮은 분자량의 물질분리 4) 동결건조 5) silica thin layer chromatography 6) elution 7) evaporation 8) HPLC 9) evaporation 10) 2nd HPLC 11) evaporation을 거쳐 정제했다.

표 4-2 에서와 같이 HPLC후의 정제한 물질은 앞부분에 수용성의 2개의 peak와 브로콜리에서 발견된 sulforaphane, sulforaphene과 HPLC에서 유사한 시기에 나타나는 (유사한 구조를 가지고 있으리라 추정) peak A (retention time, 15 min) 가 1개있고 더늦은 시각에 출현하는 peak B (retention time, 25 min) 가 더 있었다. 2개의 peak를 HPLC를 한번더 거쳐 정제후 H<sup>1</sup>-NMR을 하여 분석하였다. standard compound로 phenylisothiocyanate, sulforaphane를 사용하였다.

peak A 는 H<sup>1</sup>-NMR에서 분석결과 sulforaphane과 유사한 구조가 얻어지나 CH<sub>2</sub>에 부착된 NCS group이 다른 물질로 치환되어있을 가능성도 있으나 H<sup>1</sup>-NMR이 H 주변환경에

대한 정보만 주므로 FT-IR등의 다른 정보가 필요하나 너무 양이 작아 시도하지 못했다. peak B의 경우 CH<sub>3</sub> peak가 없어서 대칭시 profile이 같아지므로 sulforaphane의 기본 구조에서 CH<sub>3</sub>이 없고 S=O를 중심으로 대칭구조가 가능하나 이 시료 역시 양이 작아 다른 분석을 하지 못해 완전한 구조규명은 할 수 없었다.

표 4-2. HPLC에서 retention time

화합물	Retention time (min)
sulforaphane	15.9/16.5
sulforaphene	16.0
유황 1,818g/cm <sup>3</sup> 처리시의 열무정제분획	16.9/25.4

5) 유황처리열무의 유용물질 [Quinone reductase (QR) inducing activity fraction (QR inducer)]의 물리, 화학적 특성조사

유황처리열무의 유용물질 [Quinone reductase (QR) inducing activity fraction (QR inducer)]의 구조분석에 어려움이 많아 구조규명은 되지 않았지만 추출액에 다양한 처리후에 활성을 조사했다. 유황처리열무를 80% methanol에서 homogenization 시킨 후 soluble fraction을 evaporation시킨후 물에 녹여 YM10 membrane을 이용한 ultrafiltration으로 분자량이 10,000 이하인 분획만을 모았다. 농축시킨후 용질의 무게를 측정하고 다양한 pH와 온도에 1일 배양후 pH 7.0으로 보정후 syringe filtration을 통해 멸균후 Hepa 1c1c cell 에 처리하여 quinone reductase inducing activity를 측정했다.

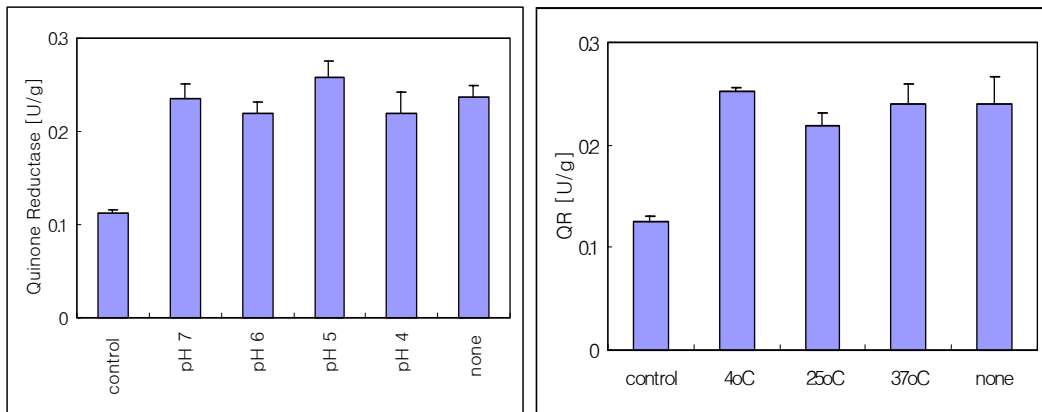


그림 5-1. 유황처리 열무추출액을 다른 pH 와 온도에서 배양 후 Quinone reductase inducing activity

6) mouse melanoma model에서 열무추출액의 효과

유황을 처리하여 재배한 열무추출액에는 brocolli에서 발견된 것과 유사한 sulforaphane analogue가 존재하고 이물질은 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도하므로 열무추출액을 구강투여한후 B16F10 melamoma cell로 유도한 mouse pulmonary tumor에 대한 영향을 보았다. 그림 6-1, 6-2 에서와 같이 열무추출액 투여는 B16F10 melamoma cell에 의한 pulmonary metastasis를 완전 치료할 수는 없지만 상당량 저해시켜주는 것으로 보인다. B16F10 melamoma cell 처리후와 열무추출액을 함께 투여후 spleen에서 CD4, CD8, NKT cell의 분포를 FACS로 분석시 열무추출액은 이러한 세포들의 수에 영향을 미치지 않았다 (그림 6-3). 또 B16F10 melamoma cell 처리후와 열무추출액을 함께 투여후 간 (그림 6-4) 과 폐 (그림 6-5)의 추출액에서 quinone reductase, glutathione-S-transferase를 조사시 열무추출액을 함께 투여시 quinone reductase는 현저히 증가했고, glutathione-S-transferase (그림 6-6)는 약간의 증가를 보여 열무추출액투여후 B16F10 melamoma cell에 의한 pulmonary metastasis는 간에서 phase II enzyme의 증가에 의한 것으로 보인다.

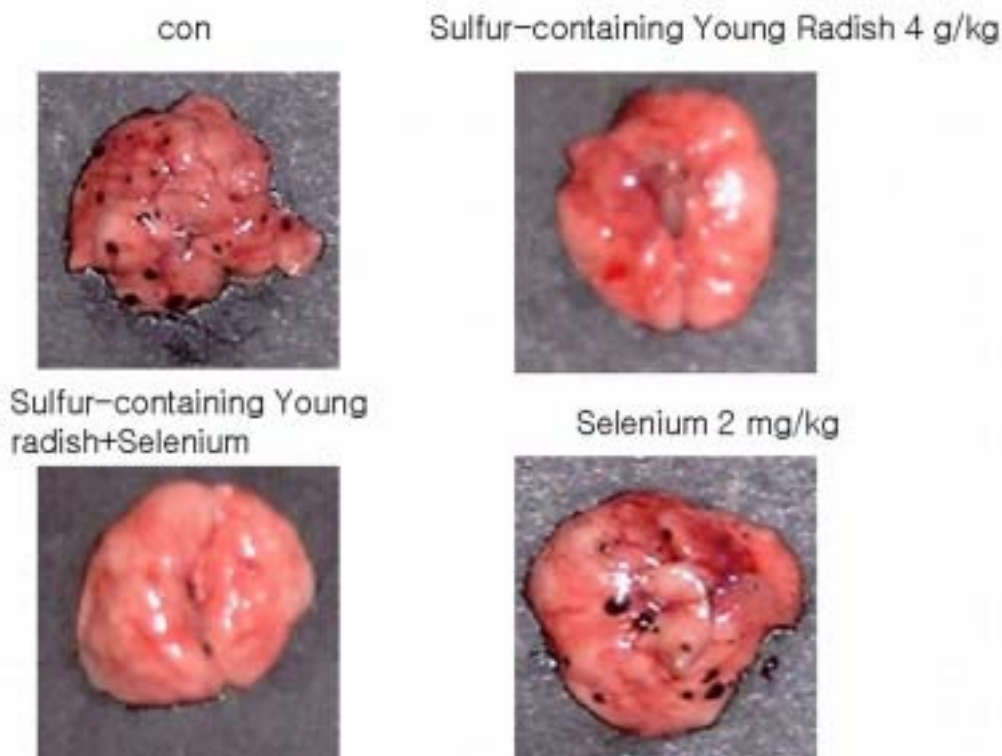


그림 6-1 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melamoma cell에 의한 pulmonary metastasis에 대한 영향

Melanoma-forming colony number in mouse lung

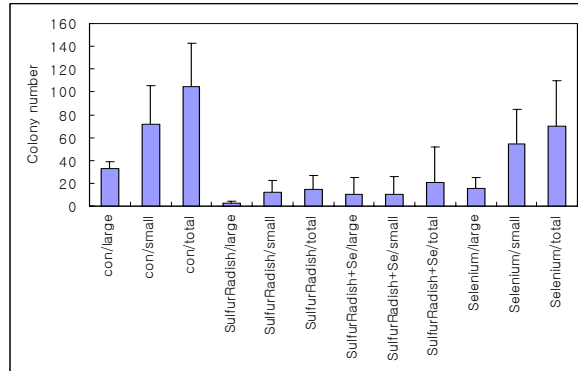


그림 6-2 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melanoma cell에 의한 pulmonary metastasis에 대한 영향

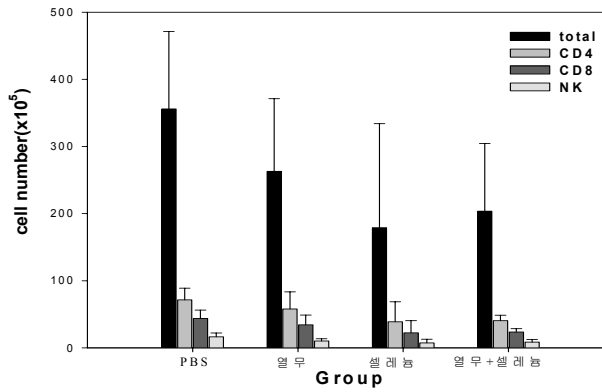


그림 6-3 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melanoma cell에 의한 pulmonary metastasis발생시 spleen에서 T cell의 수

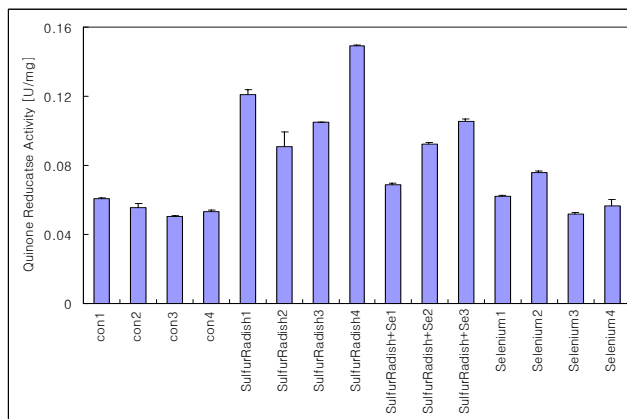


그림 6-4 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melanoma cell에 의한 pulmonary metastasis 발생시 liver에서 quinone redictase

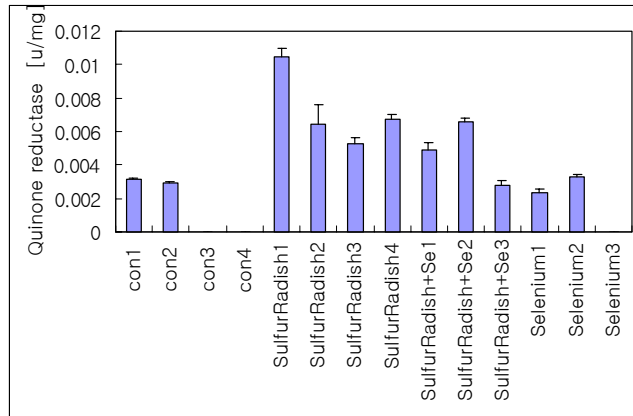


그림 6-5 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melamoma cell에 의한 pulmonary metastasis 발생시 lung에서 quinone reductase

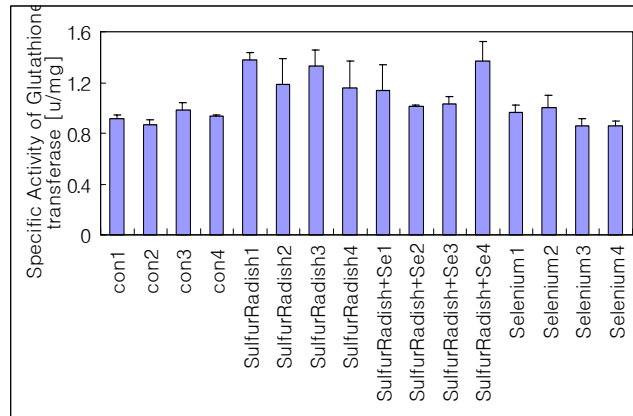


그림 6-6 열무추출액과 Se투여시 B16F10 melamoma cell에 의한 pulmonary metastasis 발생시 liver에서 glutathione-S-transferase

7) 열무추출액중의 active compound인 isothiocyanate의 효과: B16F10 melamoma cell에 대한 cytotoxicity

열무추출액중의 active compound로 생각되는 isothiocyanate가 B16F10 melamoma cell에 대한 cytotoxicity를 가지는지를 알기 위해 MTT assay와 trypan blue staining에 의한 viable cell count를 했다. 그림 7-1에서와 같이 sulforaphane 처리시 B16F10 melamoma cell의 viability가 낮아졌다. sulforaphane처리시에도 유사한 pattern을 보였다.

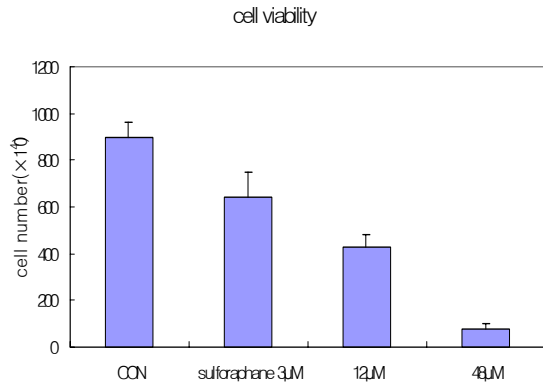


그림 7-1 열무추출액중의 active compound인 isothiocyanate (sulforaphane) 의 B16F10 melanoma cell에 대한 영향

8) 쥐에 장기 투여시의 열무추출액의 효과

유황을 처리하여 재배한 열무추출액에는 broccoli에서 발견된 것과 유사한 sulforaphane analogue가 존재하고 이물질은 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도한다. 일단은 유황처리 열무나 일반 열무만을 장기 투여시에 간에서 phase II enzyme 의 profile의 변화를 보았다. 그림 8-1에서와 같이 유황열무추출액을 장기 투여시에 glutathione-S-transferase (GST)의 경우 4 g/kg투여가 가장 활성증가가 높고 일반 열무추출액은 현저한 증가를 보이지 못했다. 그러나 quinone reductase(QR)의 경우 유황열무추출액 투여 시 현저한 증가를 보이고 유황처리열무의 농도를 1/10로 줄였을 때나 일반 열무추출액 투여 시에도 별 차이가 없는 증가를 보였다. 그림 8-2에서는 kidney 에서 GST, QR 모두 간보다 specific activity가 낮으나 유사한 양상을 보이고 있다.

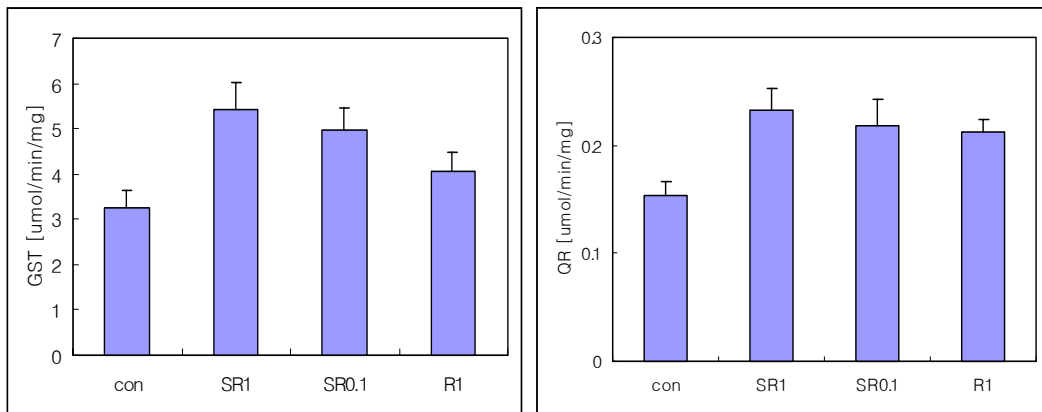


그림 8-1 유황처리열무추출액 (SR1, 4 g/kg; SR0.1, 0.4 g/kg) 과 열무추출액 (R1, 4g/kg)을 4주 투여후의 간에서 phase II enzyme 의 활성

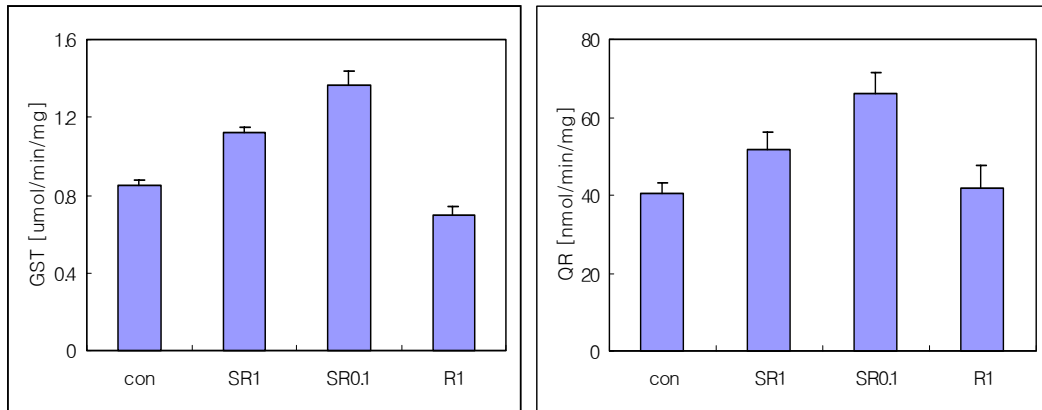


그림 8-2 유향처리열무추출액 (SR1, 4 g/kg; SR0.1, 0.4 g/kg) 과 열무추출액 (R1, 4g/kg)을 4주 투여후의 kidney에서 phase II enzyme 의 활성

9) CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 열무추출액의 효과

다음으로 유향처리열무 추출액을 구강투여한후 CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 열무추출액의 효과를 보았다. 그림 9-1에서와 같이 CCl<sub>4</sub>-처리시 간세포 전체에 bubble 같은 fatty change가 보이고 necrosis와 apoptosis가 일어나며 간세포가 죽게 된다. 유향열무처리시 간의 조직학적 변화를 보았을 때 CCl<sub>4</sub>-만 처리한 것보다는 훨씬 약한 정도의 fatty change가 일어나는 것을 알수 있다 (그림생략). 그림 9-2 에서는 CCl<sub>4</sub>-에 의한 necrosis가 유향열무추출액이나 sulforaphane 처리시 현저하게 줄어들는데 오히려 열무추출액의 농도가 80 mg/kg까지 낮아지면 그 효과가 감소하는 것으로 보아 높은 농도의 유향추출액 자체도 간독성을 유발할 가능성이 있는 것으로 보인다. sulforaphane의 경우 25-100 mg/kg이 2.5 mg/kg보다 더 나은 효과를 보였다 (그림 9-3). 유향열무추출액이나 sulforaphane을 CCl<sub>4</sub>-처리전이나 후에 투여시에 necrosis에 차이가 있는지를 보았는데 유향열무의 경우는 CCl<sub>4</sub>-처리전에 투여가 탁월한 효과를 보였다. 조직학적 변화와 더불어 생화학적 변화를 측정하기 위해 serum GPT level을 측정했다. 유향열무추출액이나 sulforaphane을 처리시 CCl<sub>4</sub>-에 의한 GPT level의 증가가 완전히 극복되지는 못하지만 현저히 복구를 시켜주고 유향열무추출액은 0.4 g/kg에서 sulforaphane은 25 mg/kg이 더 나은 효과를 보였다 (그림 9-4). 그림 9-5에서는 간에서 GST와 QR의 활성을 보았는데 유향열무추출액이나 sulforaphane을 처리시 CCl<sub>4</sub>-에 의한 GST와 QR의 활성의 저하를 복구시켜주는데 GPT level과는 달리 농도가 증가할수록 더 나은 효과를 보여주고 있다. 유향열무추출액이나 sulforaphane을 처리시 CCl<sub>4</sub>-에 의한 GPT level의 증가의 복구현상이 나중 투여보다 더 나은 것으로 보여 앞의 necrosis 결과와 일치하는 것으로 보인다. 그러나 유향열무추출액이나

sulforaphane을 처리시 CCl<sub>4</sub>-에 의한 QR의 활성의 저하를 복구시켜주는 것은 큰 차이가 없었다. 결론적으로 유허열무추출액이나 sulforaphane을 처리시 CCl<sub>4</sub>-에 의한 간 독성이 완전히는 아니지만 상당량이 복구되는 것으로 보인다.

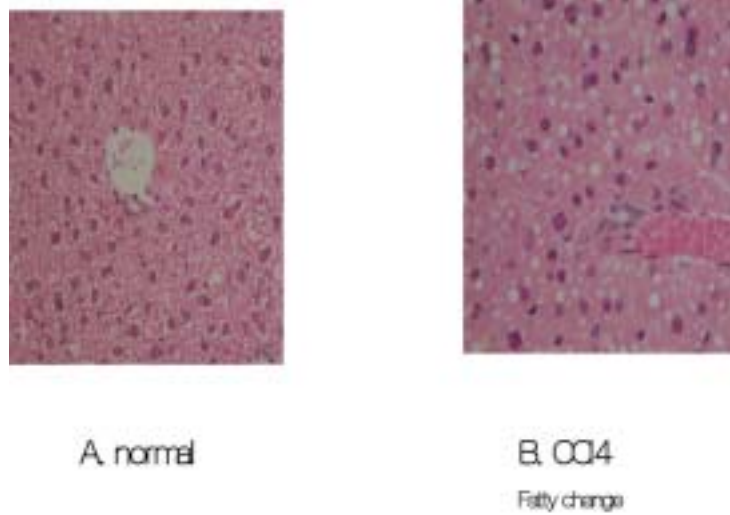


그림 9-1. CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 간의 조직학적 변화

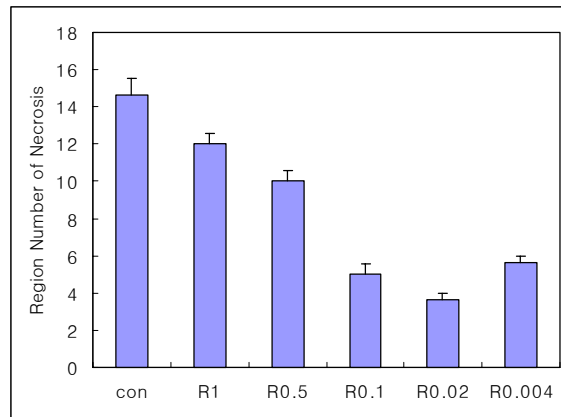


그림 9-2. CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 유허 열무추출액 (R1, 4 g/kg; R0.5, 2 g/kg; R0.1, 0.4 g/kg; R0.02, 80 mg/kg; R0.004, 1.6 mg/kg) 투여시 간에서 necrosis



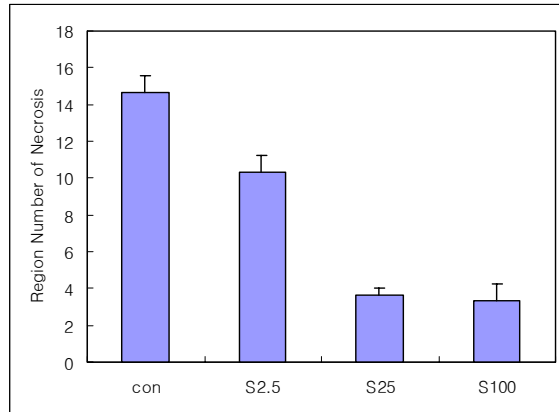


그림 9-3. CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 Sulforaphane 투여시 (S2.5, sulforaphane 2.5 mg/kg; S25, sulforaphane 25 mg/kg; S100, sulforaphane 100 mg/kg) 간에서 necrosis

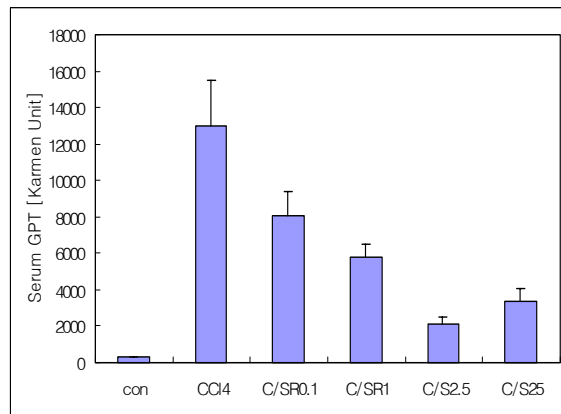


그림 9-4. CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 유황 열무추출액 (R0.5, 2 g/kg; R0.1, 0.4 g/kg)이나 sulforaphane (S25, sulforaphane 25 mg/kg; S100, sulforaphane 100 mg/kg) 투여시 간에서 GPT level

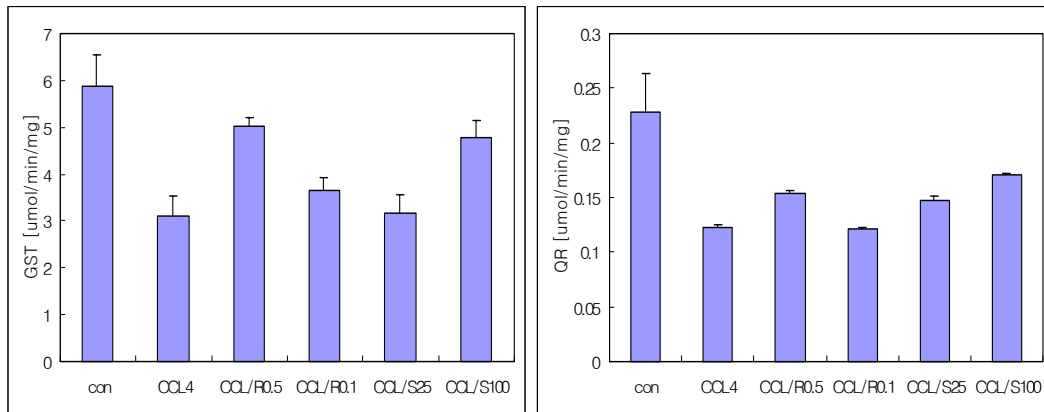


그림 9-5. CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity model에서 유황 열무추출액 (R0.5, 2 g/kg; R0.1, 0.4 g/kg)이나 sulforaphane (S25, sulforaphane 25 mg/kg; S100, sulforaphane 100 mg/kg)투여시 간에서 glutathione -S-transferase와 quinone reductase

10) 유황열무추출액중의 active compound인 isothiocyante의 효과: 파골세포분화

열무추출액중의 active compound로 생각되는 isothiocyanate인 sulforaphane, sulforaphane등의 antioxidant는 세포내에서 redox potential을 바꾸어 다양한 영향을 미칠수 있다. 세포내의 proliferation, inflammation등의 다양한 effect에 관여하는 transcription factor중 NF- $\kappa$ B는 redox potential에 민감하므로 이것이 관련된 세포내 작용중 성인건강에 많은 영향을 끼치는 골생성과 파괴기작에 sulforaphane이 영향을 끼치는 지를 조사했다.

그림 10-1에서와 같이 sulforaphane을 1-1000 nM 까지 처리시에 골형성에 관여하는 osteoblast cell의 분화의 지표가 되는 alkaline phosphatase를 측정시 현저한 영향을 주지 않아 sulforaphane은 골형성세포의 분화에는 영향을 주지 않는 것으로 보인다. sulforaphane을 골파괴에 관여하는 osteoclastogenesis에 대한 영향을 측정시 그림 10-2 에서 보여주는 것처럼 bone marrow cell 전체 (A), 정제된 osteoclast precursor cell (B)에서 모두 osteoclastogenesis를 억제시켰다. osteoclastogenesis의 측정은 세포를 깔아준 후 effector를 처리하고 6-7일후에 TRAP staining을 한다. sulforaphane의 농도를 높이면 억제효과가 뚜렷하나 cell viability가 현저히 감소되어 이른 시간의 신호전달에 관련된 현상을 보기에 적합하지 않아 고농도 (10 uM)로 2시간 처리후 다시 저농도(1 uM) 처리시 osteoclastogenesis에는 영향이 없는 것을 보았다 (D). 또 1-2일 까지 처리시에는 현저한 억제효과가 없고 지속적 처리에 의해 억제효과를 보인다(E). osteoclast precursor cell이 분화의 과정이 3일 정도 진행되고 난후에 처리시에

도 억제효과가 없어 sulforaphane의 억제효과는 osteoclast precursor cell에 나타나는 것으로 보인다(F). 그림 6-3에서는 sulforaphane의 억제효과가 osteoclast precursor cell표면의 수용체의 감소에 있는지를 보기 위해 osteoclast precursor cell에 sulforaphane을 처리하여 RT-PCR을 수행시 필수불가결한 factor인 RANKL, M-CSF의 수용체인 RANK, c-FMS모두가 mRNA수준에서 별 차이가 없었다. osteoclastogenesis 자세한 신호전달 기작을 보기 위해 homogenous cell인 RAW264.7 cell line에서도 유사한 효과가 있는 것을 확인하고, RANKL에 의해 활성화되어지는 osteoclastogenesis에서 중요한 transcription factor인 NF- $\kappa$ B activation을 보기 위해 inhibitory protein인 I $\kappa$ B의 degradation을 측정시 sulforaphane은 I $\kappa$ B의 degradation에도 별 영향을 미치지 않았다. 그러나 EMSA를 통해 NF- $\kappa$ B의 DNA binding을 측정시 sulforaphane은 DNA binding을 현저히 감소시키고 RANKL에 의해 이미 형성된 DNA binding역시 감소를 시키고 이는 과량의 DTT 투여로 회복되어지는 것으로 보아(그림생략), sulforaphane은 NF- $\kappa$ B의 DNA binding에 관여하는 factor의 thiol group과의 작용에 의해 NF- $\kappa$ B의 DNA binding을 억제하는 것으로 보인다. sulforaphane의 NF- $\kappa$ B activation에 대한 억제효과를 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B-mediated SEAP assay로 측정시 sulforaphane은 NF- $\kappa$ B activation을 현저히 억제한다(그림 10-3).

결론적으로 sulforaphane의 in vitro 연구는 sulforaphane이 골파괴과정에 관여하는 분화단계를 억제한다. in vivo와 in vitro 연구의 차이점이 있기는 하나, 열무의 추출액에 들어 있다고 생각되는 sulforaphane 유사체는 열무추출액을 장기 복용시 골파괴과정이 억제 되어질 가능성을 시사하고 있다.

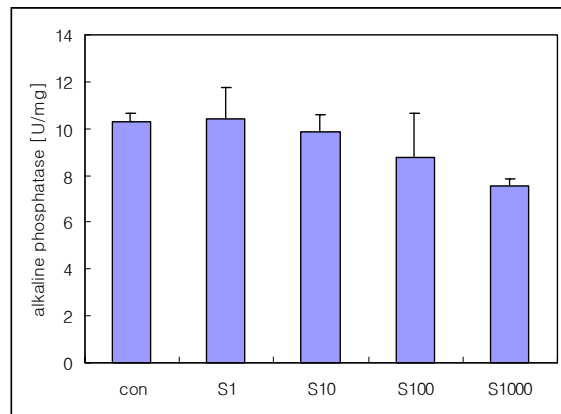
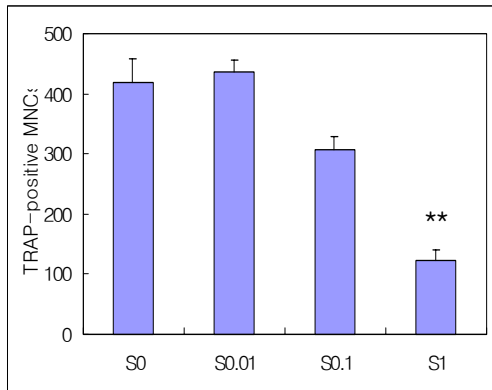
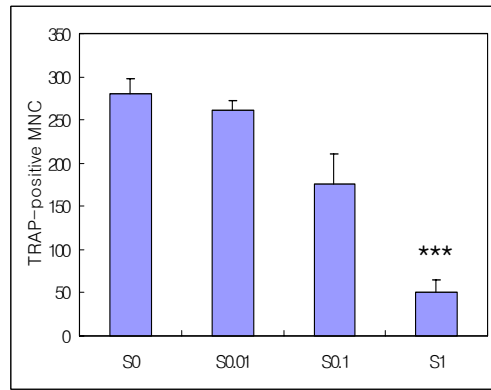


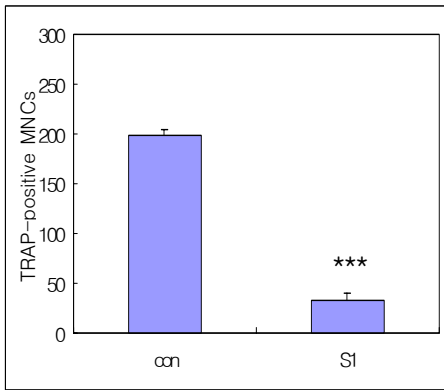
그림 10-1 열무추출액중의 active compound인 isothiocyanate (sulforaphane; S1, 1 nM; S10, 10 nM; S100, 100 nM; S1000, 1000 nM) 의 mg-63 human osteosarcoma cell line에서 alkaline phosphatase의 활성화에 대한 영향



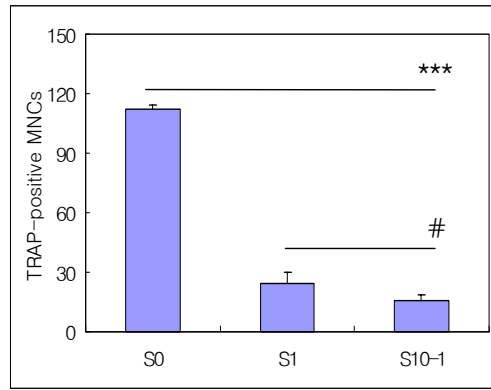
A



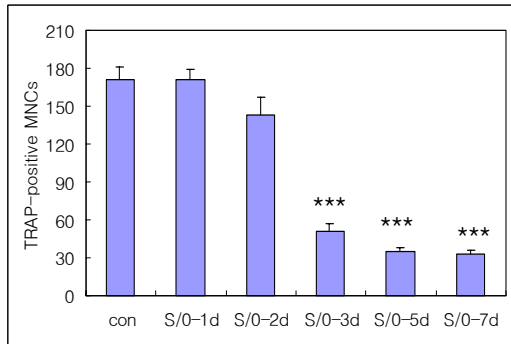
B



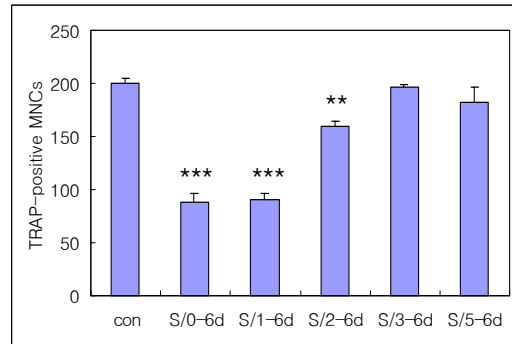
C



D



E



F

그림 10-2 열무추출액중의 active compound인 sulforaphane (S0.01, 0.01 uM; S0.1, 0.1 uM; S1, 1 uM; S10, 10 uM) 의 osteoclastogenesis에 대한 영향

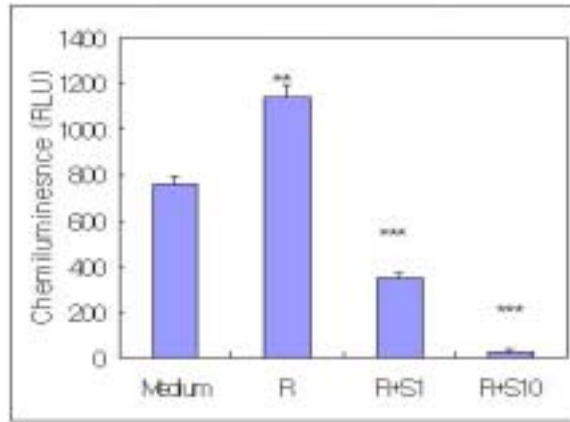


그림 10-2. 열무추출액중의 active compound인 sulforaphane의 RAW 264.7 cell에서 RANKL에 의한 NF-kappaB 활성화에 대한 영향

#### 11) 열무김치의 *in vivo* 활성 (murine melanoma model)

유황을 처리하여 재배한 열무추출액에는 broccoli에서 발견된 것과 유사한 sulforaphane analogue가 존재하고 이물질은 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도한다. 전년도에 유황처리 열무를 투여후에 폐에 흑색종을 일으킨후 암발생의 빈도와 정도에 대한 영향을 보았을때 유황열무추출액을 미리 투여시 암발생을 줄이지는 못하나 흑색종의 크기와 수를 감소시켜 암의 정도를 낮추는 것으로 보이고 이는 spleen에 의한 면역학적 작용보다는 간과 폐에서 quinone reductase, glutathione S-transferase 와 같은 해독효소의 생성을 통해서 인 것으로 결론지었다. 이와 같은 현상이 열무를 김치로 만들어 발효시킨 후에도 일어나는지를 열무김치와 열무물김치를 유황열무와 일반열무로 만들어 조사하였다. 김치는 실험의 편이상 분말로 만든후 주사기로 일정량을 쥐의 위에 투여하고 흑색종을 유발시키고 전시험과 같은 분석을 하였다. 그림 11-1은 총 2회에 걸쳐 10마리를 한그룹으로 하여 5마리씩 분석하여 4번 분석의 대표결과인데 유황열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg) 과 유황열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여 후, B16F10에 의한 melanoma 유발 14일후의 폐의 사진을 보면 개체간의 차이가 있기는 하나 PBS투여와 큰 차이가 없다. B16F10에 의한 melanoma 유발의 정도가 심하면 차이가 뚜렷하지 않을 수 있어 작은 숫자의 B16F10을 투여하여 melanoma 유발시에도 차이를 보이지 않았다. 그림 11-2는 그림 11-1에서 보이는 흑색종의 colony를 현미경하에서 크기별로 분류하여 세어 표시하였는데 사진으로 본 것과 일치한 결과를 보이고 있다. 그림 11-3은 총 2회에 걸쳐 10마리를 한그룹으로 하여 5마리씩 분

석하여 4번 분석의 대표결과인데 유황열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여 후, B16F10에 의한 melanoma 유발 14일 후의 spleen에서 면역세포의 수를 세었다. 면역세포는 CD4 T cell, CD8 T cell, NK T cell, B cell을 surface marker antibody를 사용하여 FACS로 분석하였는데 각 군에서 현저한 차이를 보이지 않았다. 이는 유황열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여한 것은 쥐에 면역학적 활성을 유발시키지 못했고 이는 부분적으로 위의 김치추출액투여가 흑색종 발생에는 영향을 미치지 못하는 것을 설명하고 있다.

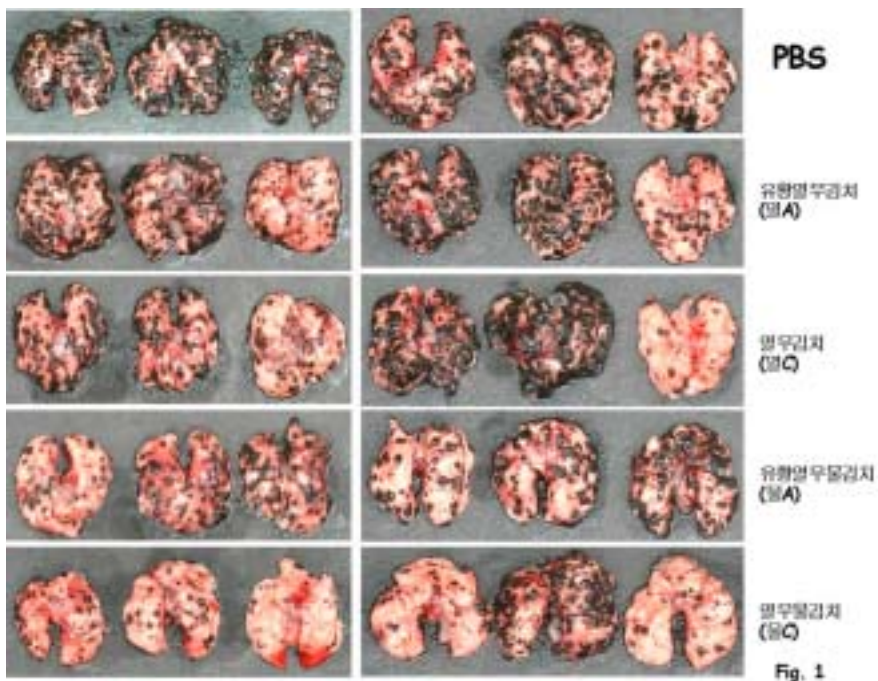


그림 11-1 유황열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여 후, B16F10에 의한 melanoma 유발 14일 후의 폐의 사진

## Colony number

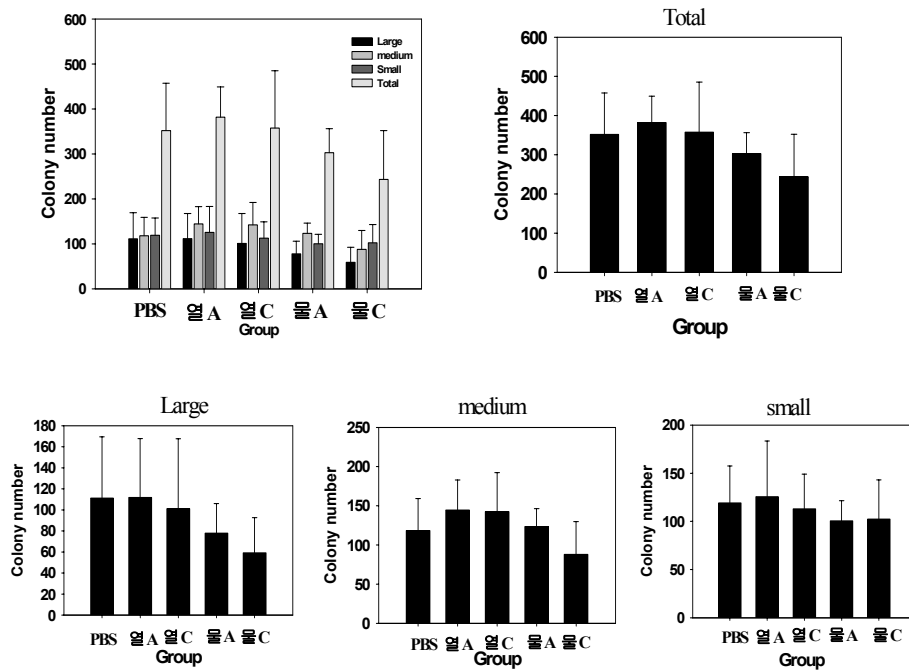


Fig. 1

그림 11-2 유향열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유향열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여 후, B16F10에 의한 melanoma 유발14일 후의 폐에서 melanoma colony의 수

## Spleen cell number

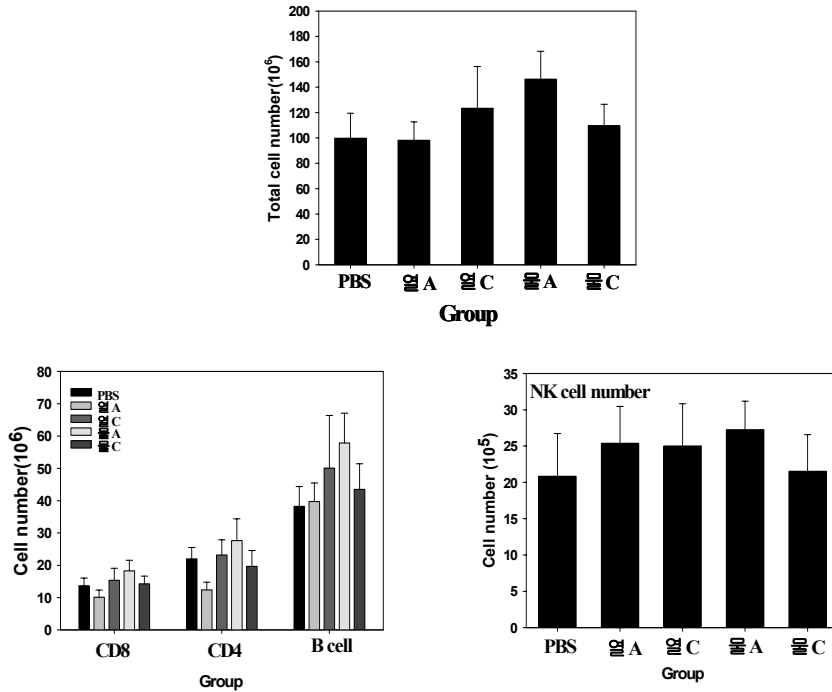


Fig. 2

그림 11-3 유향열무김치와 열무김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유향열무물김치와 열무물김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 2주 투여후, B16F10에 의한 melanoma 유발14일후의 spleen에서 면역세포의 수

### 12) 열무김치의 *in vivo* 활성화 (murine colon cancer model)

유향열무추출액에는 sulforaphane analogue가 존재하고 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도한다. 유향열무김치를 실험의 편의상 분말로 만든후 주사기로 일정량을 쥐의 위에 투여하고 대장암 (colon cancer)를 유발시키고 분석을 하였다. 그림 12-1은 실험과정을 요약하였다. 그림 12-2는 총 2회에 걸쳐 10마리를 한 그룹으로 하여 5마리씩 분석하여 4번 분석한 대표결과인데 유향열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유향열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사 후 29일간 tumor cell의 크기를 부피로 측정하였다. CT-26에 의한 colon cancer유도 후 측정된 tumor cell의 크기는 유향열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유향열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg), 모두가 PBS



투여와 큰 차이는 없다. 그림 12-3은 유황열무김치와 열무김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액(열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer 유도 29일 후에 spleen cell의 수를 세었다. 전체 세포수는 군사이에 큰 차이를 보이지 않았다. 면역세포중 CD4 T cell, CD8 T cell, NK T cell은 현저한 변화가 없었지만, B cell과 neutrophil의 경우 유황열무김치, 열무김치, 열무물김치 추출액을 투여한 군에서 증가되었다. 결과를 종합해 보면 유황열무김치, 열무김치, 열무물김치 추출액 투여가 암세포의 크기를 현저하게 줄이지는 못하여 이 모델에서는 암발생 억제효과가 없는 것으로 보인다.

colon cancer model 에서 열무 extract의 chemo-prevention effects.

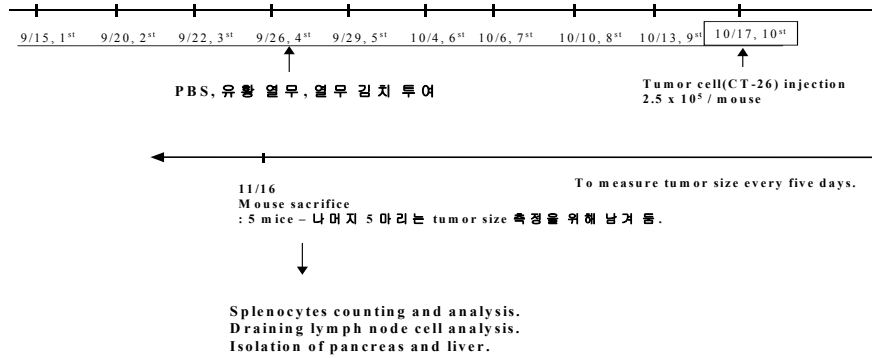


그림 12-1. 유황열무김치와 열무김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg) 투여후 colon cancer model의 요약도

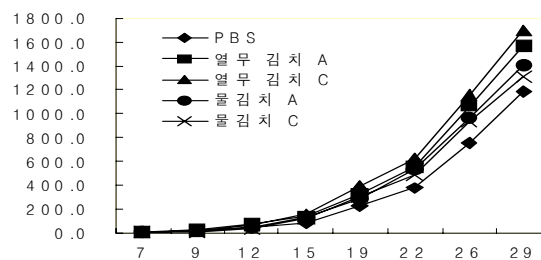


그림 12-2 유황열무김치와 열무김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유황열무물김치와 열무물김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사 후 29일간 tumor cell의 크기

Spleen cell number

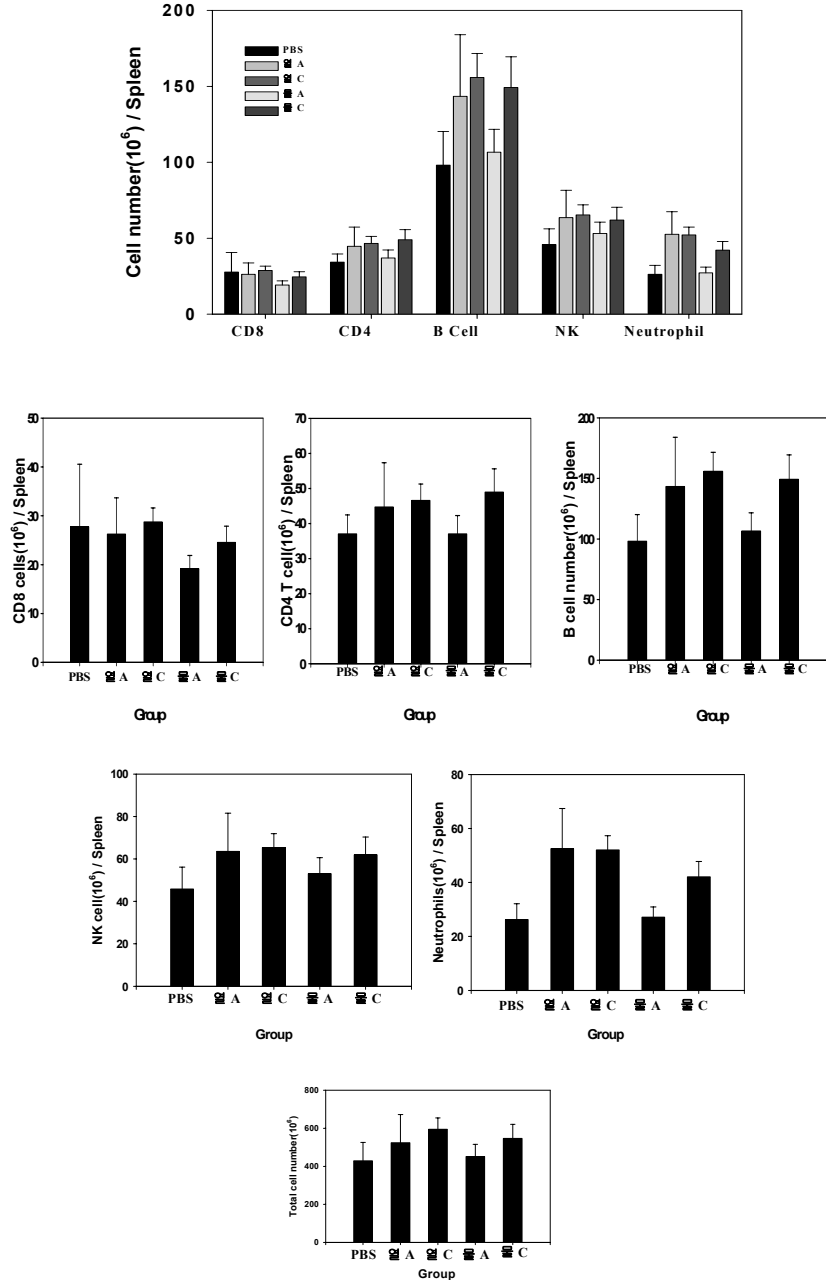


그림 12-3 유향열무김치와 열무김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)과 유향열무물김치와 열무물김치추출액 (열A, 625 mg/kg; 열C, 625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사후 29일 후 spleen cell의 수

13) 유황열무추출액의 *in vivo* 활성 (murine colon cancer model)

유황열무추출액에는 sulforaphane analogue가 존재하고 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도한다. 전시험의 결과에 의하면 유황열무추출액은 murine melanoma model에서 효과를 보였으므로 colon cancer model에 유황열무추출액과 유황열무김치추출액을 다시 투여하여 암발생 억제 효과가 유황열무가 김치로 전환되면서 약화되었는지를 확인하여 보았다. 유황열무추출액과 유황열무김치를 실험의 편의상 분말로 만든 후 주사기로 일정량을 쥐의 위에 투여하고 대장암 (colon cancer)를 유발시키고 분석을 하였다. 그림 13-1는 유황열무김치추출액 (625 mg/kg)과 유황열무추출액 (625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사 후 29일간 tumor cell의 크기를 측정하였다. 유황열무김치 추출액이 PBS투여와 별 차이가 없는데 비해, 유황열무추출액은 암발생에는 영향을 미치지 못하나 암의 크기를 감소시켰다. 그림 13-2에서는 유황열무추출액 투여쥐의 spleen cell에서 면역세포 중 CD4 T cell, CD8 T cell, NK T cell, NK cell, B cell과 neutrophil 모두가 증가되어 면역기능의 활성화가 암세포의 크기를 줄이는데 부분적으로 기여 했다고 할 수 있다.

Tumor size

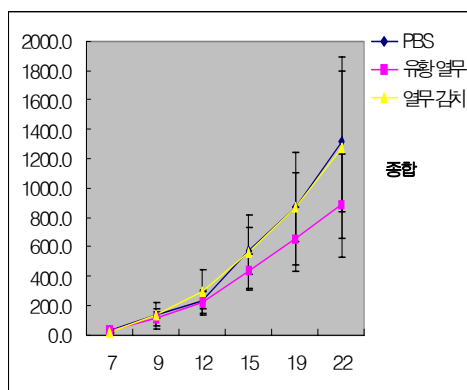


그림 13-1 유황열무김치추출액(625 mg/kg)과 유황열무추출액 (625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사 후 29일간 tumor cell의 크기

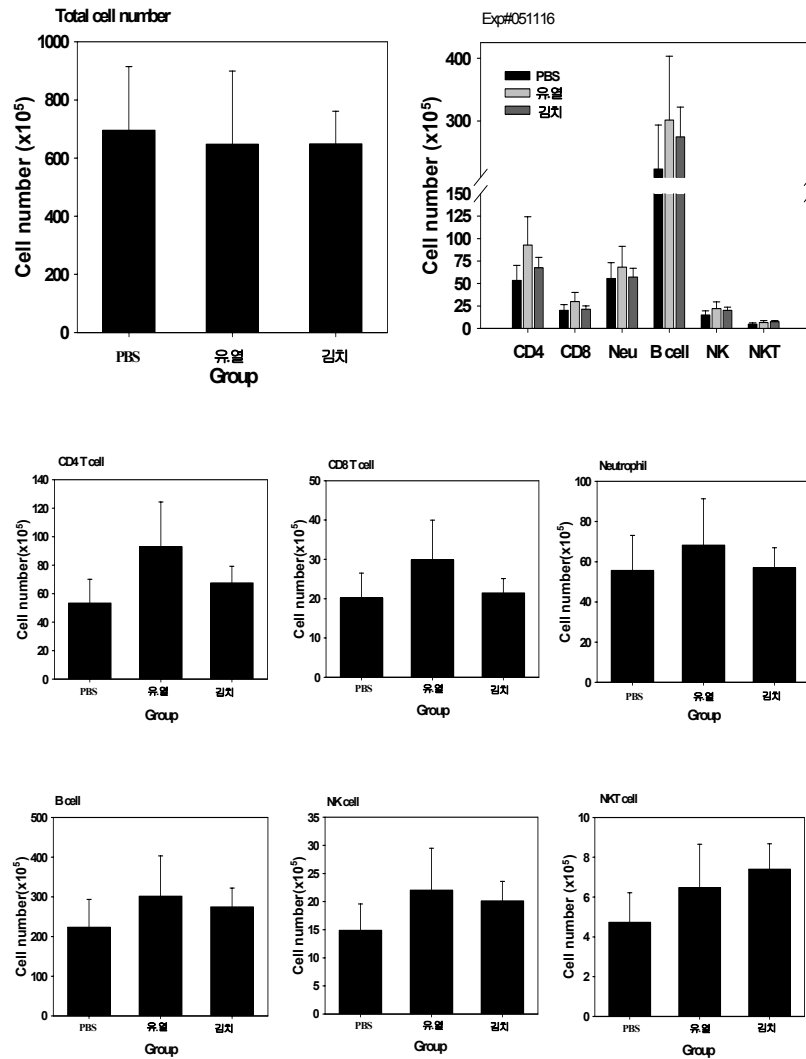


그림 13-2 유허열무김치추출액(625 mg/kg)과 유허열무추출액 (625 mg/kg)을 10번 투여 후, CT-26에 의한 colon cancer를 피하에 주사후 29일 후 spleen cell의 수

14) 유허열무 *in vivo* 투여시 간에서 phase II enzyme 의 유도

유허을 처리하여 재배한 열무추출액에는 broccoli에서 발견된 것과 유사한 sulforaphane analogue가 존재하고 이물질은 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase를 유도한다. 세포에 투여시에 유도되는 현상과 유사하게 *in vivo*로 쥐에 먹었을 때도 간에서 유도되는지를 보기 위해 유허열무추출액(625 mg/kg)과 유허열무김치추출액(625 mg/kg)을 4주 투여 후, 쥐의 간에서 phase II enzyme 의 활성을 측정했다. 유허열무추출액을 장기 투여시에 glutathione-S-transferase (GST)의 경우 활성증가가 높고 유허열무김치추

출액은 현저한 증가를 보이지 못했다. quinone reductase(QR)의 경우 유황열무추출액 투여시 역시 현저한 증가를 보이고 유황열무김치추출액 투여시에는 큰 차이가 없는 증가를 보여 앞서의 murine melanoma model, colon cancer model에서는 유황열무김치추출액 투여가 효과가 작은 것을 부분적으로 설명하고 있다.

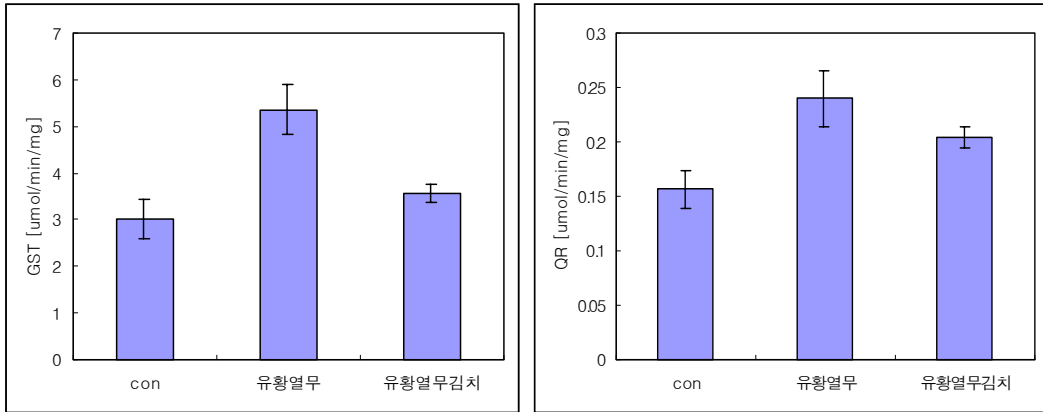


그림 14-1. 유황열무추출액 (625 mg/kg)과 유황열무김치추출액 (625 mg/kg)을 4주 투여 후의 쥐의 간에서 phase II enzyme 의 활성

### 제3절 기능성 열무를 이용한 김치제조 기술개발 및 상품화 연구

본 절에서는 유향처리 토양에서 열무를 재배함으로써 열무의 기능성 증진효과를 검토한 후 기능성 열무를 이용한 기능성 증진 김치의 개발 가능성을 검토하였다. 우선 열무김치의 제조 표준화를 한 후 기능성열무김치의 개발을 위하여 열무의 특성 및 암예방 기능을 검토하였다. 또한 기능성 증진 열무김치의 제조를 위하여 부재료 배합비에 따른 관능평가 및 암세포성장 억제효과를 검토하였다.

#### 제 1 세부 : 열무김치 제조방법의 표준화

##### 1. 연구수행 방법

##### 가. 열무의 영양성분 분석 및 열무김치 제조의 표준화

##### 1) 열무의 일반성분 분석 및 영양학적 측면 검토

재배된 열무의 일반성분 분석은 AOAC 법에 준하여 실험하였다. 즉 수분은 105℃ 상압가열 건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet추출법, 조회분은 550℃ 직접회화법으로 측정하였다.

##### 2) 열무김치의 pH 및 적정산도

제조한 열무김치의 pH는 시료 10 g에 증류수 40 ml를 가하여 homogenizer로 마쇄 (8,000 rpm, 5 min)하고 여과한 후, 그 액의 일부를 취하여 pH meter (Corning 220, U.S.A) 로 측정하고, 적정산도는 마쇄여액 20 ml를 취하여 pH가 8.3이 될 때까지 소요된 0.1N-NaOH의 양을 아래의 계산식에 따라 lactic acid 환산법으로 계산하여 표시하였다.

$$\text{Titration acidity (lactic acid, \%)} = \frac{\text{of 0.1N NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 0.09}{\text{Sample(g)}} \times 100$$

##### 3) 열무김치 원, 부재료의 배합비에 따른 레시피 확보

먼저 문헌조사(조리서, 지역별 열무김치의 특성조사, 학술지 등)를 통하여 열무김치의 원·부재료의 배합비와 발효 조건 및 레시피를 확보한 후 이를 토대로 열무김치의 표준화 작업을 수행하였다.

##### 4) 발효조건별 열무김치(절임김치 및 물김치)의 제조조건 검토

저장온도를 달리하여 열무김치를 저장한 후 숙성시기별로 분리하여 맛과 기능을 검토하여 표준화 작업을 마친다.

#### 나. 표준화 열무김치의 생리기능성 검증

열무김치에서 암예방 효과를 확인하기 위해서는 표준화된 열무김치를 발효하여 활성이 가장 컸던 시기의 열무김치를 냉동건조하고, 냉동 건조된 시료는 hexane으로 3회 추출하고 잔사물을 2배의 메탄올로 95°C에서 환류냉각기를 사용하여 3회 추출하였다. 회전식 진공농축기(Buchi oil & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 용매를 제거하고 돌연변이 유발 억제실험(Ames test) 및 암세포 증식 억제 실험(MTT assay)을 수행하였다.

##### 1) Ames test

*Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100 및 TA98 균주를 실험에 사용하며, 이들 실험균주들은 새로운 frozen permanent가 준비되었을 때나 매 실험직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. 돌연변이원으로는 AFB<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>), MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등을 사용하며 한편, S9 mixture 조제를 위해 약 200 g의 웅성 Sprague-Dawley rat의 간 효소활성을 위하여 Aroclor 1254를 corn oil 1 당 200 mg의 농도로 희석하여 1회 복강 주사하고(500 mg/kg) 5일 후에 간을 적출하였다. 4°C 무균 상태에서 적출한 간을 0.15M KCl로 수 회 세척하고 간 무게의 3배량의 0.15M KCl 용액을 가하여 homogenizer(Potter-Elvehjem apparatus, USA)에서 균질화하고, 9000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액인 S9 fraction을 얻어 Cryo tube에 1~2 씩 분주하여 dry ice에서 급속 동결한 후 -70°C deep freezer에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 준비한 S9 fraction(10%)을 mgCl-KCl salts(2%), 1M glucose-6-phosphate(0.5%), 1M NADP(4%), 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 및 멸균수와 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다. 항돌연변이 실험에서는 S9 mix 0.5 (간접돌연변이인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5 (직접돌연변이인 경우), 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/) 0.1, 희석된 시료(50  $\mu$ l)와 돌연변이 유발물질(50  $\mu$ l)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후 37°C에서 30분간 예비배양하였다. 45°C의 top agar 2 씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다. 돌연변이 억제 효과의 정도 (inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times [(a-b) \div (a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다.

##### 2) MTT assay

동물세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well이 되게 180  $\mu$ l 분주하고 시료를 일정농도로 제

조하여 20  $\mu$ l 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 20  $\mu$ l를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550  $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150  $\mu$ l를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

3) 열무김치의 *in vitro*의 항암효과 및 세포독성실험(MTT test, cell growth inhibition test, viability test)

가) 암세포배양

실험에 주로 사용되는 암세포는 인체위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)와 인체 대장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell)로 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 사용하였다. AGS 위암세포와 HT-29 결장암세포는 100 units/의 Penicillin-Streptomycin 과 10%의 FCS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 cell culture flask에 5 씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

나) 암세포 증식억제 실험

암세포배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 인체위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)와 인체 대장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell)는 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고, 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FCS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이틀에 한번씩 배양액을 교체하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료는 2일 마다 10  $\mu$ l/ medium씩 농도별 첨가한 새로운 배지로 교체하고 배양 6-7일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제효과를 관찰하였다. 또는 동물세포를 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>4</sup> cell/well이 되게 180  $\mu$ l 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20  $\mu$ l 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수 5 mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 20  $\mu$ l를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550  $\times$ g에서 10 분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150  $\mu$ l



를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

암세포배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 AGS 및 HT-29 암세포는 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고, 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FCS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이틀에 한번씩 배양액을 교체하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료는 2일마다 10 µl/ medium씩 농도별 첨가한 새로운 배지로 교체하고 배양 6일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제효과를 관찰하였다.

#### 다) MTT assay

동물세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cell/well이 되게 180µl 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 µl 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액 20 µl를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550 ×g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150µl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

#### 라) 세포 독성 실험 (Viability test)

김치시료의 직접적인 세포 독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 하였다. 1회용 24 well plate에 20% HFCS(heat inactivated fetal calf serum : Gibco Lab., USA)을 함유한 EMEM(Eagle's minimal essential medium: Gibco Lab., USA)배지 1에 5×10<sup>4</sup> cell/plate가 되게 seeding하였다. 여기에 20 µl의 김치 시료를 넣어서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포 50 µl를 0.2% trypan blue 용액 50 µl와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수, 염색되어진 세포(non-viable cell)수 및 염색되지 않은 세포(viable cell)수를 측정한다. 김치 시료를 넣지 않은 대조 세포군과 비교하여 viability 비율을 계산하였다.

$$\text{Viable cell(\%)} = \frac{\text{Total number of viable cells per of aliquot}}{\text{Total number of cells per of aliquot}} \times 100$$

## 2. 연구결과

### 가. 열무김치의 표준화 연구

#### 1) 문헌에 의한 열무김치 및 열무물김치의 표준화

조리서와 관련 문헌에서 사용되고 있는 다양한 재료들 중 사용빈도가 50% 이상인 부재료와 양념을 사용하였다. 열무김치 담금시 사용된 부재료로는 파와 홍고추가, 양념류로는 고춧가루, 마늘, 생강, 젓갈이 이에 속했다. 열무물김치의 경우, 부재료로는 파, 풋고추, 홍고추가, 양념류로는 마늘, 생강, 전분이 사용되었다. 이외에도 미나리, 양파, 통깨, 식초 설탕 등이 열무김치와 열무물김치를 담글 때 사용되기도 하였다. 열무김치는 주로 여름에 즐겨 먹는 김치로 부재료와 양념류의 종류에 따라 또는 지역과 선호도에 따라 김치의 맛이 달라질 수 있다. 이러한 요건에 의한 김치의 담금 및 맛의 차이를 고려한 대표적인 열무김치와 열무물김치의 재료배합비의 표준값을 구하였다.

열무김치는 조리서와 참고문헌에서 얻어진 28개의 자료 중 최대값과 최소값을 제외한 값으로 평균값과 이들 사이의 표준편차를 구하여 문헌에 입각한 열무김치의 담금 및 재료비의 표준값으로 하였다. 열무김치 담금시 사용한 부재료와 양념의 배합비는 절인 열무 100에 대해 파 8.0±3.8, 마늘 2.9±1.3, 생강 1.6±0.7, 홍고추 7.0±1.7, 고춧가루 4.2±1.2, 젓갈 3.7±0.5이었다(표 1).

표 1. Standardized ingredients ratio of leaf radish kimchi from literatures

Ingredients	Weight (g)
Leaf radish	100
Green onion	8.0 ± 3.8
Crushed garlic	2.9 ± 1.3
Crushed ginger	1.6 ± 0.7
Red pepper powder	4.2 ± 1.2
Red pepper	7.0 ± 1.7
Anchovy juice	3.7 ± 0.5
Final salt concentration (%)	2.5

열무물김치는 참고문헌이 열무김치에 비해 적어 조리서와 참고문헌에서 15개의 자료를 이용하여 열무김치에서와 같이 표준값을 구하였다. 열무물김치는 열무김치와는 달리 다량의 수분이 첨가되므로 열무물김치의 담금 및 재료는 첨가된 국물의 양을 기준으로 표준화를 하였다. 즉 사용한 부재료와 양념의 배합비는 물 100에 대해 절인 열무 50.6±10.8, 파 3.3±1.3, 마늘 3.0±0.7, 생강 1.5±0, 풋고추 3.3±1.9, 홍고추 2.4±1.3, 전분 1.5±0.6 이었다(표 2). 열무물김치는 담글 때 열

무김치와는 달리 짓갈이 첨가되지 않았다.

열무김치와 열무물김치의 담금방법의 표준화는 문헌에 명시된 담금 방법 중 사용 빈도가 높은 담금방법에 의하여 이루어졌다. 열무김치와 열무물김치의 담금 방법을 그림 1에 나타내었다. 열무김치 담금시, 열무는 익세고 시든 잎은 떼어내고 뿌리는 칼로 굽어서 손질한 후 소금을 뿌려 1시간 동안 절이고, 파는 어슷하게 썰고 홍고추는 꼭지를 떼고 반을 갈라 씨를 빼 후 잘게 썰어 믹서기에 갈아서 다진 마늘과 생강과 함께 준비해 둔다. 절인 열무는 수돗물로 3회 씻고 1시간 동안 물기를 빼 후 준비된 재료 및 양념과 함께 버무려 고루 섞은 후 염도는 소금으로 2.5%로 조절하여 보관하였다. 열무물김치의 담금 방법에서 열무는 열무김치에서와 같이 깨끗이 손질한 후 소금을 뿌려 절인다. 파, 풋고추, 홍고추는 약 4 cm 길이로 채 썰고 마늘과 생강은 다지고, 전분으로는 밀가루 풀을 준비해 둔다. 절인 열무는 수돗물로 3회 씻고 1시간 동안 물기를 빼 후 준비된 재료 및 양념과 함께 버무려 고루 섞은 후 식힌 밀가루풀물을 넣는다. 염도는 열무김치에서와 같이 소금으로 2.5%로 조절하였다. 소금 절임 방법으로는 직접 뿌리는 방법과 소금물에 정리는 방법이 있으나, 열무김치는 전자의 경우 사용 빈도가 더 높았다.

표 2. Standardized ingredients ratio of leaf radish *mul-kimchi* from literatures

	Ingredients	Weight (g)
Liquid part	Water ( )	100
	Starch	1.5 ± 0.6
Solid part	Leaf radish	50.6 ± 10.8
	Crushed garlic	3.0 ± 0.7
	Crushed ginger	1.5 ± 0
	Green onion	3.3 ± 1.3
	Green pepper	3.3 ± 1.9
	Red pepper	2.4 ± 1.3
	Final salt concentration (%)	2.5

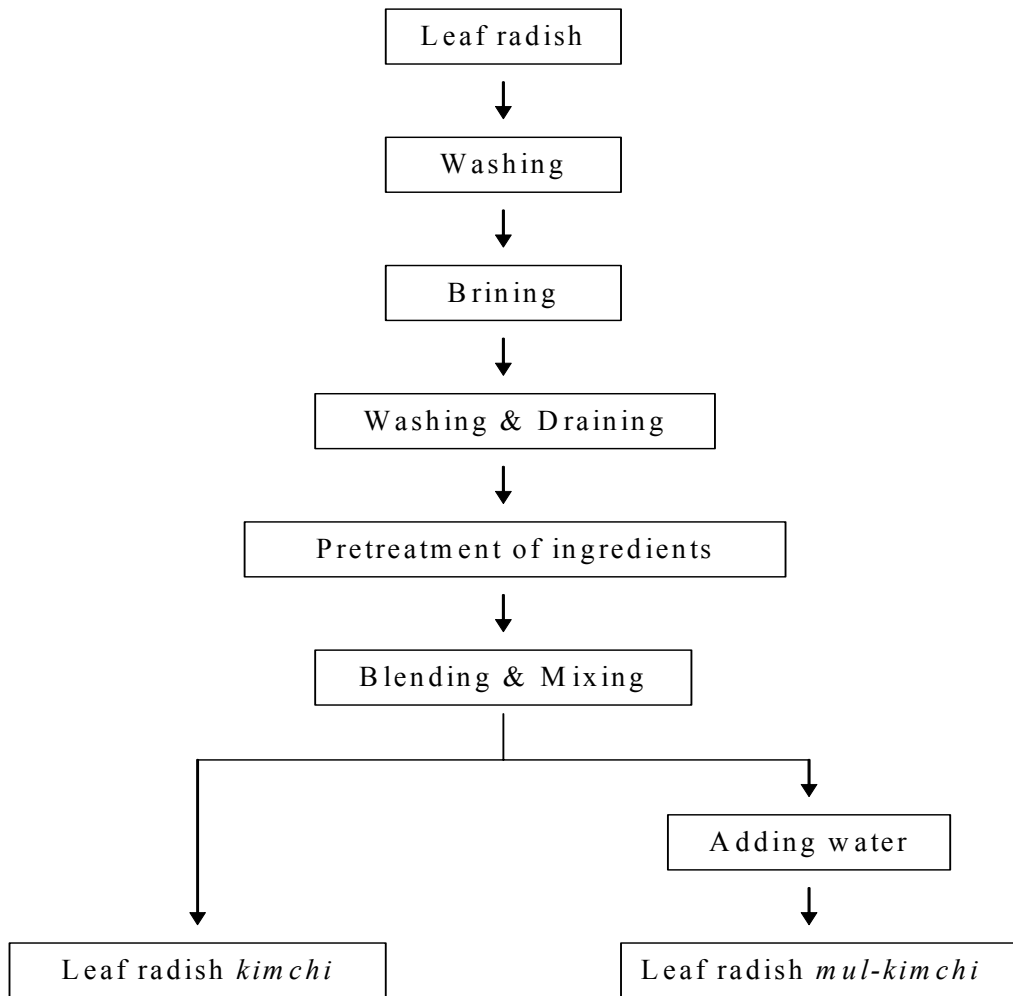


그림 1. Schematic diagrams for the standardized manufacturing method of leaf radish kimchi and mul-kimchi.

## 2) pH 및 산도의 변화

표준화된 방법으로 담은 열무김치와 열무물김치를 5℃의 저장온도에서 발효시켰을 때의 pH 및 산도의 변화를 관찰하였다(그림 2). 그림 2a에서는 열무김치의 발효 및 숙성 중 pH 및 산도 변화를 나타내었다. 열무김치의 pH는 서서히 감소하여 초기의 pH 5.7 내외였던 값이 발효 2-3 주일째에 최적 김치적숙기의 pH 까지 감소하였다. 산도의 변화는 pH의 변화와 반비례관계로 발효시간의 증가와 함께 증가하는 경향을 보였다. 열무김치의 산도는 김치의 적숙기 pH4.3부근에

서 배추김치보다 높은 산도를 나타내었다. 배추김치는 먹기 좋을 정도로 적당히 익혔을 때의 pH는 4.2-4.5 사이이고 산도는 0.60-0.80%이다. 열무김치의 산도는 적숙기의 pH 4.2-4.5 사이에서 1.04-1.27의 높은 값을 나타내었다. 이는 열무김치가 배추김치에 비해 보다 많은 유기산이 생성되는 것으로 생각된다. 열무김치의 발효 기간 중 pH 변화와 산도 변화의 관계를 살펴보면 pH 4.5 근처의 적숙기부근에서 서로 교차하는 경향을 보였다.

열무물김치의 발효 및 숙성 중 pH 및 산도변화를 측정된 결과를 그림 2b에 나타내었다. 열무물김치는 열무김치와는 달리 발효가 빠르게 진행됨을 알 수 있었다. 담금 직후 열무물김치의 pH는 5.8-5.9였다. 발효 초기에 pH는 급속히 감소하여 발효 6일째에 pH 4.7까지 떨어졌으며 발효 9일째는 적숙기 pH 4.3까지 감소하였다. 발효 15일째는 pH 4.0 이하로 떨어졌다. 발효 기간 중 열무물김치의 산도변화는 열무김치에서와 같이 pH의 변화에 반비례하는 관계로 발효기간 중 증가하는 경향을 나타내었다. 열무물김치는 빠른 발효와 함께 낮은 산도값을 나타내는 특징을 보였다. 즉 담금 직후 산도는 0.08%였으며 발효기간에 비례하여 산도는 증가하여 발효 9일째에는 0.20%에 도달하였고 발효 15일째에는 0.33%까지 증가하였다. 열무물김치의 최적 적숙기의 산도를 알기 위해 적숙기 때의 pH와의 관계에서 pH 4.3일 때 산도는 0.20%를 나타내었다. 이 값은 열무김치에 비해 훨씬 낮은 값을 알 수 있다.

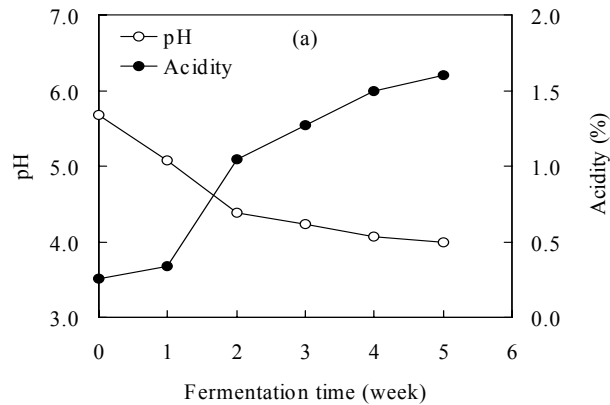


그림 2a. Changes in pH and acidity of leaf radish kimchi during fermentation at 5°C.

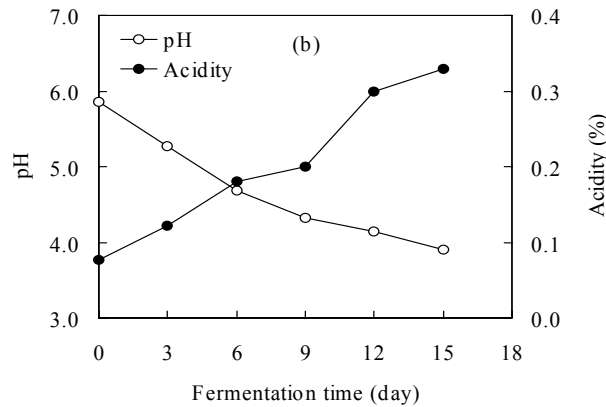


그림 2b. Changes in pH and acidity of leaf radish mul-kimchi(b) during fermentation at 5°C.

### 3) 젖산균 수의 변화

표 3에서는 열무김치의 숙성 및 발효기간 중 젖산균수의 변화를 나타내었다. 발효의 초기에 *Leuconostoc*속 젖산균수는 급격히 증가하여 발효 2주일째에  $10^9$  CFU/ 수준의 최대 젖산균수에 도달하였다. 발효 2주일 이후로 서서히 감소하였으나 큰 감소폭 없이 발효 5주일째에도  $10^8$  CFU/ 수준의 높은 값을 나타내었다. 즉 *Leuconostoc*속의 젖산균수는 적숙기의 pH 범위에서 최대치를 나타내었으며 pH 4.0이하에서도 높은 값을 나타내었다. *Lactobacillus*속 젖산균수는 발효기간에 비례하여 서서히 증가하는 경향을 나타내었다.

표 3. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of leaf radish kimchi during fermentation at 5°C

Time (week)	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
0	$4.2 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$
1	$8.7 \times 10^7$	$8.4 \times 10^5$
2	$1.5 \times 10^9$	$2.4 \times 10^7$
3	$4.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$
4	$2.8 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$
5	$1.5 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$

표 4에서는 열무물김치의 숙성 및 발효기간 중 젖산균수의 변화를 나타내었다. *Leuconostoc*속 젖산균은 발효 초기부터 높은 값을 나타내어 발효 3일째에  $10^7$  CFU/수준의 최대치에 도달한 후 발효 15일째에도  $10^7$  CFU/수준의 젖산균수를 유지하였다. *Lactobacillus*속 젖산균은 열무김치와는 달리 발효초기부터 높은 젖산균수를 나타내었는데, 이는 *Leuconostoc*속 젖산균수와 비슷한 수준의 값이었다. 발효 기간에 비례하여 서서히 증가하여 pH 4.0이하의 범위를 나타내는 발효 15일째에 최대값이 되었으나 발효기간 중 전체적으로 비슷한 균 수를 나타내었다.

열무김치와 열무물김치의 젖산균수의 성장변화는 발효기간 중 서로 다른 양상을 나타내었다. pH와 젖산균수의 관계에서 발효기간 중 열무물김치에 비해 열무김치의 젖산균이 pH 변화에 많은 영향을 받았으며, 열무물김치는 발효기간 중의 발효초기 pH 범위에서부터 높은 *Lactobacillus*속 젖산균수 함량을 나타내었다(그림 3). 즉, 열무김치에서는 첨가된 젖갈이 발효 초기의 젖산을 비롯한 유기산의 생성을 억제하는 것으로 생각할 수 있다. 반면 열무물김치는 발효초기부터 다량의 젖산을 비롯한 유기산이 생성되는 것으로 생각된다.

표 4. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of leaf radish *mul-kimchi* during fermentation at 5°C.

Time (day)	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
0	$4.9 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$
3	$5.3 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$
6	$3.1 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$
9	$3.4 \times 10^7$	$7.2 \times 10^7$
15	$4.1 \times 10^7$	$5.0 \times 10^8$

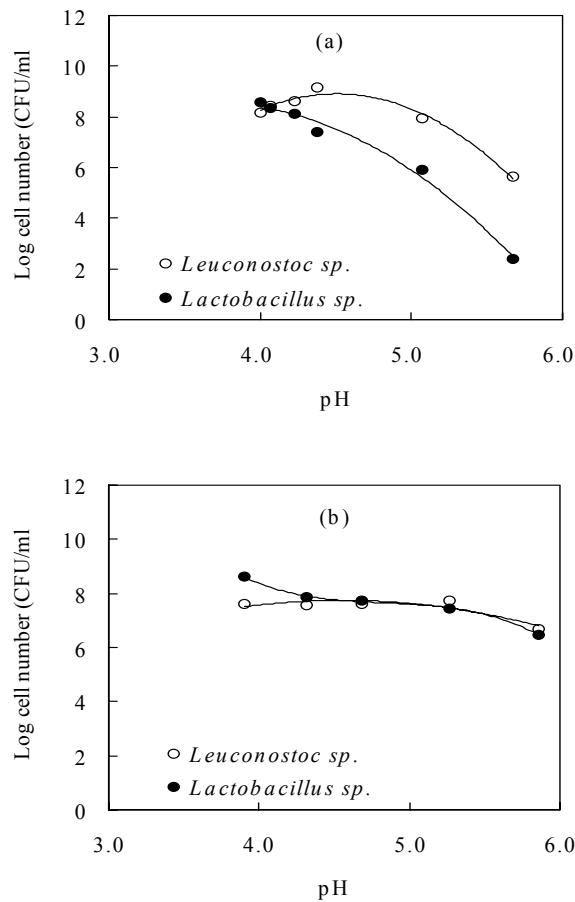


그림 3. Relationships between pH and *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of leaf radish kimchi(a) and *mul-kimchi*(b) during fermentation at 5°C.

#### 나. 유향처리 농도 및 방법별 열무김치 기능성 연구

##### 1) 기능성 열무의 일반 성분 분석

유향의 농도를 달리한 토양에서 열무를 재배하였을 때의 열무의 성분 변화를 관찰하여 일반 토양에서 재배했을 때의 열무의 성분과 비교 검토하였다(표 5). Control은 일반 토양에서 재배한 열무를 나타내며, 시료 A와 B는 유향의 성분을 달리하여 재배한 열무를 나타낸다. 시료 A는 Quinone reductase inducing activity를 유향농도별로 키운 열무에서 가장 활성이 좋은 유향 1,818g/m<sup>3</sup>에서 재배한 열무 시료이며, 시료 B는 유향처리 후에 일반 토양을 2 cm까지 덮어 준 후 재배한 열무를 나타낸다. 가장 활성이 좋은 유향 1,818g/m<sup>3</sup>에서 열무를 재배할 때 생육의 저해를 완화하려고 유향을 처리 후에 일반 토양의 두께를 달리하여 덮어준 후 열무를 재배하여 Quinone reductase inducing activity를 측정하였을 때 토양을 덮어주면 Quinone reductase inducing activity가 유향 1,818g/m<sup>3</sup>에서 열무를 재배시보다 낮아졌는데 3 cm 토양부터는 활성



이 50% 이하로 내려가므로 적용하기 어렵고, 2 cm 토양까지는 약간의 활성이 떨어지기는 하나 수확율을 고려할 때 기능성 열무재배에 가장 적절한 방법으로 생각되어 열무재배에 적용시켰다. 수분의 함량은 대부분 94%이상의 높은 함유율을 보였으며 유황 처리한 열무가 조금 낮은 값을 보였다. 유황처리를 한 열무는 일반 토양에서 재배한 열무보다 약간 높은 조단백질 및 조지질 함량을 보였다.

열무에 함유된 유황성분을 비교하였을 때 일반 토양에서 재배한 열무가 0.02%를 나타낸 것에 비해 유황 처리한 열무는 0.05%이상의 함유율을 보였다.

표 5. Proximary analysis of leaf radish (%)

	Moisture	Crude Protein	Crude Lipid	Ash	S
Control	95.94±0.17	1.40±0.01	0.11± 0	1.01±0.02	0.02
Sample A	94.73±0.14	2.11±0.23	0.16±0.03	1.11±0.02	0.06
Sample B	95.10±0.15	1.69±0.23	0.15±0.03	0.90±0.14	0.05

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

## 2) 일반 열무, 열무김치, 열무물김치의 암세포의 성장 억제 효과

표 6에서는 일반적으로 시중에 시판되는 열무, 열무김치 및 열무물김치의 AGS 인체 위암세포의 성장 억제 효과를 검토한 결과를 나타내었다.

표 6. Inhibitory effect of leaf radish, leaf radish kimchi, leaf radish *mul-kimchi* on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

Treatment	OD <sub>540nm</sub> (Level of sample)	
	10 $\mu$ l /assay	20 $\mu$ l /assay
Control	0.599±0.004 <sup>a</sup>	
Leaf radish	0.408±0.013 <sup>c</sup> (31)	0.263±0.010 <sup>c</sup> (56)
Leaf radish <i>kimchi</i>	0.443±0.042 <sup>c</sup> (26)	0.273±0.024 <sup>c</sup> (54)
Leaf radish <i>mul-kimchi</i>	0.543±0.006 <sup>b</sup> (9)	0.468±0.004 <sup>b</sup> (22)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

모든 즙액 시료는 10  $\mu$ l/농도까지는 암세포 성장 억제 효과를 보이지 않았다. 열무는 20  $\mu$ l/농도에서 50%이상의 높은 암세포 성장 저해율을 보였다. 열무김치는 10  $\mu$ l/농도까지는 50%이하의 낮은 성장 저해율을 보였으나, 20  $\mu$ l/의 농도에서 50%이상의 높은 암세포 성장 억제 효과를 보였다. 열무와 열무김치는 비슷한 값의 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 열무물김치는 20  $\mu$ l/까지의 농도에서도 암세포 성장 억제 효과를 보이지 않았으며, 40  $\mu$ l/의 농도에서도(자료 제시하지 않음) 47%의 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 이는 열무김치와는 달리 다량으로 함유된 수분에 의한 것으로 추측된다.

### 3) 발효과정 중 기능성 열무물김치 pH 및 산도의 변화

유황의 농도를 달리한 토양에서 열무를 재배한 열무를 이용하여 열무물김치를 담근 후 발효 특성을 검토하였다. 일반적으로 열무는 여름철에 김치로서 많이 이용되는 채소로, 열무김치에는 젓갈을 넣어 국물 없이 담그는 열무김치와 절인 열무에 물을 자작하게 부어 담는 열무 물김치가 대표적이다. 본 연구에서는 기능성 열무의 김치로서의 가능성을 검토하기 위해서 표준화에 의한 방법으로 열무물김치를 담근 후 열무김치의 발효 특성을 검토하였다(표 7). 일반 토양에서 재배한 control 시료는 8일째에 적숙기의 pH에 도달하였으며, 유황 처리한 열무시료는 6일째에 적숙기의 pH에 도달하였다. 즉 유황 처리한 시료는 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 빠른 시일에 적숙기에 도달하였다. 적숙기에 열무물김치의 산도는 0.20-0.24%로 배추김치에 비해 낮은 산도를 나타내는 특징을 보였다. 이는 열무물김치 중에 함유된 다량의 수분에 의한 것으로 추측된다. 열무시료 A와 B는 비슷한 발효 양상을 나타내었다(그림 4). 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 유황처리한 토양에서 재배한 열무의 발효가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 유황처리한 열무재배에서 유황처리 후 토양을 덮어주는 것은 열무물김치의 발효에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표 7. Changes in pH and acidity of leaf radish *mul-kimchi* during fermentation at 5°C

	Days	Control	Sample A	Sample B
pH	0	5.9	5.8	5.9
	4	5.3	4.7	4.8
	6	4.7	4.2	4.2
	8	4.3	4.1	4.1
	13	4.2	3.9	4.0
	Acidity (%)	0	0.08	0.09
4		0.12	0.17	0.16
6		0.18	0.23	0.24
8		0.20	0.27	0.28
13		0.31	0.33	0.33

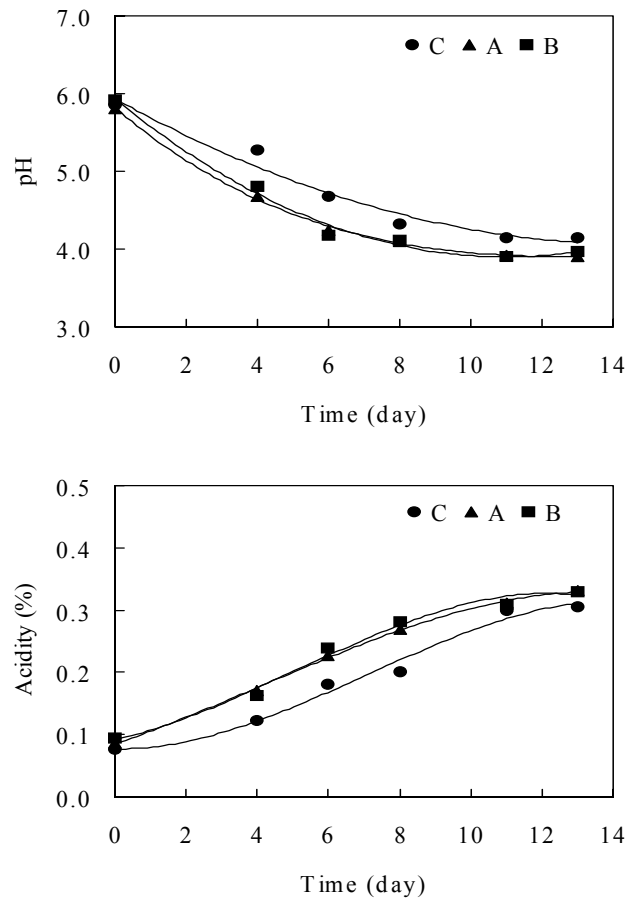


그림 4. Changes in pH and acidity of leaf radish *mul-kimchi* during fermentation at 5°C.

#### 4) 발효과정 중 기능성 열무물김치의 젖산균 수의 변화

유향의 농도를 달리한 토양에서 열무를 재배한 열무와 일반 토양에서 재배한 열무를 이용하여 담근 열무물김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화를 비교 검토하였다(표 8). 열무물김치의 *Leuconostoc*속 함량은 열무물김치를 담근 발효초기에  $10^6$  CFU/에서 시작하여 발효 6일째에  $10^7$  CFU/에 도달하였다. *Lactobacillus* 속 균의 성장은 배추김치와는 다른 양상을 보였다. 발효 초기부터  $10^6$  CFU/의 높은 함량을 나타내어 최대  $10^8$  CFU/까지 증가하였다. 열무물김치는 발효 초기에 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균수는 서로 비슷한 함량을 나타내는 특성을 보였다. 그림 5에서와 같이 서로 다른 재배조건에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열무물김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화는 열무의 재배조건에 크게 영향을 받지 않았다. 즉 발효초기기간 중 서로 비슷한 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균 수 함량을 나타내었다.

표 8. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of leaf radish mul-kimchi during fermentation at 5°C

	Days	Control	Sample A	Sample B
<i>Leuconostoc sp.</i>	0	4.9x10 <sup>6</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>	4.6x10 <sup>6</sup>
	6	3.9x10 <sup>7</sup>	3.9x10 <sup>7</sup>	3.8x10 <sup>7</sup>
	8	3.8x10 <sup>7</sup>	3.7x10 <sup>7</sup>	3.6x10 <sup>7</sup>
	13	4.1x10 <sup>7</sup>	3.3x10 <sup>7</sup>	2.5x10 <sup>7</sup>
<i>Lactobacillus sp.</i>	0	4.6x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>6</sup>	1.9x10 <sup>6</sup>
	6	5.4x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>7</sup>	8.7x10 <sup>7</sup>
	8	7.2x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>
	13	4.0x10 <sup>8</sup>	3.1x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>

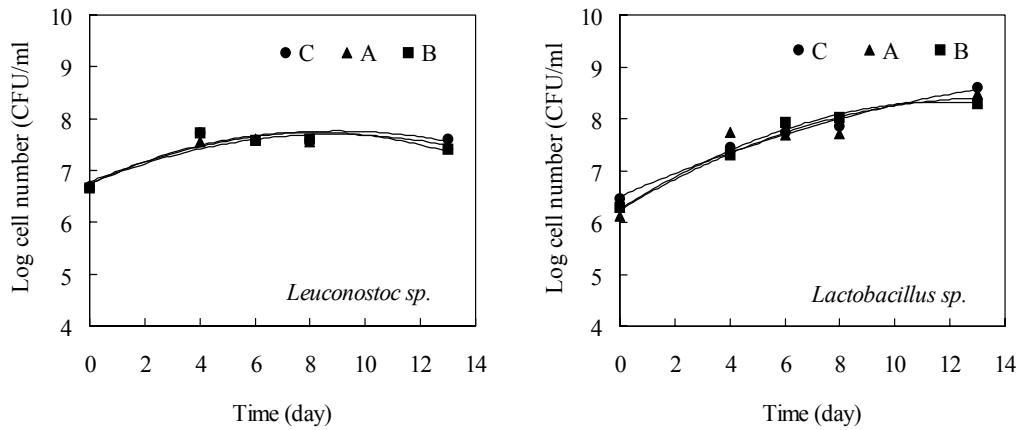


그림 5. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of leaf radish mul-kimchi during fermentation at 5°C.

5) 기능성 열무 및 열무물김치의 항돌연변이 효과

유황처리가 열무김치의 암예방기능성에 어떠한 영향을 미치는 가를 검토하기 위하여 일반 토양과 유황처리를 한 토양에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열무물김치를 담근 후 5°C의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무물김치의 즙액을 이용하여 항돌연변이 실험을 행하였다. 열무의 기능성은 수확 직후의 열무즙액을 이용하였다.

재배조건을 달리하여 재배한 열무즙액의 항돌연변이 실험결과를 표 9에 나타내었다. *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 Ames test에서 열무즙액은 100 µl 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 31-40%의 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며 유황처리 시료 A가 가장 높은 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었다. 200 µl 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 50%이상의 높은 돌연변이 유발 억제효과를 보였다. 유황처리를 한 토양에서 재배한 열무는 일반토양에서 재배한 열무에 비해 높은 억제효과를 나타내었으며 특히 유황처리를 한 시료 A는 61%로 가장 높은 억제효과를 나타내었으나, 시료간의 유의적인 차이는 찾아볼 수 없었다.

재배조건을 달리하여 재배한 열무를 이용하여 담은 열무물김치즙액의 항돌연변이 실험결과를 표 10에 나타내었다. 열무물김치즙액은 열무즙액에 비해 전체적으로 낮은 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다. *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 Ames test에서 열무물김치즙액은 100 µl 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 26-36%의 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며 유황처리 시료 A는 36%로 가장 높은 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었다. 200 µl 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 일반토양에서 재배한 열무를 이용한 열무물김치즙액은 50%이하의 낮은 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며, 유황처리한 열무를 이용한 시료 A의 열무물김치즙액은 51%로 일반토양에서 재배한 열무에 비해 높은 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. 유황처리를 한 후 토양을 덮은 후 재배한 시료 B는 40%로 낮은 돌연변이 억제 효과를 나타내어 유황처리만 한 시료 A에 비해서도 낮은 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. 항돌연변이 실험에서는 유황처리만을 한 열무시료 A를 이용하여 담은 열무김치가 높은 항돌연변이 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

표 9. Antimutagenic effect of leaf radish juice during fermentation against aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 6.0 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

Sample	Revertants/plate	
	100 µl/plate	200 µl/plate
Spontaneous Control (AFB <sub>1</sub> )	94±5	
Control	551±9 <sup>b</sup> (31)	397±48 <sup>b</sup> (55)
Sample A	497±12 <sup>b</sup> (40)	355±7 <sup>b</sup> (61)
Sample B	536±19 <sup>b</sup> (34)	367±37 <sup>b</sup> (59)

<sup>a-b</sup> Significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 10. Antimutagenic effect of leaf radish *mul*-kimchi juice during fermentation against aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 6.0 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

	Revertants/plate	
	100 µl/plate	200 µl/plate
Spontaneous	94±5	
Control (AFB <sub>1</sub> )	762±35 <sup>a</sup>	
Control	589±11 <sup>b</sup> (26)	520±75 <sup>b</sup> (36)
Sample A	518± 3 <sup>c</sup> (36)	420±15 <sup>c</sup> (51)
Sample B	545± 6 <sup>bc</sup> (32)	493± 9 <sup>b</sup> (40)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

#### 6) 기능성 열무의 항암 효과

표 11에서는 유황처리를 한 열무의 암예방 효과를 알아보기 위하여 수확 직후의 열무의 즙액을 이용하여 AGS 인체 위암세포의 성장 저해효과를 관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교 검토한 결과를 나타내고 있다. 10 µl의 낮은 농도에서는 일반토양에서 재배한 열무즙액은 30%이하의 낮은 암세포 성장 저해율을 보였으나, 유황처리를 한 시료 A와 시료 B는 50%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 보였다. 20 µl의 높은 농도에서는 대부분의 열무 시료가 60%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며, 특히 유황 처리를 한 열무 시료는 76%의 높은 암세포 증식억제효과를 보였다. 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다.

표 12에서는 유황처리를 한 열무의 암예방 효과를 알아보기 위하여 수확 직후의 열무의 즙액을 MTT assay를 이용하여 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해효과를 비교 검토한 결과를 나타내었다. 10 µl의 낮은 농도에서는 50%이하의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 일반토양에서 재배한 열무즙액은 92%의 높은 암세포 생존율을 보였으나, 유황처리를 한 시료 A와 시료 B는 22%의 높은 암세포 증식억제효과를 보였다. 20 µl의 높은 농도에서는 일반토양에서 재배한 열무즙액은 29%의 낮은 암세포 증식억제효과를 나타내었으나, 유황 처리를 한 열무 시료는 50%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었다. AGS 인체 위암세포의 성장 저해효과를 비교한 결과에서와 같이 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방 효과를 나타내었다.

표 11. Inhibitory effect of leaf radish juice on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	10 $\mu$ l/assay	20 $\mu$ l/assay
Control	0.581 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.582 $\pm$ 0.016 <sup>a</sup>
Control	0.441 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup> (24)	0.238 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup> (60)
Sample A	0.275 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup> (53)	0.142 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup> (76)
Sample B	0.263 $\pm$ 0.007 <sup>c</sup> (55)	0.140 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup> (76)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 12. Inhibitory effect of leaf radish juice on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	10 $\mu$ l/assay	20 $\mu$ l/assay
Control	0.526 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	0.539 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
Control	0.482 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup> (8)	0.382 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup> (29)
Sample A	0.409 $\pm$ 0.011 <sup>c</sup> (22)	0.265 $\pm$ 0.010 <sup>c</sup> (51)
Sample B	0.408 $\pm$ 0.020 <sup>c</sup> (22)	0.253 $\pm$ 0.009 <sup>c</sup> (53)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

#### 7) 기능성 열무물김치의 항암 효과

표 13에서는 유향처리를 한 열무를 이용하여 담근 열무물김치의 암예방 효과를 알아보기 위하여 열무물김치를 담근 후 5℃의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무물김치의 즙액을 이용하여 AGS 인체 위암세포의 성장 저해효과를 관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교 검토한 결과를 나타내고 있다. 10  $\mu$ l 과 20  $\mu$ l의 낮은 농도별 비교(표 13-1)에서는 대부분의 시료가 50%이하의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 20  $\mu$ l과 40  $\mu$ l의 농도별 비교(표 13-2)에서는 40  $\mu$ l의 농도에서 유향처리를 한 열무를 이용하여 담은 열무물김치즙액이 50%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었다. 특히 유향 처리만 한 열무를 이용하여 담은 열무물김치즙액시료는 64%로 가장 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으나, 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다.

표 13-1. Inhibitory effect of leaf radish mul-kimchi juice on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	10 µl/assay	20 µl/assay
Control	0.581±0.004 <sup>a</sup>	0.582±0.016 <sup>a</sup>
Control	0.530±0.012 <sup>a</sup> (9)	0.468±0.004 <sup>b</sup> (20)
Sample A	0.459±0.053 <sup>b</sup> (21)	0.383±0.002 <sup>c</sup> (35)
Sample B	0.448±0.044 <sup>b</sup> (23)	0.385±0.004 <sup>c</sup> (34)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 13-2. Inhibitory effect of leaf radish mul-kimchi juice on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	20 µl/assay	40 µl/assay
Control	0.582±0.016 <sup>a</sup>	0.616±0.004 <sup>a</sup>
Control	0.468±0.004 <sup>b</sup> (20)	0.352±0.032 <sup>b</sup> (43)
Sample A	0.383±0.002 <sup>c</sup> (35)	0.224±0.020 <sup>c</sup> (64)
Sample B	0.385±0.004 <sup>c</sup> (34)	0.276±0.003 <sup>c</sup> (55)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 14에서는 유황처리를 한 열무를 이용하여 담근 열무물김치의 암예방 효과를 알아보기 위하여 열무물김치를 담근 후 5°C의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무물김치의 즙액을 MTT assay를 이용하여 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해효과를 비교 검토한 결과를 나타내었다. 10 µl와 20 µl의 낮은 농도별 비교(표 14-1)에서는 대부분의 시료가 30%이하의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 20µl와 40µl의 농도별 비교(표 14-2)에서는 40µl의 농도에서 유황처리를 한 열무를 이용하여 담은 열무물김치즙액이 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었다.



일반토양에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열물김치즙액은 31%의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타낸 반면, 유향처리만을 한 열무시료A를 이용하여 담은 열물김치즙액은 61%의 가장 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 유향처리 후 토양을 덮은 토양에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열물김치즙액은 유향처리만을 한 경우에 비해 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다.

AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해효과를 비교한 결과에서는 유향 처리는 열무의 암예방 기능성을 증진시킬 뿐만 아니라 재배한 열무를 이용하여 담은 열물김치의 암예방 기능성까지 증진시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히 유향처리만 하여 재배한 열무의 경우 더 높은 암예방 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

표 14-1. Inhibitory effect of leaf radish mul-kimchi juice on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	10 µl/assay	20 µl/assay
Control	0.526±0.014 <sup>a</sup>	0.539±0.003 <sup>a</sup>
Control	0.490±0.013 <sup>b</sup> (7)	0.472±0.009 <sup>b</sup> (13)
Sample A	0.483±0.021 <sup>b</sup> (8)	0.390±0.020 <sup>c</sup> (28)
Sample B	0.477±0.008 <sup>b</sup> (9)	0.386±0.024 <sup>c</sup> (28)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 14-2. Inhibitory effect of leaf radish mul-kimchi juice on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	20 µl/assay	40 µl/assay
Control	0.539±0.003 <sup>a</sup>	0.531±0.006 <sup>a</sup>
Control	0.472±0.009 <sup>b</sup> (13)	0.365±0.007 <sup>b</sup> (31)
Sample A	0.390±0.020 <sup>c</sup> (28)	0.207±0.021 <sup>d</sup> (61)
Sample B	0.386±0.024 <sup>c</sup> (28)	0.283±0.011 <sup>c</sup> (47)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

## 제 2 세부 : 가공방법 및 가공제품개발

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 기능성 열무를 이용한 열무김치 및 열무물김치의 제조 표준화

기능성 열무를 이용하여 열무김치 및 열무물김치의 표준화 작업에 의해 제조된 김치의 발효특성 및 관능검사 등의 결과와, 일반 열무에 대한 표준화한 제조방법으로 제조한 기능성 열무김치 및 열무물김치의 발효특성 및 관능검사의 결과의 비교하여 기능성열무를 이용한 열무김치 및 열무물김치의 맛과 기능성을 증진시킨 원 부재료비에 따른 레시피 및 제조 방법의 확립하였다.

#### 1) 열무김치의 pH 및 적정산도

제조한 열무김치의 pH는 시료 10g에 증류수 40를 가하여 homogenizer로 마쇄(8,000 rpm, 5 min)하고 여과한 후, 그 액의 일부를 취하여 pH meter(Corning 220, U.S.A) 로 측정하고, 적정산도는 마쇄여액 20를 취하여 pH가 8.3이 될 때까지 소요된 0.1N-NaOH의 양을 아래의 계산식에 따라 lactic acid 환산법으로 계산하여 표시하였다.

$$\text{Titration acidity (lactic acid, \%)} = \frac{\text{of 0.1N NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 0.09}{\text{Sample(g)}} \times 100$$

#### 2) 열무김치 원, 부재료의 배합비에 따른 레시피 확보

먼저 문헌조사(조리서, 지역별 열물김치의 특성조사, 학술지 등)를 통하여 열무김치의 원·부재료의 배합비와 발효 조건 및 레시피를 확보한 후 이를 토대로 열무김치의 표준화 작업을 수행하였다.

#### 가) 반복화된 randomized block design에 의한 관능검사

반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)(343)에 따라서 훈련된 8명의 관능요원이 1회에 3가지 시료를 평가하게 하고 이를 4회 반복 실시하였다. 묘사항목은 주관적인 평가로 종합적인 외관(apperance), 냄새(overall smell), 향미(overall flavor), 질감(overall chewness)으로 평가하고, 1에서 9까지로 분류한 등급을 사용하여 평가하였으며, 1에 가까울수록 극도로 좋고, 9에 가까울수록 극도로 싫은 것으로 나타내었다. 또 객관적인 평가로는 후각적 지각인 신내(sour smell), 균덕내(moldy smell), 풋내(green smell)와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 균덕맛(moldy flavor), 덜익은 맛(green flavor) 그리고 질감으로 경도(hardness)을 평가하였으며, 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고, 9에 가까울수록 극도로 강하게 감지하는 것으로 나타내었다. 후각적 지각으로 코로 감지되는 것으로 평가하였고, 미각적 지각은 여러 차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신내와 신

맛은 산에 의해 나타나는 감각, 풋내와 텃익은 맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕내와 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

#### 나. 표준화 열무김치의 생리기능성 검증

열무김치에서 암예방 효과를 확인하기 위해서는 표준화된 열무김치를 발효하여 활성이 가장 컸던 시기의 열무김치를 냉동건조하고, 냉동 건조된 시료는 hexane으로 3회 추출하고 잔사물을 2배의 메탄올로 95℃에서 환류냉각기를 사용하여 3회 추출하였다. 회전식 진공농축기(Buchi oll & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 용매를 제거하고 돌연변이 유발 억제실험(Ames test) 및 암세포 증식 억제 실험(MTT assay)을 수행하였다.

##### 1) Ames test

*Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100 및 TA98 균주를 실험에 사용하며, 이들 실험균주들은 새로운 frozen permanent가 준비되었을 때나 때 실험직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. 돌연변이원으로는 AFB1 (aflatoxin B1), MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등을 사용하며 한편, S9 mixture 조제를 위해 약 200 g의 웅성 Sprague-Dawley rat의 간 효소활성을 위하여 Aroclor 1254를 corn oil 1 당 200 mg의 농도로 희석하여 1회 복강 주사하고(500 mg/kg) 5일후에 간을 적출하였다. 4℃ 무균상태에서 적출한 간을 0.15M KCl로 수 회 세척하고 간 무게의 3배량의 0.15M KCl 용액을 가하여 homogenizer(Potter-Elvehjem apparatus, USA)에서 균질화하고, 9000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액인 S9 fraction을 얻어 Cryo tube에 1~2 씩 분주하여 dry ice에서 급속 동결한 후 -70℃ deep freezer에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 준비한 S9 fraction(10%)을 mgCl-KCl salts(2%), 1M glucose-6-phosphate(0.5%), 1M NADP(4%), 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 및 멸균수와 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다. 항돌연변이 실험에서는 S9 mix 0.5 (간접돌연변이인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5 (직접돌연변이인 경우), 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/) 0.1, 희석된 시료(50  $\mu$ l)와 돌연변이 유발물질(50  $\mu$ l)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후 37℃에서 30분간 예비배양하였다. 45℃의 top agar 2 씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37℃에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다. 돌연변이 억제 효과의 정도 (inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times [(a-b) \div (a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌

연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다.

## 2) MTT assay

동물세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well이 되게  $180 \mu\text{l}$  분주하고 시료를 일정농도로 제조하여  $20 \mu\text{l}$  첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액  $20 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를  $550 \times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO  $150 \mu\text{l}$ 를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

다. 재배시기별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 및 열무물김치의 *in vitro*의 항암효과검토 (MTT test, cell growth inhibition test 등으로 검토).

### 1) *in vitro* 세포 독성 실험

김치시료의 직접적인 세포 독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 세포 독성 실험을 하였다. 1회용 24 well plate에 20% HFCS(heat inactivated fetal calf serum: Gibco Lab., USA)을 함유한 EMEM(Eagle's minimal essential medium: Gibco Lab., USA)배지 1에  $5 \times 10^4$  cell/plate가 되게 seeding하였다. 여기에  $20 \mu\text{l}$ 의 김치 시료를 넣어서  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포  $50 \mu\text{l}$ 를 0.2% trypan blue 용액  $50 \mu\text{l}$ 와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수, 염색되어진 세포(non-viable cell)수 및 염색되지 않은 세포(viable cell)수를 측정한다. 김치 시료를 넣지 않은 대조 세포군과 비교하여 viability 비율을 계산하였다.

### 2) 암세포 배양

실험에 주로 사용되는 암세포는 인체위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)와 인체 대장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell)로 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 사용하였다. AGS 위암세포 및 HT-29 결장암세포는 100 units/의 Penicillin-Streptomycin 과 10%의 FCS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하고, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 cell culture flask에 5 씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 3) 암세포 증식억제 실험

암세포배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 HT-29 암세포는 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고, 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FCS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이틀에 한번씩 배양액을 교체하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료는 2일마다 10 µl/ medium씩 농도별 첨가한 새로운 배지로 교체하고 배양 6-7일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제효과를 관찰하였다. 또는 동물세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cell/well이 되게 180 µl 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 µl 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수 5 mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 20 µl를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550 ×g에서 10 분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150 µl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

라. 재배시기별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 및 열무물김치의 *in vivo* 항암효과검토

#### 1) 세포 독성 실험(Viability test)

기능성 열무로 제조한 김치시료의 직접적인 독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 하였다. 1회용 24 well plate에 20% HFCS(heat inactivated fetal calf serum: Gibco Lab., USA)을 함유한 EMEM(Eagle's minimal essential medium: Gibco Lab., USA)배지 1 ml에 5×10<sup>4</sup> cell/plate가 되게 seeding하였다. 여기에 20 µl의 김치 시료를 넣어서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포 50 µl를 0.2% trypan blue 용액 50 µl와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수, 염색되어진 세포(non-viable cell)수 및 염색되지 않은 세포(viable cell)수를 측정한다. 다음, 김치 시료를 넣지 않은 대조 세포군과 비교하여 viability 비율을 계산하였다.

$$\text{Viable cell(\%)} = \frac{\text{Total number of viable cells per of aliquot}}{\text{Total number of cells per of aliquot}} \times 100$$

#### 2) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 웅성 Balb/c mouse(한국화학연구소, 대전)로, 체중이 25 g 전후의 것을 사용하였으며, 사료는 표준사료로 사육하였다. 사육 시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였

고, 동물실험실은 온도  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$  를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다.

가) 고형암 성장저지 실험

실험에 이용한 sarcoma-180 종양세포는 Balb/c 마우스의 복강 내에 7~10일 간격으로 계대배양하여 보존하면서 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 7~10일간 배양된 sarcoma-180세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline (PBS)와 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후  $1.0\times 10^6$  cells/가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 싹을 복강주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

고형암 성장저지 실험은 각 군당 5~6마리의 마우스의 왼쪽 서혜부(left groin)에 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.2 ( $6\times 10^6$  cells/mouse)씩을 피하 이식하고, 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료 용액을 복강으로 투여하거나 식이를 섭취시켰다. 종양세포 이식 26~30일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정후 다음 식에 따라 종양 성장 저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R.: %)을 계산하였다.

$$\text{I.R. (\%)} = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

$C_w$  : 대조군의 평균 종양무게

$T_w$  : 처리군의 평균 종양무게

나) 효소 활성 측정

(1) 효소원의 조제

마우스를 치사시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$  이하의 생리 식염수로 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 간조직 1 g 당 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미미체세포 부분을 제거하고 다시 105,000  $\times g$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로 하였다. 이렇게 얻은 cytosol 분획은 glutathione S-transferase 활성 측정에 이용하였다.

(2) Glutathione S-transferase (GST)의 활성 측정

Habig 등의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 0.04 M reduced glutathione 75  $\mu\text{l}$ 를 가한 후 효소액을 0.1  $\mu\text{l}$  넣고 blank에는 20% trichloroacetic acid 0.5  $\mu\text{l}$ 를 가해 효소를 실험시키고 시료는  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후 blank와 시료 각각에 0.12 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 반응시킨 다음 시료에 20%

trichloroacetic acid를 가해 반응을 완결시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitro benzene glutathione의 nmole수로 표시하였다.

### (3) Protein 정량

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. 열무김치의 표준화 연구

#### 1) 열무김치의 재료 배합비 및 제조 표준화

열무김치는 주로 여름에 즐겨 먹는 김치로 부재료별 또는 지역별 및 기호도 등에 따라 김치의 맛이 달라질 수 있는데, 이러한 요건에 의한 김치의 담금 및 맛의 차이를 고려한 대표적인 열무김치와 열무물김치의 재료배합비의 표준값을 구하였다. 전시험과 같이 조리서와 관련문헌 및 김치 공장에서 사용되고 있는 다양한 재료 및 제조방법들 중 사용빈도가 50% 이상인 재료 및 제조방법을 채택하였다.

조리서와 참고문헌에서 얻어진 자료 중 최대값과 최소값을 제외한 값으로 평균값과 이들 사이의 표준편차를 구하여 문헌에 입각하여 열무김치의 담금 및 재료비의 표준값으로 하였다. 열무김치의 재료 및 양념의 배합비는 절인 열무 100에 대해 파  $8.0 \pm 3.8$ , 마늘  $2.9 \pm 1.3$ , 생강  $1.6 \pm 0.7$ , 홍고추  $7.0 \pm 1.7$ , 고춧가루  $4.2 \pm 1.2$ , 젓갈  $3.7 \pm 0.5$ 이었다. 이 중에서 열무김치의 발효와 맛에 관여하는 인자 중 표준편차가 큰 재료인 마늘과 고춧가루를 기준으로 하여 양을 조절한 레시피를 작성하였다(표 1과 표 2). 이에 대한 결과는 관능 평가에 의해 이루어질 것이며, 봄에 과중하여 재배한 열무로 제조한 열무김치의 결과와 남은 기간 동안 비교하여 나타낼 계획이다.

열무물김치도 열무김치에서와 같이 재료 배합비 및 제조방법의 표준값을 구하였다. 열무물김치의 부재료와 양념의 배합비는 물 100에 대해 절인 열무  $50.6 \pm 10.8$ , 파  $3.3 \pm 1.3$ , 마늘  $3.0 \pm 0.7$ , 생강  $1.5 \pm 0$ , 풋고추  $3.3 \pm 1.9$ , 홍고추  $2.4 \pm 1.3$ , 전분  $1.5 \pm 0.6$ 이었다. 열무물김치는 담글 때 열무김치와는 달리 젓갈이 첨가되지 않았다. 이 중에서 열무물김치는 소금의 농도에 따라 발효와 맛에 어떻게 관여하는가를 검토하기 위하여 표준화한 열무김치를 기준으로 소금의 농도를 조절한 레시피를 작성하였다(표 3). 나박김치 등의 물김치류는 일반 배추김치에 비해 소금의 농도를 적게 하는 경향이 있다. 따라서 열무물김치도 물김치의 일종으로 소금의 농도에 따라 맛 및 발효 특성이 달라질 것으로 여겨진다. 이 결과는 관능 평가에 의해 이루어졌으며 남은 기간 동안 봄에 과중하여 재배한 열무로 제조한 열무김치의 결과와 비교하여 나타내었다.

㉔ 1. Ingredients ratios of young radish kimchi with different garlic content

Ingredients	Weight (g)	Weight (g)	Weight (g)
Leaf radish	100	100	100
Green onion	8.0	8.0	8.0
Crushed garlic	1.6	2.9	4.2
Crushed ginger	1.6	1.6	1.6
Red pepper powder	4.2	4.2	4.2
Red pepper	7.0	7.0	7.0
Anchovy juice	3.7	3.7	3.7
Final salt concentration (%)	2.5	2.5	2.5

㉔ 2. Ingredients ratios of young radish kimchi with different red pepper powder content

Ingredients	Weight (g)	Weight (g)	Weight (g)
Leaf radish	100	100	100
Green onion	8.0	8.0	8.0
Crushed garlic	2.9	2.9	2.9
Crushed ginger	1.6	1.6	1.6
Red pepper powder	3.0	4.2	5.4
Red pepper	7.0	7.0	7.0
Anchovy juice	3.7	3.7	3.7
Final salt concentration (%)	2.5	2.5	2.5

㉔ 3. Ingredients ratios of young radish kimchi with different salt content

	Ingredients	Weight (g)	Weight (g)	Weight (g)
Liquid part	Water ( )	100	100	100
	Starch	1.5	1.5	1.5
Solid part	Leaf radish	50.6	50.6	50.6
	Crushed garlic	3.0	3.0	3.0
	Crushed ginger	1.5	1.5	1.5
	Green onion	3.3	3.3	3.3
	Green pepper	3.3	3.3	3.3
	Red pepper	2.4	2.4	2.4
	Final salt concentration (%)	2.0	2.5	3.0



열무김치와 열무물김치의 표준화된 제조 방법을 그림 1과 그림 2에 각각 나타내었다. 열무김치는 열무는 역세고 시든 잎은 떼어내고 뿌리는 칼로 끊어서 손질한 후 소금을 뿌려 1시간 동안 절인다. 파는 어슷하게 썰고 홍고추는 꼭지를 떼고 반을 갈라 씨를 뺀 후 잘게 썰어 믹서기에 갈아서 다진 마늘과 생강과 함께 준비해 둔다. 절인 열무는 수돗물로 3회 씻고 1시간 동안 물기를 뺀 후 준비된 재료 및 양념과 함께 버무려 고루 섞은 후 염도는 소금으로 2.5%로 조절하여 보관하였다. 열무를 다듬는 과정에서 열무를 일정한 길이로 잘라서 제조하는 경우와 열무 그 자체를 이용하는 두 방법이 있으나, 열무는 그대로 이용하였다. 열무를 일정한 길이로 잘라서 김치를 제조할 경우 다른 부재료도 열무의 길이에 맞추어 일정한 길이로 자르는 경향을 나타내었다. 열무는 소금으로 절이는 과정에서 너무 뒤적거리거나 짜게 절이면 열무의 풋내가 나므로 절일 때 주의하여야 할 필요가 있었다.

열무물김치제조과정 열무김치의 제조 방법과 전체적으로 비슷한 과정을 거쳤다. 즉, 열무는 깨끗이 손질하여 일정한 길이(4-7 cm)로 자른 다음 소금을 뿌려 1시간 동안 절인다. 절인 열무는 수돗물로 3회 씻고 1시간 동안 물기를 빼서 준비해 둔다. 파, 풋고추, 홍고추는 약 4 cm 길이로 채 썰고 마늘과 생강은 다지고, 전분으로는 밀가루 풀을 준비해 둔다. 절여서 물기를 뺀 열무를 준비된 재료 및 양념과 함께 버무려 고루 섞은 후 식힌 밀가루풀물을 넣어서 다시 골고루 섞은 후 최종적으로 소금으로 염도를 조절하였다.

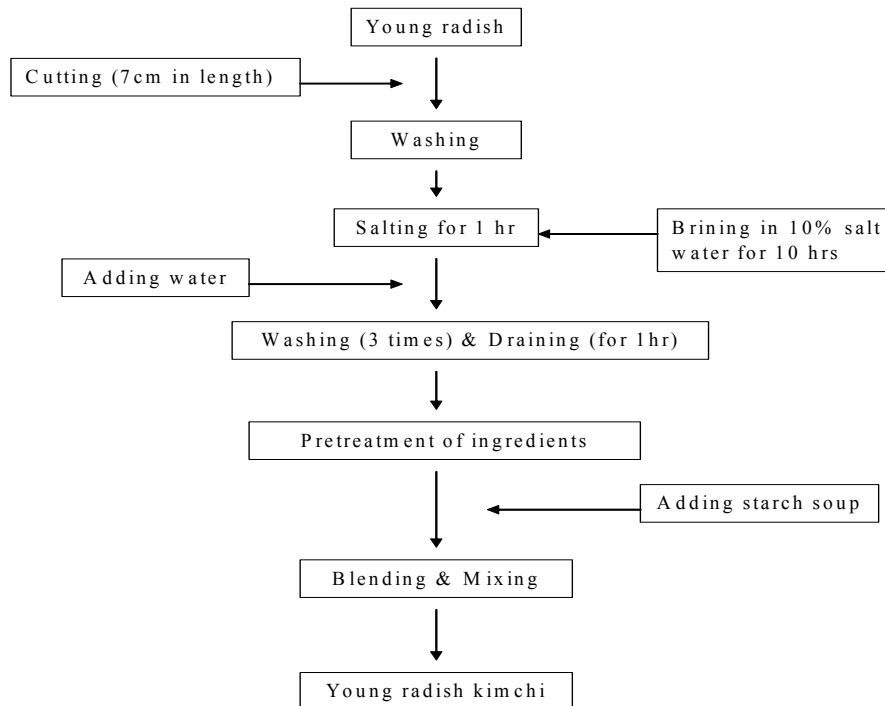


그림 1. Schematic diagrams for the standardized manufacturing method of young radish kimchi.

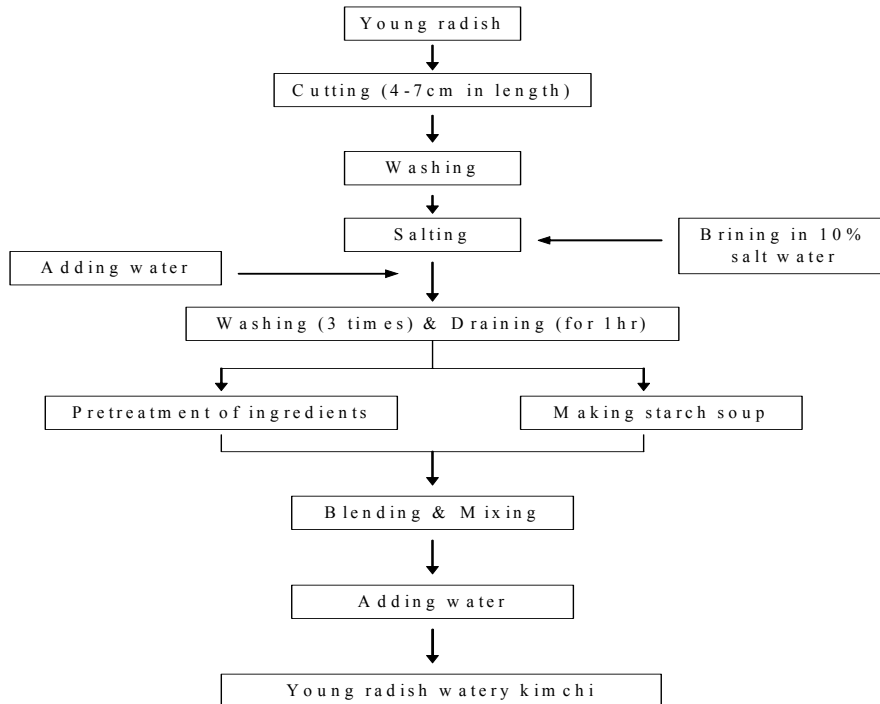


그림 2. Schematic diagrams for the standardized manufacturing method of young radish watery kimchi.

나. 여름에 파종한 열무로 제조한 기능성 열무김치 및 열무물김치의 발효 특성

1) pH 및 산도의 변화

유황처리 농도를 달리하여 재배한 열무를 사용하여 표준화된 방법으로 담은 열무김치와 열무물김치를 5°C의 저장온도에서 발효시켰을 때의 pH 및 산도의 변화를 관찰하였다. 본 연구에서는 기능성 열무의 김치로서의 가능성을 검토하기 위해서 표준화에 의한 방법으로 열무김치와 열무물김치를 제조한 후 발효 특성을 검토하였다. 일반 토양과 유황처리 농도를 달리하여 재배한 열무로 제조한 열무김치의 발효과정 중 pH 및 산도변화의 결과를 그림 3에 나타내었다. 일반 토양에서 재배한 control시료는 5-6 주일째에 적숙기의 pH에 도달하였으며, 유황 처리한 열무시료는 4-5일째에 적숙기의 pH에 도달하였다. 즉 유황 처리한 시료는 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 빠른 시일에 적숙기에 도달하였다. 산도의 변화는 pH의 변화와 반비례관계로 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였다. 적숙기에 열무김치의 산도는 0.85-1.25%의 범위로 배추김치에 비해 높은 산도를 나타내었다(표 4). 이는 열무김치가 배추김치에 비해 보다 많은 유기산이 생성되는 것으로 생각된다. 또한 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치에 비해 유황 처리한 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치의 경우 발효가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 유황 처리한 열무재배에서 유황처리 후 토양을 더 덮어주는 것은 열무김치의 발효에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표 4. Changes in pH and acidity of young radish kimchi during fermentation at 5°C

	Week	Control	Sample A	Sample B
pH	0	5.1	5.4	5.2
	2	5.0	5.1	5.1
	4	4.6	4.7	4.4
	6	4.3	4.3	4.3
	8	4.3	4.2	4.3
Acidity (%)	0	0.47	0.49	0.46
	2	0.58	0.56	0.55
	4	0.84	0.85	1.02
	6	1.04	0.95	1.14
	8	1.15	1.25	1.34

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

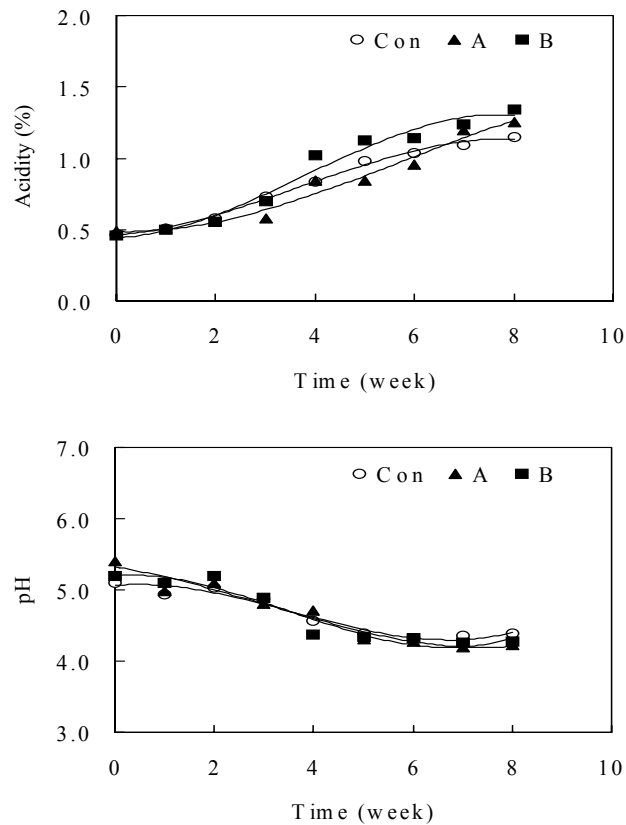


그림 3. Changes in pH and acidity of young radish kimchi during fermentation at 5°C

유황처리 농도를 달리하여 재배한 열무를 사용하여 표준화된 방법으로 담은 열무김치에서와 같이 열무물김치를 제조하여 5°C의 저장온도에서 발효시켰을 때의 pH 및 산도의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 열무물김치는 열무김치와는 달리 발효가 빠르게 진행되었다. 제조 직후 열무물김치의 pH는 5.7-5.9였으며 발효 초기에 pH는 급속히 감소하여 발효 12-14일째에 적숙기 pH 4.3까지 감소하였다. 발효 16일째 이후로 pH 4.0 이하로 떨어졌다. 발효 기간 중 열무물김치의 산도변화는 열무김치에서와 같이 pH의 변화에 반비례하는 관계로 발효의 진행과 함께 증가하는 경향을 나타내었다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치인 control시료는 14일째에 적숙기의 pH에 도달하였으며, 유황 처리한 열무로 제조한 김치시료는 12일째에 적숙기의 pH에 도달하였다. 즉 유황 처리한 시료는 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 빠른 시일에 적숙기에 도달하였다. 적숙기에 열무물김치의 산도는 0.20-0.24%의 범위로 열무김치에 비해 낮은 산도를 나타내었다. 이는 열무물김치 중에 함유된 다량의 수분에 의한 것으로 추측할 수 있다. 유황 처리한 열무로 제조한 열무김치 시료 A와 B는 비슷한 발효 양상을 나타내었다. 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 유황 처리한 토양에서 재배한 열무의 발효가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 유황 처리한 열무재배에서 유황처리 후 토양을 덮어주는 것은 열무물김치의 발효에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표 5. Changes in pH and acidity of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

	Day	Control	Sample A	Sample B
pH	0	5.7	5.8	5.9
	2	5.6	5.7	5.7
	5	5.4	5.4	5.4
	9	5.1	5.1	5.1
	16	4.1	3.9	4.1
	Acidity (%)	0	0.05	0.05
2		0.09	0.09	0.09
5		0.13	0.11	0.12
9		0.14	0.14	0.15
16		0.32	0.34	0.34

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

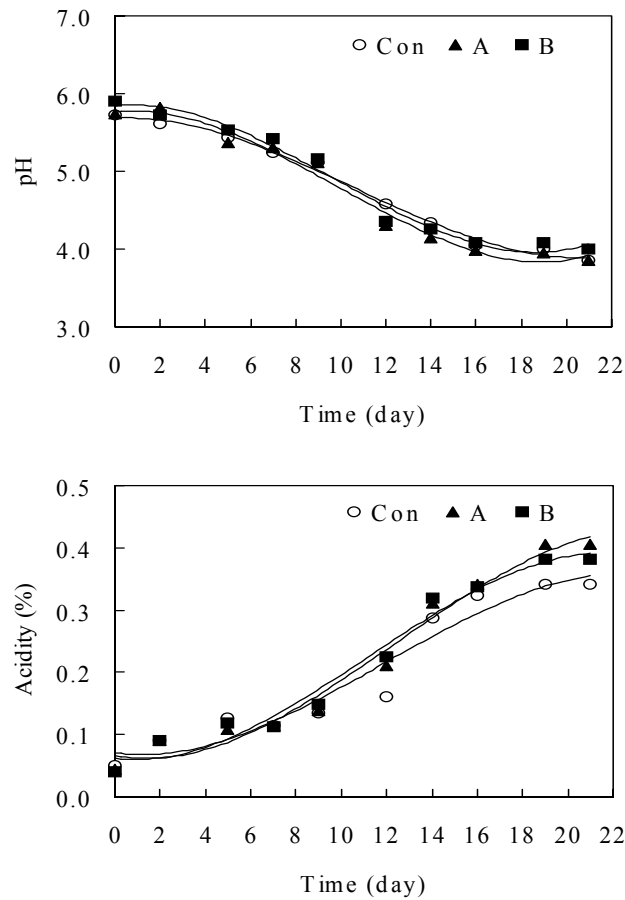


그림 4. Changes in pH and acidity of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

## 2) 젖산균 수의 변화

유황의 농도를 달리한 토양에서 열무를 재배한 열무와 일반 토양에서 재배한 열무를 이용하여 담근 열무김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화를 비교 검토하였다(표 6). 열무김치의 *Leuconostoc*속 함량은 열무김치를 담근 초기에  $10^6$  CFU/에서 시작하여 발효 3-4 주일째에  $10^8$  CFU/에 도달하였다. *Lactobacillus* 속도 발효초기부터  $10^6$  CFU/의 높은 함량을 나타내어 최대  $10^8$  CFU/까지 증가하였다. 그림 5에서와 같이 서로 다른 재배조건에서 재배한 열무를 사용하여 담은 열무김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화는 열무의 재배조건에 크게 영향을 받지 않았다. 즉 발효초기기간 중 유황처리한 열무와 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치 시료는 전체적으로 서로 비슷한 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균 수 함량을 나타내었다.

표 6. Changes in *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. numbers of young radish kimchi during fermentation at 5°C. (CFU/)

	Week	Control	Sample A	Sample B
<i>Leuconostoc</i> sp.	0	$1.9 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
	2	$6.7 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
	4	$4.4 \times 10^8$	$4.6 \times 10^8$	$6.1 \times 10^8$
	6	$3.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$
	8	$1.9 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$
<i>Lactobacillus</i> sp.	0	$4.9 \times 10^6$	$5.6 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
	2	$1.8 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$
	4	$1.4 \times 10^8$	$3.5 \times 10^7$	$8.1 \times 10^7$
	6	$1.1 \times 10^8$	$2.4 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$
	8	$4.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

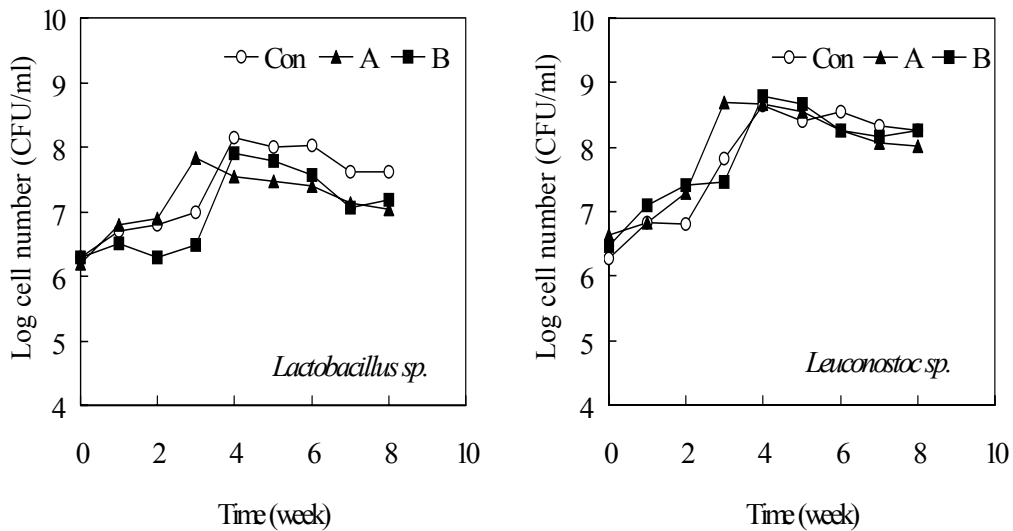


그림 5. Changes in *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. of young radish kimchi during fermentation at 5°C.

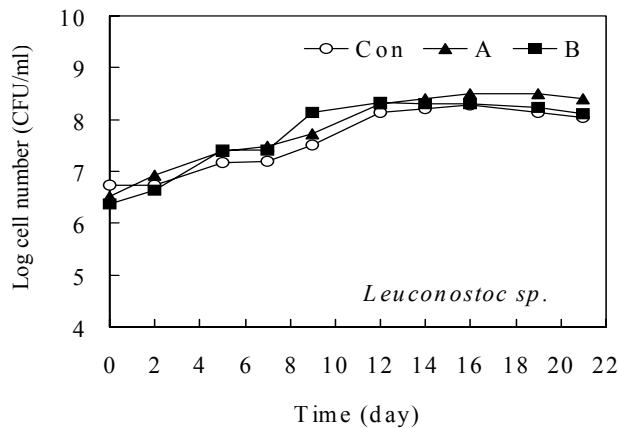
표 7에서는 열무물김치의 숙성 및 발효기간 중 젖산균수의 변화를 나타내었다. 열무물김치의 *Leuconostoc*속 함량은 열무물김치를 담근 발효초기에  $10^6$  CFU/에서 시작하여 발효 5일째에  $10^7$  CFU/에 도달하였다. *Lactobacillus* 속 균은 발효초기부터  $10^6$  CFU/의 높은 함량을 나타내어 발효 16일째에 최대  $10^8$  CFU/까지 증가하였다. 그림 6에서와 같이 서로 다른 재배조건에서 재배한 열무를 사용하여 담은 열무물김치는 열무김치에서와 같이 발효기간 중 젖산균수의 변화는 열무의 재배조건에 크게 영향을 받지 않고 서로 비슷한 발효 양상을 나타내었다.

표 7. Changes in *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. numbers of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C. (CFU/)

	Day	Control	Sample A	Sample B
<i>Leuconostoc</i> sp.	0	$5.4 \times 10^6$	$8.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$
	2	$5.5 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$
	5	$1.5 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$
	9	$3.3 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$
	16	$1.9 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$
<i>Lactobacillus</i> sp.	0	$3.0 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$
	2	$4.0 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$
	5	$8.2 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$
	9	$6.7 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
	16	$1.1 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$

Sample A:  $1818\text{g}/\text{m}^3$

Sample B:  $1818\text{g}/\text{m}^3$  +복토2cm



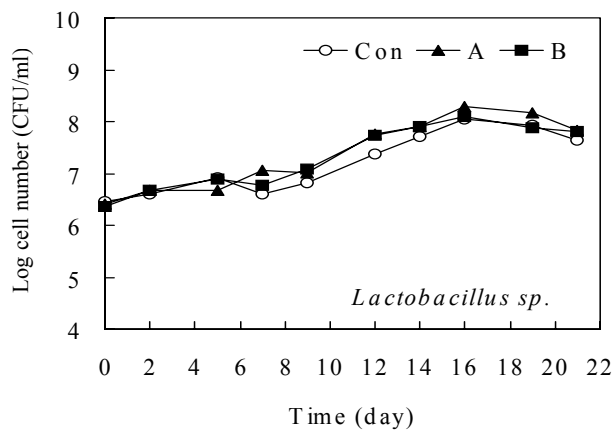


그림 6. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

다. 가을에 파종한 열무로 제조한 기능성 열무김치 및 열무물김치의 발효 특성

#### 1) pH 및 산도의 변화

가을에 유향처리 농도를 달리하여 파종하여 재배한 열무를 사용하여 표준화된 방법으로 열무김치와 열무물김치를 제조하여 5°C의 저장온도에서 발효시켰을 때의 pH 및 산도의 변화를 관찰하였다. 본 연구에서는 재배 시기별 일반 토양과 유향처리 농도를 달리하여 재배한 열무로 제조한 열무김치의 발효과정 중 pH 및 산도변화의 결과를 표 8과 그림 7에 나타내었다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 control 열무김치 시료와 유향 처리한 열무김치시료는 4-6 주일째에 적숙기의 pH에 도달하였다. 즉 유향 처리한 시료는 일반 토양에서 재배한 열무를 사용한 김치시료에 비해 빠른 시일에 적숙기에 도달하였다. 산도의 변화는 pH의 변화와 반비례관계로 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였다. 적숙기에 열무김치의 산도는 여름에 파종한 열무김치의 시료와 비슷한 경향으로 0.85-1.25%의 범위의 높은 산도를 나타내었다. 이러한 산도의 결과로부터 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치에 비해 유향 처리한 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치의 경우 발효가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 유향 처리한 열무재배에서 유향 처리 후 토양을 더 덮어주는 것은 열무김치의 발효에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.



표 8. Changes in pH and acidity of young radish kimchi during fermentation at 5°C

	Week	Control	Sample A	Sample B
pH	0	5.6	5.4	5.4
	2	5.0	5.0	5.1
	4	4.5	4.3	4.4
	6	4.4	4.2	4.2
	8	4.3	4.1	4.1
Acidity (%)	0	0.30	0.28	0.30
	2	0.36	0.59	0.58
	4	0.88	1.02	0.90
	6	1.06	1.20	1.05
	8	1.40	1.47	1.38

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

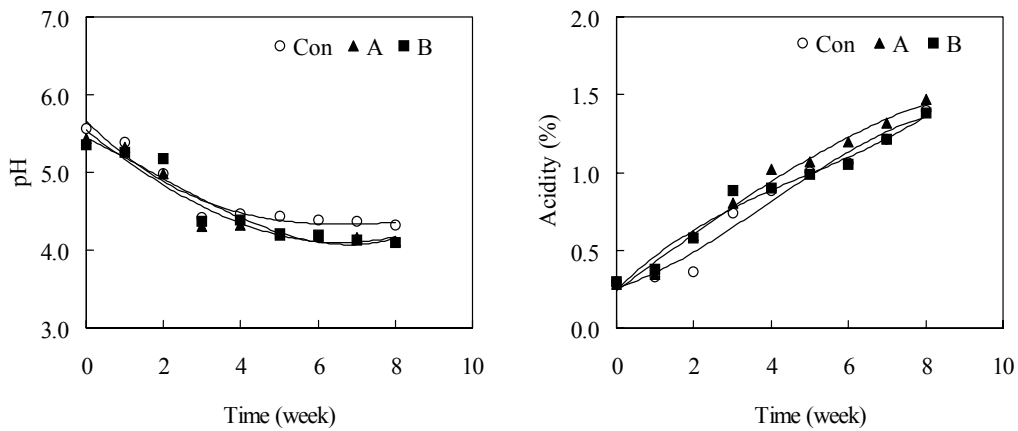


그림 7. Changes in pH and acidity of young radish kimchi during fermentation at 5°C.

가을에 파종하여 유향처리 농도를 달리하여 재배한 열무를 사용하여 표준화된 방법으로 담은 열무김치에서와 같이 열무물김치를 제조하여 5°C의 저장온도에서 발효시켰을 때의 pH 및 산도의 변화를 관찰한 결과를 표 9와 그림 8에 나타내었다. 열무물김치는 열무김치와는 달리 발효가 빠르게 진행되었다. 제조 직후 열무물김치의 pH는 5.8-5.9였으며 발효 초기에 pH는 급속히 감

소하여 발효 11일째쯤에 적숙기 pH 4.3에 도달하였다. 발효 13일째 이후로 pH 4.0 이하로 떨어졌다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치와 유황 처리한 열무로 제조한 김치시료는 비슷한 시기에 적숙기의 pH에 도달하였다.

여름에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치는 가을에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치 시료와 비슷한 발효 양상을 나타내었다. 즉, 일반 토양에서 재배한 열무에 비해 유황 처리한 토양에서 재배한 열무의 발효가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 유황 처리한 열무재배에서 유황처리 후 토양을 덮어주는 것은 열무물김치의 발효에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표 9. Changes in pH and acidity of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

	Day	Control	Sample A	Sample B
pH	0	5.9	5.8	5.8
	4	5.7	5.6	5.6
	8	4.8	4.4	4.6
	11	4.3	4.2	4.3
	13	4.0	4.0	4.1
Acidity (%)	0	0.08	0.10	0.10
	4	0.17	0.14	0.14
	8	0.24	0.24	0.24
	11	0.24	0.25	0.25
	13	0.25	0.29	0.25

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

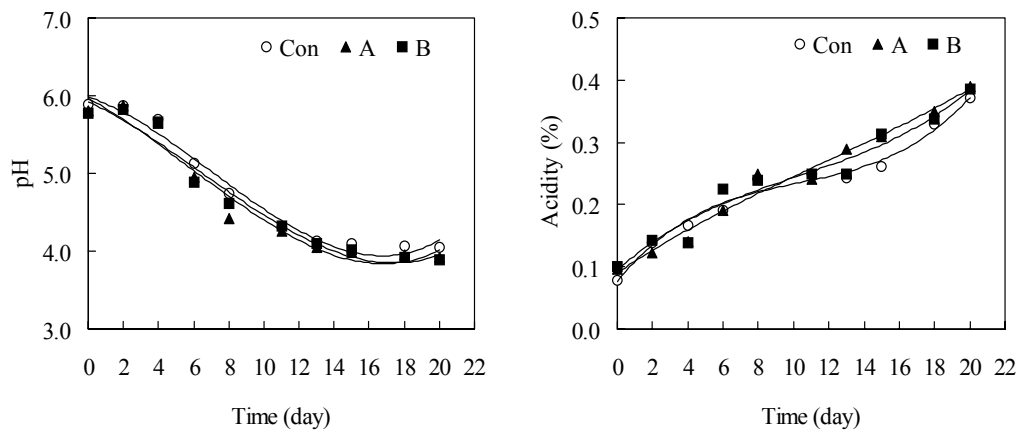


그림 8. Changes in pH and acidity of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

2) 젖산균 수의 변화

과중 및 재배 시기를 달리하여 유형의 농도를 달리한 토양에서 재배한 열무와 일반 토양에서 재배한 열무를 사용하여 담근 열무김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화를 비교 검토하였다(표 10). 열무김치의 *Leuconostoc*속 함량은 열무김치를 담근 초기에  $10^5$ - $10^6$  CFU/에서 시작하여 발효 2 주일째에  $10^8$  CFU/에 도달하였다. 그림 9에서와 같이 서로 다른 재배조건에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열무김치의 발효기간 중 젖산균수의 변화는 열무의 재배조건에 크게 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 여름에 과중하여 재배한 열무를 사용하여 제조한 열무김치시료와 비슷한 경향을 나타내어 전체적으로 서로 비슷한 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균 수 함량을 확인할 수 있었다.

표 10. Changes in *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. numbers of young radish kimchi during fermentation at 5°C (CFU/)

	Week	Control	Sample A	Sample B
<i>Leuconostoc</i> sp.	0	$8.2 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$
	2	$3.5 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
	4	$6.5 \times 10^8$	$9.4 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$
	6	$2.0 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$
	8	$2.4 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$
<i>Lactobacillus</i> sp.	0	$5.7 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
	2	$6.2 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$7.9 \times 10^6$
	4	$7.3 \times 10^8$	$3.2 \times 10^9$	$8.8 \times 10^8$
	6	$3.5 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$
	8	$7.9 \times 10^7$	$5.1 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

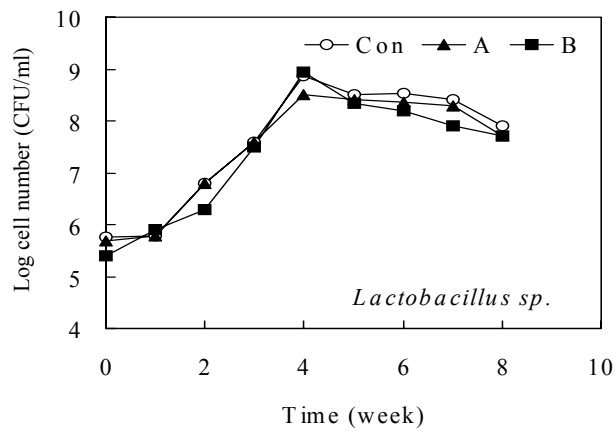
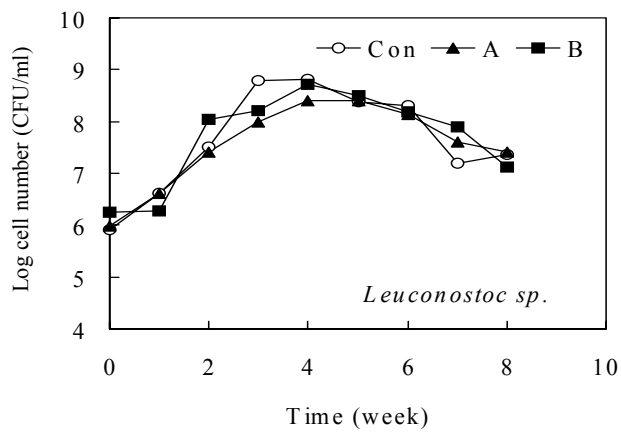


그림 9. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of young radish kimchi during fermentation at 5°C.

열무물김치의 숙성 및 발효기간 중 젖산균수의 변화관찰 결과에서, 열무물김치의 *Leuconostoc*속 함량은 열무물김치를 담근 발효초기에  $10^6$  CFU/에서 시작하여 발효 8일째에  $10^8$  CFU/에 도달하였다. *Lactobacillus* 속 균은 발효초기부터  $10^5$  CFU/의 함량을 나타내어 발효 8일째에 최대  $10^7$  CFU/까지 증가하였다(표 11). 이러한 경향은 열무의 재배 조건에 크게 영향을 받지 않았으며 서로 다른 재배조건에서 재배한 열무를 사용하여 담은 열무물김치는 열무김치에서와 같이 발효기간 중 젖산균수의 변화는 서로 비슷한 발효 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 여름에 과중하여 재배한 열무물김치의 결과와 비슷한 양상을 나타내었다(그림 10).

표 11. Changes in *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. numbers of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C (CFU/)

	Day	Control	Sample A	Sample B
<i>Leuconostoc</i> sp.	0	$1.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
	2	$1.6 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$
	5	$1.6 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
	9	$2.2 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$
	16	$2.9 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$
<i>Lactobacillus</i> sp.	0	$6.5 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$
	2	$6.5 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$
	5	$4.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$
	9	$6.8 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$
	16	$9.6 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$

Sample A: 1818g/m<sup>3</sup>

Sample B: 1818g/m<sup>3</sup> +복토2cm

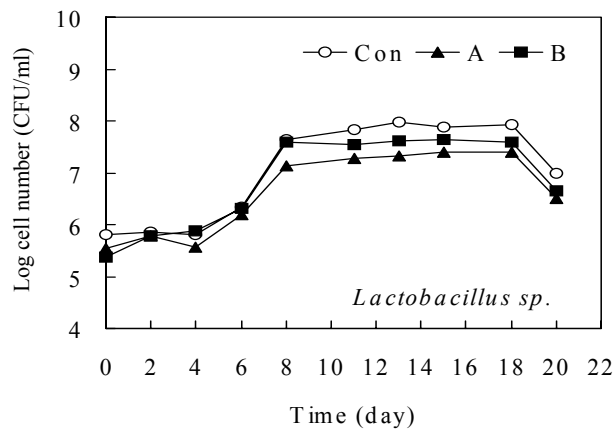
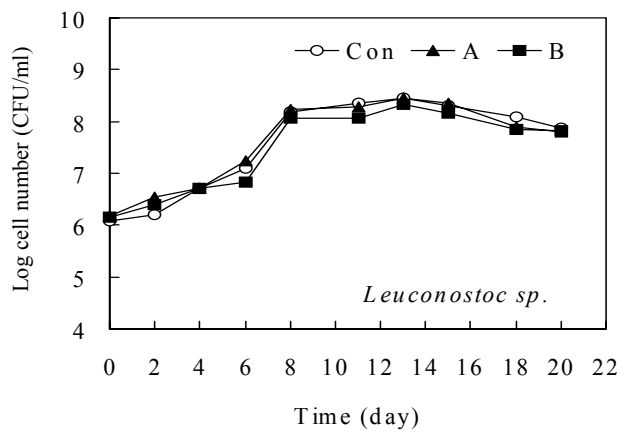


그림 10. Changes in *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* of young radish watery kimchi during fermentation at 5°C.

라. 유향 기능성 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 및 *in vitro* 항암 기능성 연구  
1) 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 효과 및 항돌연변이 효과

열무김치의 독성을 검토하기 위하여 정상 세포에 대한 일반 토양과 유향 처리한 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치 시료의 정상세포에 대한 독성을 검토하였다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치와 유향처리 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치에서는 열무김치 시료를 배양배지에 대하여 0-1.0%의 농도까지 처리하였다. 열무김치는 정상세포에 대하여 농도 0.3%까지 99% 이상의 높은 생존율을 나타내어 이 농도에서는 독성을 확인할 수 없었다. 유향처리에 대한 세포의 생존율은 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치와 비슷한 생존율을 나타내었다.

유향처리가 열무김치의 암예방기능성에 어떠한 영향을 미치는 가를 검토하기 위하여 일반 토양과 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무를 이용하여 담은 열무물김치를 담근 후 5℃의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무물김치의 즙액을 이용하여 항돌연변이 실험을 행하였다. 열무의 기능성은 수확 직후의 열무즙액을 이용하였다.

재배조건을 달리하여 재배한 열무즙액의 항돌연변이 실험결과를 표 12에 나타내었다. *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 Ames test에서 열무즙액은 100  $\mu$ l 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 31-40%의 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며 유향처리 시료 A가 가장 높은 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었다. 200  $\mu$ l 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 50%이상의 높은 돌연변이 유발 억제효과를 보였다. 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무는 일반토양에서 재배한 열무에 비해 높은 억제효과를 나타내었으며 특히 유향 처리를 한 시료 A는 61%로 가장 높은 억제효과를 나타내었으나, 시료간의 유의적인 차이는 찾아볼 수 없었다.

재배조건을 달리하여 재배한 열무를 이용하여 담은 열무물김치즙액의 항돌연변이 실험결과를 표 13에 나타내었다. 열무물김치즙액은 열무즙액에 비해 전체적으로 낮은 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다. *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용한 Ames test에서 열무물김치즙액은 100  $\mu$ l 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 26-36%의 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며 유향처리 시료 A는 36%로 가장 높은 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었다. 200  $\mu$ l 농도에서는 AFB<sub>1</sub>에 대해 일반토양에서 재배한 열무를 이용한 열무물김치즙액은 50%이하의 낮은 돌연변이 유발 억제효과를 보였으며, 유향 처리한 열무를 이용한 시료 A의 열무물김치즙액은 51%로 일반토양에서 재배한 열무에 비해 높은 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. 유향처리를 한 후 토양을 덮은 후 재배한 시료 B는 40%로 낮은 돌연변이 억제 효과를 나타내어 유향처리만 한 시료A에 비해서도 낮은 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. 항돌연변이 실험에서는 유향처리만을 한 열무시료 A를 이용하여 담은 열무김치가 높은 항돌연변이 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

㉔ 12. Antimutagenic effect of young radish kimchi juice during fermentation against aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 6.0 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

Sample	Revertants/plate	
	100 µl/plate	200 µl/plate
Spontaneous	94±5	
Control (AFB <sub>1</sub> )	762±35 <sup>a</sup>	
Control	551±9 <sup>b</sup> (31)	397±48 <sup>b</sup> (55)
Sample A	497±12 <sup>b</sup> (40)	355±7 <sup>b</sup> (61)
Sample B	536±19 <sup>b</sup> (34)	367±37 <sup>b</sup> (59)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

㉔ 13. Antimutagenic effect of young radish watery kimchi juices during fermentation against aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 6.0 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

	Revertants/plate	
	100 µl/plate	200 µl/plate
Spontaneous	94±5	
Control (AFB <sub>1</sub> )	762±35 <sup>a</sup>	
Control	589±11 <sup>b</sup> (26)	520±75 <sup>b</sup> (36)
Sample A	518±3 <sup>c</sup> (36)	420±15 <sup>c</sup> (51)
Sample B	545±6 <sup>bc</sup> (32)	493±9 <sup>b</sup> (40)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

2) 여름에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 항암효과

유황처리된 한 토양에서 재배한 열무를 사용하여 제조한 열무김치의 암예방 및 항암 효과를 알아보기 위하여 열무김치를 5℃의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무김치의 메탄올 추출액을 이용하여 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포의 성장 저해효과를



관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교하였다(표 14와 표 15). 농도 처리는 독성을 나타내지 않는 범위에서 행하였는데, 300  $\mu\text{g}$ 의 높은 농도에서 50% 이상의 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 유향처리를 한 열무로 제조한 열무김치시료는 70%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며, 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다. 유향처리를 한 열무로 제조한 열무김치시료는 HT-29 인체 결장암세포에 대해서 더 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었다.

표 14. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MIT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}/\text{assay}$	300 $\mu\text{g}/\text{assay}$
Control	0.470±0.030 <sup>a</sup>	
S-control	0.399±0.032 <sup>b</sup> (15)	0.139±0.012 <sup>b</sup> (71)
Sample A	0.336±0.035 <sup>c</sup> (29)	0.125±0.012 <sup>b</sup> (73)
Sample B	0.342±0.031 <sup>c</sup> (27)	0.131±0.013 <sup>b</sup> (72)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

표 15. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish kimchi on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}/\text{assay}$	300 $\mu\text{g}/\text{assay}$
Control	0.452±0.013 <sup>a</sup>	
S-control	0.331±0.014 <sup>b</sup> (27)	0.240±0.003 <sup>b</sup> (47)
Sample A	0.302±0.006 <sup>c</sup> (33)	0.168±0.010 <sup>c</sup> (63)
Sample B	0.303±0.026 <sup>c</sup> (33)	0.166±0.019 <sup>c</sup> (63)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

유향처리를 한 토양에서 재배한 열무를 사용하여 제조한 열무물김치의 암예방 및 항암 효과를 알아보기 위하여 열무김치에서와 같이 5°C의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음

열무물김치의 메탄올 추출액을 이용하여 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포의 성장 저해효과를 관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교하였다(표 16와 표 17). 열무물김치의 시료처리는 열무김치에서와 같이 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 행하였다. 300  $\mu\text{g}$ 의 높은 농도에서 50% 이상의 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 유황처리를 한 열무로 제조한 열무김치시료는 80%이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며, 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다. 유황처리를 한 열무로 제조한 열무물김치시료는 HT-29 인체 결장암세포에 대해서 일반 토양에서 재배한 열무로 재배한 열무김치보다 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었다.

표 16. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish watery kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}/\text{assay}$	300 $\mu\text{g}/\text{assay}$
Control	0.443±0.029 <sup>a</sup>	
S-control	0.399±0.016 <sup>b</sup> (10)	0.078±0.003 <sup>b</sup> (82)
Sample A	0.338±0.035 <sup>c</sup> (24)	0.083±0.007 <sup>b</sup> (81)
Sample B	0.342±0.040 <sup>c</sup> (23)	0.078±0.009 <sup>b</sup> (83)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

표 17. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish watery kimchi on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}/\text{assay}$	300 $\mu\text{g}/\text{assay}$
Control	0.461±0.022 <sup>a</sup>	
S-control	0.367±0.015 <sup>b</sup> (20)	0.216±0.036 <sup>b</sup> (53)
Sample A	0.348±0.024 <sup>b</sup> (25)	0.197±0.025 <sup>c</sup> (57)
Sample B	0.340±0.039 <sup>b</sup> (26)	0.189±0.023 <sup>c</sup> (59)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

3) 가을에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 항암효과

가을에 파종하여 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무를 사용하여 제조한 열무김치의 암예방 및 항암 효과를 알아보기 위하여 열무김치를 5°C의 발효온도에서 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무김치의 메탄올 추출액을 이용하여 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포의 성장 저해효과를 관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교하였다(표 18와 표 19). 여름에 파종하여 재배한 열무로 제조한 열무김치에서와 같이 독성을 나타내지 않는 범위에서 시료처리를 행하였다. 열무김치 시료는 50% 이상의 높은 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 유향처리를 한 열무로 제조한 열무김치시료가 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치보다 높은 암세포 증식억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 시료 A와 시료 B는 두 시료 간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다. 이러한 결과는 여름에 파종하여 재배한 열무김치의 암예방 및 항암효과와 비슷한 결과를 나타내었다.

표 18. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu$ g/assay	300 $\mu$ g/assay
Control	0.415 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	
S-control	0.235 $\pm$ 0.048 <sup>b</sup> (57)	0.112 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup> (73)
Sample A	0.186 $\pm$ 0.015 <sup>c</sup> (67)	0.074 $\pm$ 0.009 <sup>c</sup> (82)
Sample B	0.183 $\pm$ 0.031 <sup>c</sup> (63)	0.074 $\pm$ 0.006 <sup>c</sup> (82)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 19. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish kimchi on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu$ g/assay	300 $\mu$ g/assay
Control	0.374 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	
S-control	0.284 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup> (24)	0.157 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup> (58)
Sample A	0.245 $\pm$ 0.023 <sup>c</sup> (34)	0.147 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup> (61)
Sample B	0.244 $\pm$ 0.038 <sup>c</sup> (35)	0.145 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup> (61)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

가을에 과중하여 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무를 사용하여 제조한 열무물김치의 암예 방 및 항암 효과를 알아보기 위하여 열무김치에서와 같은 방법으로 적숙기 pH 4.3까지 발효시킨 다음 열무김치의 메탄올 추출액을 이용하여 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포의 성장 저해효과를 관찰하여 일반토양에서 재배한 열무의 결과와 비교하였다(표 20과 표 21). 열무물김치의 시료처리는 열무김치에서와 같이 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 행하였다. 대부분의 열무물김치 시료는 300  $\mu\text{g}$ 의 높은 농도에서 60% 이상의 높은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 유향처리를 한 열무로 제조한 열무물김치시료는 일반 토양에서 재배한 열무물김치보다 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며, 시료 A와 시료 B는 두 시료간의 유의적 차이 없이 비슷한 암예방효과를 나타내었다. 이러한 결과는 여름에 과중하여 재배한 열무로 제조한 열무물김치에서와 비슷한 항암효과를 나타내었다.

표 20. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish watery kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}$ /assay	300 $\mu\text{g}$ /assay
Control	0.444±0.028 <sup>a</sup>	
S-control	0.392±0.050 <sup>ab</sup> (12)	0.129±0.011 <sup>b</sup> (71)
Sample A	0.369±0.021 <sup>b</sup> (17)	0.102±0.007 <sup>c</sup> (77)
Sample B	0.361±0.060 <sup>b</sup> (19)	0.104±0.008 <sup>c</sup> (77)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

표 21. Inhibitory effect of methanol extracts from young radish watery kimchi on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay

	OD <sub>540</sub> (Level of sample)	
	150 $\mu\text{g}$ /assay	300 $\mu\text{g}$ /assay
Control	0.378±0.004 <sup>a</sup>	
S-control	0.264±0.027 <sup>b</sup> (30)	0.151±0.026 <sup>b</sup> (60)
Sample A	0.248±0.034 <sup>c</sup> (34)	0.145±0.012 <sup>bc</sup> (62)
Sample B	0.248±0.045 <sup>c</sup> (35)	0.125±0.006 <sup>c</sup> (67)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

마. 유향 기능성 열무로 제조한 열무김치 및 열무물김치의 세포 독성 및 *in vivo* 항암 기능성 연구

1) 열무김치 및 열무물김치의 세포독성 및 고형암 성장 저지 효과

Sarcoma-180 cell에 대한 일반 토양과 유향 처리한 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치 시료에 의한 항종양효과를 보기 위하여, 세포에 대한 열무김치의 독성을 검토하였다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치와 유향처리 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치에서는 열무김치 시료를 0-4%의 농도까지 처리하였을 때 세포에 대하여 98% 이상의 높은 생존율을 나타내어 이 농도에서는 독성을 확인할 수 없었다. 유향처리에 대한 세포의 생존율은 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치와 비슷한 생존율을 나타내었다.

Sarcoma-180 cell에 대한 일반 토양과 유향 처리한 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치 시료에 의한 항종양효과를 보기 위하여 마우스의 왼쪽 서혜부 피하에 종양세포를 이식시킨 후 20일 동안 열무김치의 메탄올추출물을 PBS에 희석하여 복강에 투여하고, 26일째에 마우스를 해부하여 종양을 분리하여 그 무게를 측정된 결과를 표 22에 나타내었다. 표 22에서 보는 바와 같이 대조군의 고형암 무게는 7.28 g인데 반해서, 열무김치 추출물을 투여한 군에서는 고형암의 무게는 6.40 g, 6.05 g, 4.49 g 으로 유의적으로 고형암 무게가 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치에 비해 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치가 고형암을 무게를 줄여주는 것을 확인할 수 있었다. 토양에 유향처리를 하는 농도에 따라 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 유향 처리 농도가 높을수록 고형암을 줄여 주어 항암성을 높여주는 것을 확인할 수 있었다.

표 22. Antitumor activities of methanol extracts from young radish kimchi in tumor bearing Balb/c mice with sarcoma-180 cell

Sample	Tumor wt. (g)	Inhibition rate (%)
Sarcoma 180 + PBS	7.28±0.17	-
+ Control	6.40±0.40	15
+ Sample A	6.05±0.55	20
+ Sample B	4.49±0.19	40

2) 열무김치 및 열무물김치의 마우스의 장기무게 변화

표 23에서는 유향처리를 한 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치가 Sarcoma-180 cell의 이식이 각각의 장기에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 장기의 중량을 측정된 결과를 나타내었다. 먼저 대사과정 중에 생기는 여러 유해한 물질의 해독작용을 담당하는 간의 중량비는 군 간에 큰 차이가 없었고, 면역계에 관계하는 비장의 중량은 sarcoma- 180 cell을 주사하지 않은 대

조군에서는 0.6 g이었으나, sarcoma-180 cell을 주사하고 PBS를 투여한 군에서는 2.0 g 으로 비장의 무게가 크게 증가하였으나, 열무김치 시료를 투여한 군에서는 그 비장의 무게가 다소 줄어드는 것을 볼 수 있다. 유향처리 농도의 증가를 시킴으로서 비장의 무게가 다소 감소하였다.

표 23. Effect of methanol extracts from young radish kimchi on the weights of body and organs of Balb/c mice

Sample	Body wt. (g)	Spleen/body wt. (%)	Liver/body wt. (%)	Kidney/body wt. (%)
Control	26.1±0.9	0.6±0.2	6.2±1.9	1.9±0.3
Sarcoma 180 + PBS	32.8±1.5	2.0±0.0	5.8±0.3	1.5±0.0
+ Control	31.1±0.4	1.8±0.1	6.2±0.5	1.6±0.1
+ Sample A	29.4±0.5	1.8±0.1	6.1±0.3	1.5±0.1
+ Sample B	29.8±1.8	1.6±0.3	5.7±1.2	1.3±0.4

### 3) 열무김치 및 열무물김치의 Glutathione S-transferase (GST) 활성

간에서 일어나는 대사 효소계의 phase II 단계는 내인성 물질이나 외부에서 투여되어진 독성 물질을 포함하거나 수용성 물질로 전환시켜 체외로 배출시킴으로써 이물질을 제거하는 작용을 하는데 GST는 reduced glutathione을 이용하여 체내 독성 물질과 과산화물질을 전이, 배설함으로써 무독화에 관여하는 효소이다.

표 24에서와 같이 마우스에 S-180 cell를 주사하고 PBS만 주사한 군에서는 298로 낮은 활성을 보였으나, 유향 처리를 한 열무로 제조한 열무김치A 추출물을 투여한 군에서는 403, 열무김치B 추출물을 주사한 군에서는 396의 높은 활성을 나타내었다. 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치C 추출물을 투여한 군은 381로 높은 활성을 보였으나, 유향 처리를 한 열무로 제조한 열무김치보다는 낮은 활성을 나타내었다

표 24. Effects of methanol extracts from young radish kimchi on glutathione S-transferase activity in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice

Sample	nmol/mg protein/min
No-Sarcoma 180 +Control	17.4
Sarcoma 180 + Control	297.6±10.2
+ S-Control	380.8±74.6
+ Sample A	403.4±20.4
+ Sample B	396.7±71.8

### 제 3 세부 가공 공정 확립 및 산업화 제품 개발

#### 1. 연구수행 방법

##### 가. 기능성 열무를 이용한 열무김치의 제조

기능성이 가장 높은 열무를 생산할 수 있는 조건하에서 열무를 재배하여 열무김치를 제조한 후 열무김치의 발효특성, 성분분석 및 관능검사 등의 결과를 비교 검토하여 기능성열무를 이용한 열무김치의 맛과 기능성을 증진시킨 레시피 및 제조 방법을 확립하였다.

##### 1) 열무김치의 pH 및 적정산도

제조한 열무김치의 pH는 시료 10 g에 증류수 40 ml 가하여 homogenizer로 마쇄 (8,000 rpm, 5 min)하고 여과한 후, 그 액의 일부를 취하여 pH meter (Corning 220, U.S.A) 로 측정하고, 적정산도는 마쇄여액 20 ml 취하여 pH가 8.3이 될 때까지 소요된 0.1N-NaOH의 양을 아래의 계산식에 따라 lactic acid 환산법으로 계산하여 표시하였다.

$$\text{Titration acidity (lactic acid, \%)} = \frac{\text{of 0.1N NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 0.09}{\text{Sample(g)}} \times 100$$

##### 2) 발효조건별 열무김치의 제조조건 검토

최적의 기능성을 나타내는 시기 및 조건에서 재배한 열무를 수확하여 기능성 증진 열무김치를 제조하기 위하여 관능검사를 통한 맛과 기능성을 검토하고 나아가서 저장성에 미치는 영향도 관찰하였다.

##### 가) 관능검사

반복된 랜덤화 완전블록계획(replicated randomized complete block design)에 따라서 훈련된 8명의 관능요원이 1회에 3가지 시료를 평가하게 하고 이를 4회 반복 실시하였다. 묘사항목은 주관적인 평가로 종합적인 외관, 냄새, 향미, 질감으로 평가하고, 9점 척도법을 사용하여 평가하였으며, 9에 가까울수록 극도로 좋고, 1에 가까울수록 극도로 싫은 것으로 나타내었다.

객관적인 평가로는 미각적 지각인 신맛 (sour flavor), 군덕맛 (moldy flavor), 덜익은 맛 (green flavor), 짠맛, 매운 맛 그리고 질감으로 경도(hardness)를 평가하였으며, 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고, 9에 가까울수록 극도로 강하게 감지하는 것으로 나타내었다. 미각적 지각은 여러 차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 덜익은 맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

나. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 색소 및 비타민 C 함량

1) Carotenoids의 분석

Carotenoids는 시료 20 g을 100 acetone으로 추출하여 흡입 여과한 다음 60% KOH로 24 시간 검화 시킨 후 petroleum ether(PE)로 재추출하였다. 총 carotenoids의 정량은 PE 중에서의 가시부 흡수 spectrum의  $\lambda$  max의 흡광도에 의하여 McBeth법에 따라 계산하였다.

2) Chlorophylls의 분석

Chlorophylls의 분석은 Benitez등의 방법을 사용하였다. 시료 10 g을 osterizer blender에 넣고, 85% acetone 200 를 가하여 마쇄한 후 흡입 여과한 뒤 냉암소에 방치한 것을 원액으로 하여 anthocyan등의 수용성 물질을 제거하기 위해 diethyl ether와 물을 가하여 정제하였다. 정제한 추출액을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수하고 유리 여과기로 여과한 후 diethyl ether로 정용하여 660 및 642.5 nm에서 흡광도를 측정하고 chlorophylls의 농도를 다음의 Comar 및 Zscheile의 정량식으로 계산하였다.

$$\text{총 클로로필}(\mu\text{g}/) = 7.12\text{OD}(660\text{nm})+16.8\text{OD}(642.5\text{nm})$$

$$\text{클로로필 a}(\mu\text{g}/) = 9.93\text{OD}(660\text{nm})-0.777\text{OD}(642.5\text{nm})$$

$$\text{클로로필 b}(\mu\text{g}/) = 17.6\text{OD}(660\text{nm})-2.81\text{OD}(642.5\text{nm})$$

3) Vitamin C 함량 분석

Vitamin C는 마쇄한 열무김치 시료에 5% metaphosphoric acid 용액을 가한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 2 씩 시험관에 취하여 oxidation, osazone형성, osazone 용해의 순서로 조작한 후 spectrophotometer를 이용하여 파장 540 nm에서 비색 정량하였다

다. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 기능성 증진효과

기능성 김치의 제품 개발을 위한 열무김치의 맛의 증진 방안을 검토하였다. 부재료의 첨가정도에 따른 맛과 기능성을 증진 시킨 열무김치를 제조하여 관능검사를 통해 그 증진 효과를 검토하였다.

1) 기능성 열무 및 열무김치의 생리기능성 검증

열무김치에서 암예방효과를 확인하기 위해서는 수확한 열무시료 및 열무김치시료를 준비하였다. 열무김치를 발효하여 활성이 가장 컸던 시기의 열무김치를 냉동건조하고, 냉동건조된 시료는 hexane으로 3회 추출하고 잔사물을 2배의 메탄올로 95℃에서 환류냉각기를 사용하여 3회 추출하였다. 회전식 진공농축기(Buchi oll & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 용매를 제거하고 암세포 증식 억제 실험(MTT assay)을 수행하였다.

가) MTT assay

동물세포를 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cell/well이 되게 180  $\mu$ l 분주하고 시료를 일정농도로 제



조하여 20  $\mu\text{l}$  첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550  $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150  $\mu\text{l}$ 를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

## 2) 기능성 증진 열무김치(김치추출물)의 *in vivo* 항암실험

Balb/c mouse에 S-180 암세포를 투여 및 이식하여 수명연장효과, tumor size weight 및 간의 여러 효소활성 실험 등으로 검토하였다.

### 가) 마우스를 이용한 *in vivo*에서의 항암효과 실험

본 실험에 사용한 동물은 웅성 Balb/c mouse로 체중이 30 g 정도의 것을 사용하며, 사료는 표준사료로 사육하였다. 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하고, 동물실은 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였다. 실험동물의 복강내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline(PBS)와 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상정액을 제거한 후 sarcoma-180 세포를  $1.0 \times 10^6$  cells/가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 싹을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 시료는 멸균된 PBS를 사용하여 조제하였으며 투여량은 마우스당 0.5 mg으로 하고 대조군은 멸균 PBS만 주사하였으며 투여하지 않을 때는 냉각고에 보관하면서 사용하였다.

### (1) 세포 독성 실험(Viability test)

김치시료의 직접적인 세포 독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 하였다. 1회용 24 well plate에 20% HFCS (heat inactivated fetal calf serum: Gibco Lab., USA)을 함유한 EMEM(Eagle's minimal essential medium: Gibco Lab., USA)배지 1 에  $5 \times 10^4$  cell/plate가 되게 seeding하였다. 여기에 20  $\mu\text{l}$ 의 김치 시료를 넣어서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포 50  $\mu\text{l}$ 를 0.2% trypan blue 용액 50  $\mu\text{l}$ 와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수, 염색되어진 세포(non-viable cell)수 및 염색되지 않은 세포(viable cell)수를 측정한다. 김치 시료를 넣지 않은 대조 세포군과 비교하여 viability 비율을 계산하였다.

$$\text{Viable cell (\%)} = \frac{\text{Total number of viable cells per of aliquot}}{\text{Total number of cells per of aliquot}} \times 100$$

(2) 고형암 성장 저지 실험

실험동물을 각 군당 10 마리씩으로 하여 실험실에서 계대 보관 중인 종양세포 부유액  $0.2 (6 \times 10^6 \text{ cells/mouse})$ 씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식한 후 24시간 후부터 20 일간 매일 1회씩 시료 용액을 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 32일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정하였다.

(3) 마우스 간 내의 효소활성 실험

(가) 조직 중의 glutathione의 함량 측정

Ellman의 방법에 준하여 homogenate한 간조직 0.5 g에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 단백질을 제거한 상등액에 disulfide reagent (0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid를 녹임) 2.7 ml를 가하여 20분 방치한 후 생성되는 청색을 412 nm에서 측정하고 표준 곡선에 의하여 산정하며, 단위는 조직 1 g당 glutathione  $\mu\text{mole}$ 로 표시하였다.

(나) Glutathione S-transferase의 활성 측정

Habig 등의 방법에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 0.04M reduced glutathione 0.075 ml를 가한 후 효소액을 0.1 ml 넣고 blank에는 20% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가해 600  $\times$ g에서 원심분리하여 단백질을 제거하고 시료는 25°C에서 5분간 반응시킨 후 blank와 시료 각각에 기질로써 0.12M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 0.025 ml 가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 다음 시료에 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 완결시킨 후 blank와 시료 각각을 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정한 다음 2,4-dinitrochlorobenzene의 mole 흡광계수  $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위(enzyme unit, EU)는 1분간 1 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole 수로 표시하였다.

라. 품종별로 수확한 열무를 이용하여 제조한 열무김치 *in vitro*의 항암효과검토

(MTT test, cell growth inhibition test 등으로 검토).

실험에 주로 사용되는 암세포는 인체 대장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell)와 인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)로 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 사용하였다. HT-29 결장암세포와 AGS 위암세포는 100 units/ml의 Penicillin-Streptomycin과 10%의 FCS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 5 ml씩 일정 수분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 1) 암세포 증식억제 실험

암세포배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 HT-29 암세포는 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/ml의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고, 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FCS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이들에 한번씩 배양액을 교체하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료는 2일마다 10 µl/ml medium씩 농도별 첨가한 새로운 배지로 교체하고 배양 6-7일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제효과를 관찰하였다.

### 2) MTT assay

세포를 96 well plate에 1×10<sup>4</sup> cell/well이 되게 180 µl 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 µl 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 20 µl를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550 ×g에서 10 분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150 µl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

## 2. 연구 결과

### 가. 부재료 배합에 따른 유황처리 열무김치의 개발

#### 1) 유황처리 열무김치의 제조 연구

선행의 연구에서 결정된 일반 열무를 이용한 표준화 열무김치 (SYRK :Standardized young radish kimchi) 레시피에서 재료 배합비는 절인 열무 100에 대해 마늘 2.9, 생강 1.6, 잔파 8.0, 고춧가루 4.2, 빨간 고추 7.9, 멸치 액젓 3.7이다 (표 1). 이 레시피를 토대로 하여 유황처리 열무김치에 알맞은 재료 배합을 알아보려고 하였다. 일반 열무김치의 재료 배합비를 표준값으로 하여 표준편차만큼의 양을 가감하여 담근 유황처리 열무김치를 5°C에서 3주간 발효시켰다.

표 1. Standardized ingredient ratios of young radish (YR) kimchi

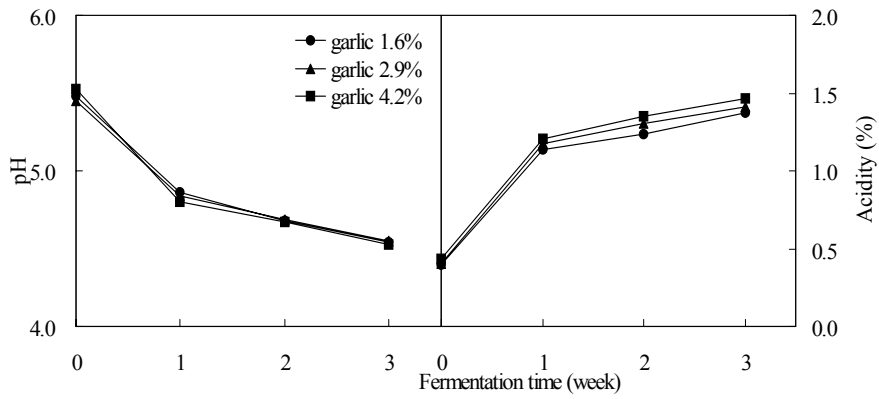
Ingredients	Weight (g)
Young radish	100
Garlic	2.9 ± 1.3
Ginger	1.6 ± 0.7
Green onion	8.0 ± 3.8
Red pepper	7.0 ± 1.7
Red pepper powder	4.2 ± 1.2
Anchovy juice	3.7 ± 0.5
Final salt concentration (%)	2.5

2) 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 조절에 따른 이화학적 특성

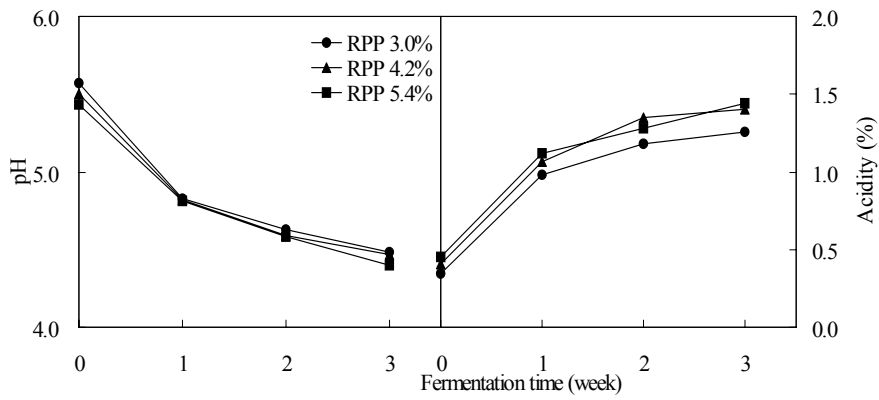
열무김치제조에 사용되는 재료 중 김치의 맛과 기능성에 가장 큰 영향을 미칠 수 있는 것으로는 마늘과 고춧가루, 멸치액젓을 들 수 있다. 따라서 일반열무김치의 재료 배합비를 표준값으로 하여 표준편차만큼 마늘과 고춧가루, 멸치액젓의 양을 가감하여 유향처리 열무김치를 제조한 후 5°C에서 발효에 따른 pH와 산도의 변화를 관찰하였다(그림 1).

마늘, 고춧가루, 멸치 액젓의 첨가 농도에 따른 유향처리열무김치의 pH의 변화는 전체적으로 첨가농도를 달리한 군 간에 큰 차이 없이 3주째에 적숙기 pH 4.3에 도달하였다. 마늘 첨가농도에 따른 열무김치의 pH는 담근 직후에서부터 발효과정 중에 농도간의 차이가 없었으며, 산도의 경우 마늘의 첨가 농도가 높을수록 열무김치의 산도도 높아졌다(그림 1A). 고춧가루 첨가농도에 따른 열무김치의 pH는 담근 직후에서 발효과정 동안에 별다른 차이가 없었으며, 산도의 경우 발효과정 중 고춧가루의 첨가 농도가 높을수록 높은 산도값을 나타내었다. 즉, 고춧가루를 3.0% 첨가한 열무김치보다 4.2%와 5.4%를 첨가한 경우에서 산도값이 높았다(그림 1B). 멸치 액젓의 첨가농도에 따른 변화를 본 결과에서는 (그림 1C), 마늘과 고춧가루와 마찬가지로 pH는 별다른 차이가 없었으며, 산도의 경우 멸치 액젓의 첨가 농도가 높을수록 산도값도 높아졌다.

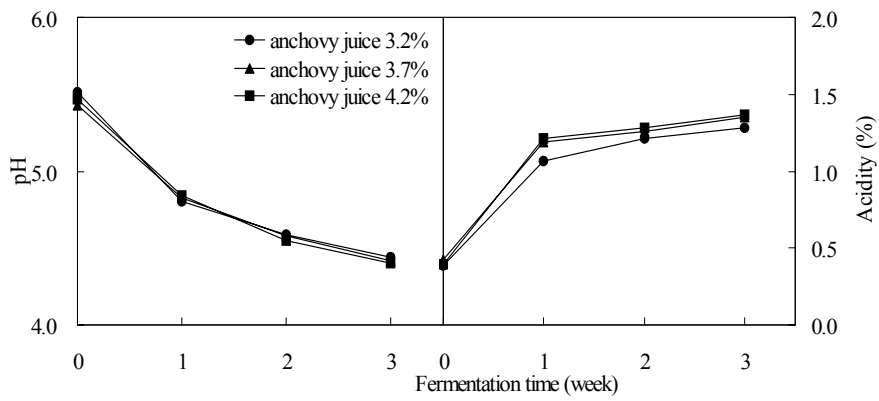
위의 결과로부터 마늘과 고춧가루, 멸치액젓의 첨가가 pH에는 별다른 영향을 주지 않았으며 산도에는 첨가 농도가 증가할수록 높아지는 것으로 보아 유향처리 열무김치의 발효를 촉진시킨 것으로 사료된다.



A. Different ratio of garlic



B. Different ratio of red pepper powder(RPP)



C. Different ratio of anchovy juice

그림 1. Changes in pH and acidity of young radish kimchi fermented with different ratio of ingredients at 5°C after 3 weeks

### 3) 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 조절에 따른 관능검사

유황처리 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치의 재료 배합비의 표준화를 위하여 마늘, 고춧가루, 멸치 액젓을 일반 열무김치의 재료 배합비를 표준값으로 하여 표준편차만큼의 양을 가감하여 유황처리 열무김치를 제조하여 5℃에서 적숙기가 될 때 까지 (3주간) 발효시킨 후 적숙기의 열무김치로 에서 관능검사를 실시하였다 (그림 2). 관능검사의 결과는 QDA(quantitative descriptive analysis) profile로 나타내었다.

절인 유황처리 열무 100에 대하여 마늘의 첨가 농도가 높을수록 주관적인 평가(종합적평가, 외관)에서 관능적으로 좋았고 객관적 평가항목(신내, 신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 쓴맛이 감소하였으며, 군덕맛, 덜익은맛, 짠맛, 매운맛, 조직감에서는 차이를 보이지 않았다(그림 2A). 열무김치제조에 고춧가루의 첨가농도가 높을수록 주관적인 평가(종합적평가, 외관)에서 관능적으로 좋았고, 객관적 평가항목(신내, 신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 덜익은 맛과 쓴맛은 감소하였고, 매운맛은 증가하였으며, 신내, 군덕맛, 짠맛, 조직감에서는 차이를 보이지 않았다(그림 2B).

멸치액젓의 배합비에 있어서는 첨가농도가 높을수록 주관적인 평가(종합적평가, 외관)에서 관능적으로 좋았고 객관적 평가항목(신내, 신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 신내와 쓴맛, 덜익은 맛은 .3.2%에 비하여 3.7%와 4.2%에서 감소하였고, 군덕맛, 짠맛, 조직감에서는 차이를 보이지 않았다(그림 2C).

위의 결과로부터 유황처리 열무김치는 일반열무김치에 비하여 마늘, 고춧가루, 멸치 액젓 등의 부재료(양념)의 첨가농도가 높을수록 주관적인 평가항목인 외관과 종합적인 평가에서 좋아지고, 객관적인 평가항목인 쓴맛이 적어서 관능적으로 우수하였으며, 이는 일반 열무김치의 표준값인 부재료 첨가농도에 비하여 전반적으로 높은 결과였다. 이는 유황처리 토양에서 자란 열무가 일반 토양에서 자란 열무에 비하여 쓴맛 강하여 첨가되는 부재료의 농도가 증가할 경우 쓴맛을 감소시켜주기 때문으로 사료된다.

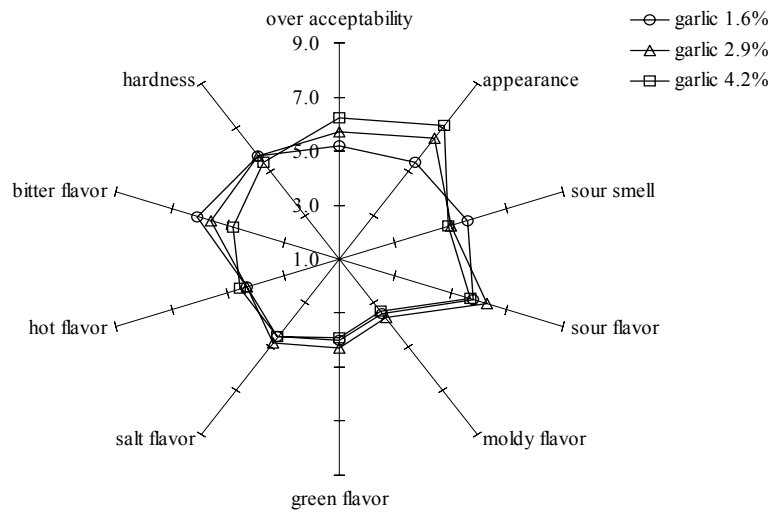


그림 2A. QDA profile<sup>1)</sup> of young radish kimchi fermented with different ratio of ingredients (garlic) at 5°C after 3 weeks

<sup>1)</sup> Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely good, 9-extremely bad in subjective evaluations (appearance, over acceptability), and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor, salt flavor, hot flavor, bitter flavor)

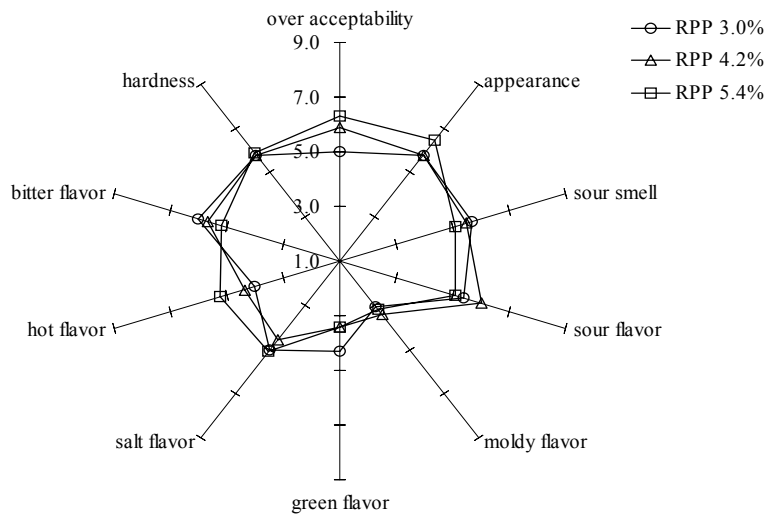


그림 2B. QDA profile of young radish kimchi fermented with different ratio of ingredients (red pepper powder, RPP) at 5°C after 3 weeks

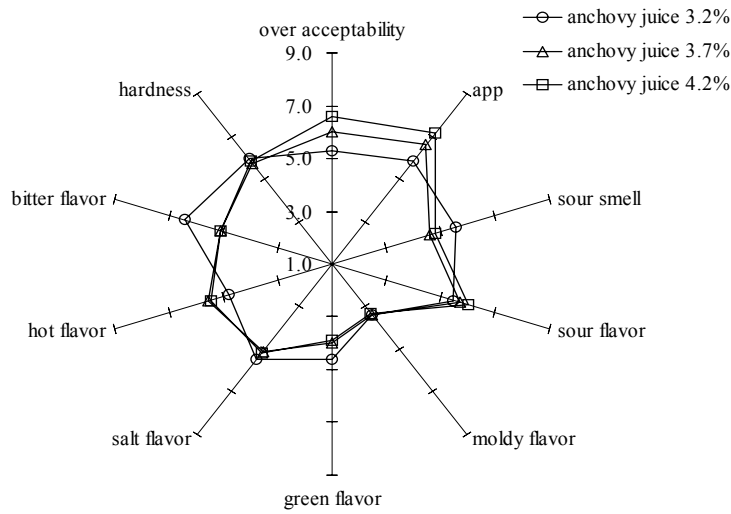


그림 2C. QDA profile of young radish kimchi fermented with different ratio of ingredients (anchovy juice) at 5°C after 3 weeks

#### 4) 부재료 첨가 농도에 따른 유향처리 열무김치의 암예방 효과

##### 가) AGS 인체 위암세포의 성장 저해 효과

부재료 첨가 농도에 따른 유향처리 열무김치의 *in vitro* 암예방 효과를 알아보려고 하였다. 부재료 중 열무김치의 암예방 효과에 영향을 미칠 가능성이 높은 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 첨가 농도에 따른 유향처리 열무김치의 암예방 효과를 알아보았다. 즉, 일반 열무김치의 재료 배합비를 표준값으로 하여 표준편차만큼의 양을 가감하여 유향처리 열무김치를 제조하여 5°C에서 적숙기가 될 때까지 3주간 발효시킨 적숙기의 열무김치 즙액을 이용하여 AGS 인체 위암세포의 성장 저해 효과를 관찰하였다(표 2).

마늘의 첨가 농도를 달리하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l의 농도에서는 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 20  $\mu$ l의 농도에서는 1.6%의 마늘 첨가에서 30%의 암세포 성장 저해율을 나타냈으며, 이보다 높은 농도인 2.9%와 4.2%에서는 각각 40%와 44%의 암세포 성장 저해율을 나타내어 유의적으로 높은 암세포 성장 저해 효과를 나타내었으나, 두 농도 사이에는 유의적인 차이는 없었다. 이는 마늘 첨가가 열무김치의 암예방 기능성을 증진시킨 것으로 사료된다(표 2A). 고춧가루의 첨가 농도를 달리하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l의 농도에서는 3.0%, 4.2%, 5.4%의 고춧가루를 첨가했을 때 9%, 13%, 15%로 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 20  $\mu$ l에서는 3.0%, 4.2%, 5.4%로 고춧가루의 첨가 농도가 증가할수록 암세포 성장 저해율이 49%, 58%, 72%로 유의적으로 증가하였으



며, 이는 고춧가루 첨가가 열무김치의 암예방 기능을 증진시킨 것으로 사료된다(표 2B). 멸치 액젓의 첨가 농도를 달리하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l의 농도에서는 10%내외의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 20  $\mu$ l에서는 3.2%에 비하여 3.7%, 4.2%의 멸치 액젓을 첨가 했을 때 암세포 성장 저해율이 증가하였으며 두 농도 사이에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 멸치 액젓의 첨가가 열무김치의 암예방 기능을 증진시킨 것으로 사료된다(표 2C).

위의 실험을 통하여 마늘과 고춧가루, 멸치액젓의 첨가 농도 차이는 유향처리 열무김치의 암예방 효과에 관계가 있는 것으로 사료된다.

표 2A. Inhibitory effects of young radish kimchi juices with the different ratio of garlic on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu$ l/assay)	
	10	20
Control	0.571±0.009 <sup>a</sup>	
1.6% garlic-added YR kimchi	0.521±0.028 <sup>b</sup> (9)	0.397±0.039 <sup>b</sup> (30)
2.9% garlic-added YR kimchi	0.518±0.024 <sup>b</sup> (9)	0.343±0.043 <sup>c</sup> (40)
4.2% garlic-added YR kimchi	0.514±0.026 <sup>b</sup> (10)	0.322±0.010 <sup>c</sup> (44)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 2B. Inhibitory effects of young radish kimchi juices with the different ratio of red pepper powder (RPP) on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu$ l/assay)	
	10	20
Control	0.554±0.007 <sup>a</sup>	
3.0% RPP-added YR kimchi	0.506±0.004 <sup>b</sup> (9)	0.285±0.006 <sup>b</sup> (49)
4.2% RPP-added YR kimchi	0.481±0.015 <sup>c</sup> (13)	0.235±0.021 <sup>c</sup> (58)
5.4% RPP-added YR kimchi	0.470±0.027 <sup>c</sup> (15)	0.155±0.017 <sup>d</sup> (72)

<sup>a-d</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 2C. Inhibitory effects of young radish kimchi juices with the different ratio of anchovy juice on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.544±0.005 <sup>a</sup>	
3.2% anchovy juice-added YR kimchi	0.499±0.020 <sup>b</sup> (8)	0.455±0.032 <sup>b</sup> (16)
3.7% anchovy juice-added YR kimchi	0.502±0.008 <sup>b</sup> (8)	0.417±0.017 <sup>c</sup> (23)
4.2% anchovy juice-added YR kimchi	0.495±0.021 <sup>b</sup> (9)	0.412±0.019 <sup>c</sup> (24)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

나) HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해 효과

표 3에서는 마늘, 고춧가루, 멸치액젓의 첨가 농도에 따른 유향처리 열무김치의 암예방 효과를 알아보기 위하여 일반 열무김치의 재료 배합비를 표준값으로 하여 표준편차만큼의 양을 가감하여 유향처리 열무김치를 제조하여 5℃에서 3주간 발효시킨 적숙기의 열무김치 즙액을 이용하여 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해 효과를 관찰한 결과를 나타내었다.

마늘의 첨가 농도를 달리하여 HT-29 인체 결장암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 낮은 농도(10  $\mu\ell$ )에서는 1.6%, 2.9%, 4.2%의 마늘 첨가 농도에 따라 암세포 성장 저해율이 각각 9%, 16%, 18%로 유의적으로 증가함을 나타내었으며, 20  $\mu\ell$ 의 농도에서 각각 27%, 33%, 34%의 저해율을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. 이는 마늘 첨가가 열무김치의 암예방 가능성을 증진시킨 것으로 사료된다(표 3A).

고춧가루의 첨가 농도를 달리하여 HT-29 인체 결장암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu\ell$ 의 농도에서는 10%내외의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 20  $\mu\ell$ 에서는 각각 3.0%, 4.2%, 5.4%로 고춧가루의 첨가 농도가 증가할수록 암세포 성장 저해율이 각각 23%, 31%, 43%로 유의적으로 증가하였으며, 이는 고춧가루 첨가가 열무김치의 암예방 가능성을 증진시킨 것으로 사료된다(표 3B).

멸치액젓의 첨가 농도를 달리하여 HT-29 인체 결장암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu\ell$ 의 농도에서는 10%내외의 낮은 암세포 성장 저해율을 나타내었다. 20  $\mu\ell$ 에서는 3.2%와 3.7%에 비하여 4.2%의 멸치 액젓을 첨가 했을 때 암세포 성장 저해율이 증가하였으며 이는 멸치 액젓의 첨가가 열무김치의 암예방 가능성을 증진시킨 것으로 사료된다(표 3C).

위의 실험을 통하여 마늘과 고춧가루, 멸치액젓의 첨가 농도 차이는 유향처리 열무김치의 암예방 효과에 관계가 있는 것으로 사료된다.

㉟ 3A. Inhibitory effects of young radish kimchis juice with the different ratio of garlic on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.537±0.005 <sup>a</sup>	
1.6% garlic-added YR kimchi	0.487±0.020 <sup>b</sup> (9)	0.390±0.058 <sup>b</sup> (27)
2.9% garlic-added YR kimchi	0.449±0.013 <sup>bc</sup> (16)	0.358±0.023 <sup>b</sup> (33)
4.2% garlic-added YR kimchi	0.439±0.044 <sup>c</sup> (18)	0.352±0.015 <sup>b</sup> (34)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

㉟ 3B. Inhibitory effects of young radish kimchis juice with the different ratio of red pepper powder (RPP) on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.534±0.021 <sup>a</sup>	
3.0% RPP-added YR kimchi	0.506±0.004 <sup>b</sup> (8)	0.409±0.006 <sup>b</sup> (23)
4.2% RPP-added YR kimchi	0.474±0.020 <sup>b</sup> (11)	0.369±0.005 <sup>c</sup> (31)
5.4% RPP-added YR kimchi	0.473±0.029 <sup>b</sup> (12)	0.304±0.026 <sup>d</sup> (43)

<sup>a-d</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

㉟ 3C. Inhibitory effects of young radish kimchis juice with the different ratio of anchovy juice on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.545±0.008 <sup>a</sup>	
3.2% anchovy juice-added YR kimchi	0.490±0.010 <sup>b</sup> (10)	0.423±0.011 <sup>b</sup> (22)
3.7% anchovy juice-added YR kimchi	0.474±0.018 <sup>b</sup> (13)	0.417±0.011 <sup>b</sup> (24)
4.2% anchovy juice-added YR kimchi	0.470±0.013 <sup>b</sup> (14)	0.369±0.019 <sup>c</sup> (32)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

나. 기능성 열무로 재배한 열무김치의 색소 및 비타민 C 함량

1) Carotenoids 함량

노랑, 오렌지의 색소인 Carotenoids의 함량을 살펴보면 일반 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치에 비해 유향 처리 토양에서 재배한 열무로 제조한 김치가 약 1.5배정도 많은 것으로 나타났다. 이는 전시험에서 유향을 첨가한 토양에서 재배된 열무가 함유하고 있는 유향함량이 일반 열무에 비해 높았으므로, 일반열무김치에 비하여 유향처리 열무김치의 carotenoids의 함량이 높은 것으로 사료된다.

표 4. The contents of carotenoids and reducing sugar in young radish kimchis

Sample	일반열무김치	유향처리열무김치
Carotenoids ( $\mu\text{g}\%$ )	46.95 $\pm$ 0.58	61.25 $\pm$ 0.22*

\*Significantly different at the  $p < 0.05$  level by Student's t-test

2) Chlorophylls 함량

식물체에 존재하는 chlorophylls은 일반적으로 chlorophyll a, b의 존재비가 3 : 1 정도인데, 열무를 이용하여 제조한 열무김치의 경우는 3:1의 비율보다는 높았으며, 이는 첨가되는 고춧가루와 빨간 고추의 영향을 사료된다. 전체 클로로필 양과, 클로로필 a의 경우에는 일반열무김치보다 유향처리 열무김치의 함량이 낮았으나, 클로로필 b의 경우에는 유의적인 차이가 없었다. 이는 유향처리 열무김치의 주재료가 되는 열무가 유향의 영향으로 클로로필함량보다는 Carotenoids의 함량이 높아지기 때문인 것으로 사료된다.

표 5. Chrolophylls contents of young radish kimchis

Sample	Total chrolophyll	Chrolophyll a	Chrolophyll b
일반열무김치	17.34 $\pm$ 0.22	11.94 $\pm$ 0.89	5.42 $\pm$ 0.78
유향처리 열무김치	15.23 $\pm$ 0.50*	10.57 $\pm$ 0.22*	4.68 $\pm$ 0.66

\*Significantly different at the  $p < 0.05$  level by Student's t-test

3) Vitamin C 함량

Vitamin C 함량을 측정된 값을 표 6에 나타내었다. 일반 열무김치에 비해 유향처리 열무로 제조한 열무김치에서 높은 함량을 나타내었다. 따라서 유향 처리는 열무 중의 Carotenoids의 함량과 비타민 C함량을 높여 줌으로써 열무 및 열무김치의 기능성도 증진시키는 것으로 사료된다.

표 6. Vitamin C contents of young radish kimchis

Sample	일반열무김치	유향처리열무김치
비타민 C @OD <sub>540</sub>	0.117 $\pm$ 0.003	0.323 $\pm$ 0.006*

\*Significantly different at the  $p < 0.05$  level by Student's t-test

다. 유황처리 열무의 품종에 따른 제조연구

1) 품종에 따른 유황처리 열무김치의 제조 연구

선행의 연구에서 결정된 일반 열무로 제조한 표준화 열무김치 (SYRK : Standardized young radish kimchi) 레시피는 절인 열무 100에 대해 마늘 2.9, 생강 1.6, 잔파 8.0, 고춧가루 4.2, 빨간 고추 7.9, 멸치액젓 3.7의 비율이다. 위의 부재료 첨가에 따른 열무김치 연구에서 유황처리 토양에서 재배된 열무의 경우, 일반 토양에서 재배된 열무에 비하여 부재료의 첨가비율이 증가할수록 관능적으로 우수하고 암예방 가능성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 유황처리 토양에서 재배한 품종이 다른 열무(품종 C, 품종 A 및 품종 B)를 이용해 부재료의 배합비를 달리하여 김치를 담근 후 5°C에서 8주간 발효시켰다(표 7).

2) 유황처리 열무 품종에 따른 이화학적 특성

유황처리 토양에서 재배한 열무 품종(품종 C, 품종 A 및 품종 B)에 일반 열무김치 표준화 (SYRK : Standardized young radish kimchi) 양념의 1배, 1.5배, 2배로 김치를 제조하여 5°C에서 8주일 동안 발효시켰을 때의 pH와 산도의 변화를 관찰하였다(그림 3).

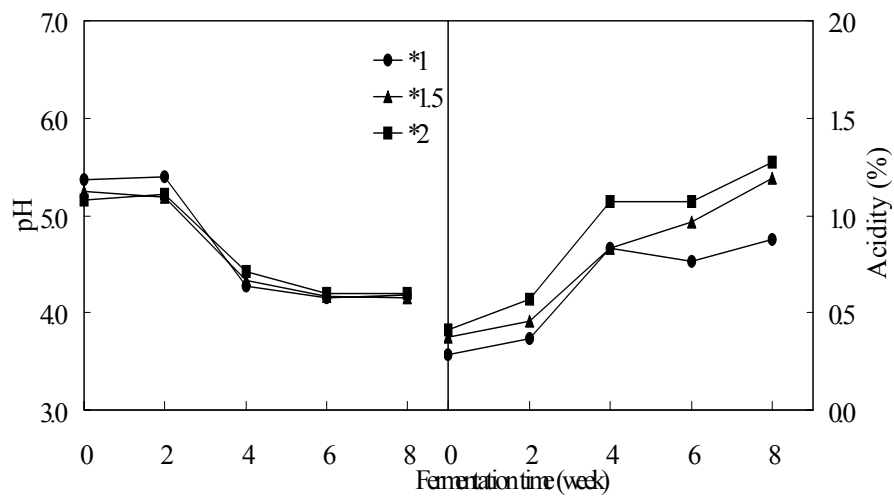
절인 품종 C 열무에 전체 부재료의 비율을 달리하여 김치를 제조하여 5°C에서 8주일 동안 관찰한 결과 담은 직후에는 표준양념보다 첨가 농도가 증가할수록 pH가 낮았으며, 4-5주째에 적숙기인 pH 4.3에 도달했다. 산도는 담근 직후에는 첨가 농도를 표준양념의 1배, 1.5배, 2배하였을 때 0.29, 0.38, 0.41로 증가하는 것으로 나타났으며, 8주째에는 첨가농도에 따라 0.87, 1.19, 1.27로 1배 첨가에 비하여 1.5배, 2배 첨가 하였을 때 차이가 컸다(그림 3A).

품종 A 열무김치는 담은 직후에는 표준양념보다 첨가 농도가 증가할수록 pH가 낮았으며, 4-5주째에 적숙기인 pH 4.3에 도달했으며, 8주째에 4.25, 4.24, 4.23로 첨가 농도에 따른 별다른 차이를 보이지 않았다. 산도는 담근 직후에는 첨가농도에 따라 0.32, 0.37, 0.36으로 나타났으며, 8주째에는 첨가농도에 따라 0.87, 1.17, 1.27로 1배 첨가에 비하여 1.5배, 2배 첨가 하였을 때 차이가 컸다(그림 3B).

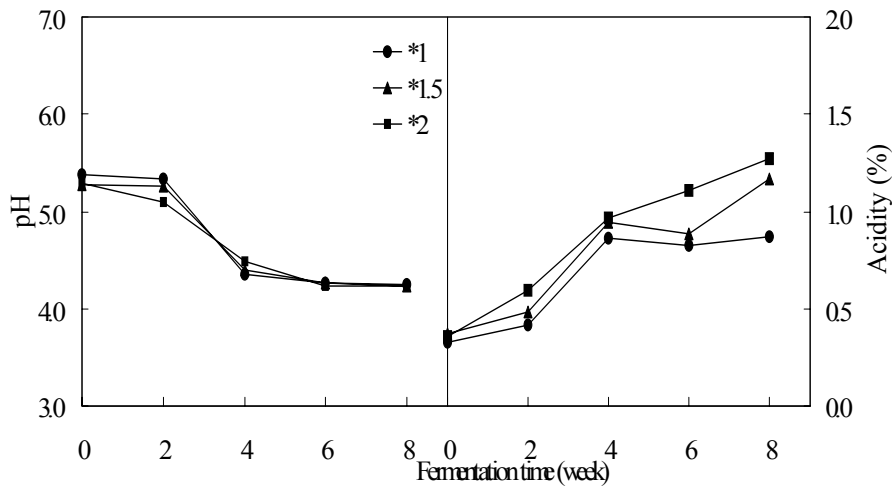
품종 B 열무김치는 담은 직후에는 표준양념보다 첨가 농도가 증가할수록 pH가 낮았으며, 3주째에 발효 속도가 증가했으며 4-5주째에 적숙기인 pH 4.3에 도달했다. 산도는 담근 직후에는 첨가 농도를 표준양념의 1배, 1.5배, 2배하였을 때 0.29, 0.38, 0.47로 나타났으며, 8주째에는 0.94, 1.20, 1.32로 나타나 첨가 농도가 증가할수록 높아지는 것으로 나타났다(그림 3C).

㉞ 7. Ingredient ratios of young radish (YR)

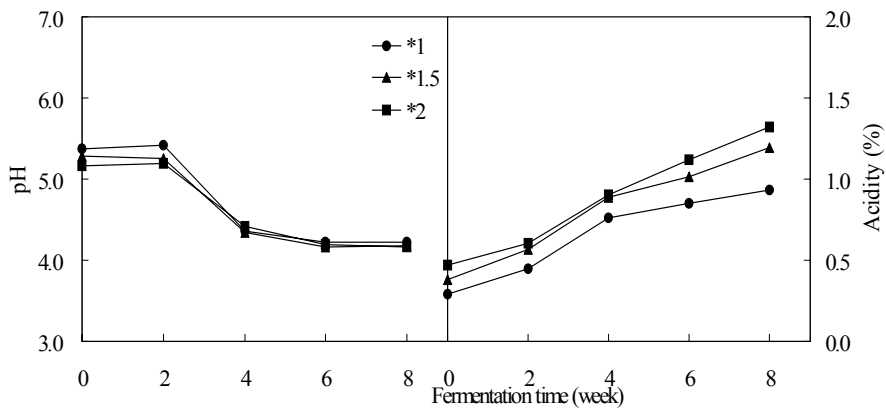
Ingredients	Weight (g)		
	× 1	× 1.5	×2
Young radish	100		
Garlic	2.9	4.4	5.8
Ginger	1.6	2.4	3.2
Green onion	8.0	12.0	16.0
Red pepper	7.0	6.3	14.0
Red pepper powder	4.2	10.5	8.4
Anchovy juice	3.7	5.6	7.4
Final salt concentration (%)	2.5		



A. 품종 C



B. 품종 A



C. 품종 B

그림 3. Changes in pH and acidity of young radish kimchi fermented with different kind of ingredients at 5°C after 8 weeks

3) 유향처리 열무 품종에 따른 관능검사

유향처리 토양에서 재배한 열무 품종(품종 C, 품종 A 및 품종 B)에 일반 열무김치 표준화 (SYRK : Standardized young radish kimchi) 양념의 1배, 1.5배, 2배로 김치를 제조하여 5°C

에서 발효시켜 적숙기에 도달하였을 때, 관능검사 한 결과를 QDA(quantitative descriptive analysis) profile로 나타내었다(그림 4).

품종 C 열무김치는 표준양념의 1배에서 보다는 2배, 3배에서 주관적인 평가(종합평가, 외관)에서 관능적으로 좋았고 객관적 평가항목(신맛, 군덕맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 군덕맛과 쓴맛은 감소하였고, 매운맛은 증가하였으며, 신맛, 군덕맛, 짠맛, 조직감에서는 차이를 보이지 않았다(그림 4A).

품종 A 열무김치는 주관적인 평가(종합적평가, 외관) 중 종합평가에서는 1.5배가 가장 관능적으로 좋았고, 2배, 1배의 순서로 감소하였으며 외관에서는 1배보다 1.5배, 2배에서 관능적으로 좋았다. 객관적 평가항목(신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 신맛과 매운맛은 1배보다 1.5배, 2배에서 증가하고, 군덕맛, 덜익은 맛, 쓴맛은 1배보다 1.5배, 2배에서 감소하였으며, 짠맛과 조직감에서는 차이를 보이지 않았다(그림 4B).

품종 B 열무김치는 주관적인 평가(종합평가, 외관) 중 종합평가에서는 1배에 비해서 1.5배, 2배순으로 증가하였으며, 외관에서는 1.5배, 1배, 2배의 순으로 관능적으로 좋았으며, 객관적 평가항목(신맛, 군덕맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감) 중 덜익은 맛과 쓴맛에서는 1.5배, 2배, 1배의 순서로 감소하였고, 매운맛은 첨가 비율이 증가할수록 높아졌으며, 조직감은 2배에서 낮게 나타났으며, 신맛, 군덕맛, 짠맛에서는 차이를 보이지 않았다(그림 4C).

이 실험의 결과로 품종 C는 절인 유향처리 열무 100에 대하여 전체 부재료의 첨가 비율이 일반열무김치의 표준화 양념을 2배 첨가하여 김치를 제조하였을 때 주관적인 평가(종합적 평가, 외관)와 객관적 평가항목(신내, 신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감)에서 관능적으로 좋았다. 품종 A, 품종 B는 일반열무김치의 표준화 양념의 1.5배와 2배를 첨가하여 김치를 제조하였을 때가 주관적인 평가(종합적평가, 외관)와 객관적 평가항목(신내, 신맛, 덜익은 맛, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 조직감)에서 관능적으로 좋았으며, 두 첨가 농도 사이에서는 별다른 차이가 없었으므로, 유향처리 열무김치의 보편 대중화를 위해서는 일반 열무김치 부재료의 1.5배로 하는 것이 적합하다고 사료된다.



A. 품종 C

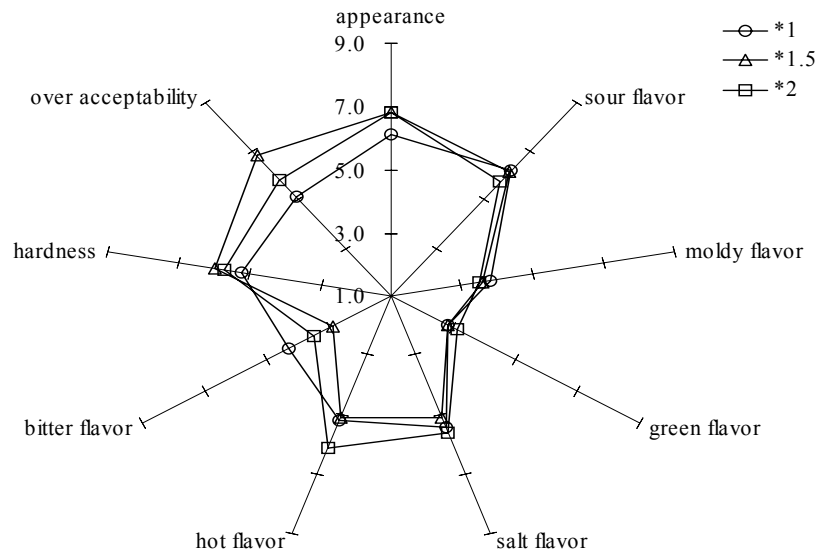


그림 4A. QDA profile<sup>1)</sup> of young radish kimchi fermented with different kind of young radish at 5°C after 3 weeks

<sup>1)</sup> Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely good, 9-extremely bad in subjective evaluations (appearance, over acceptability), and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor, salt flavor, hot flavor, bitter flavor)

B. 품종 A

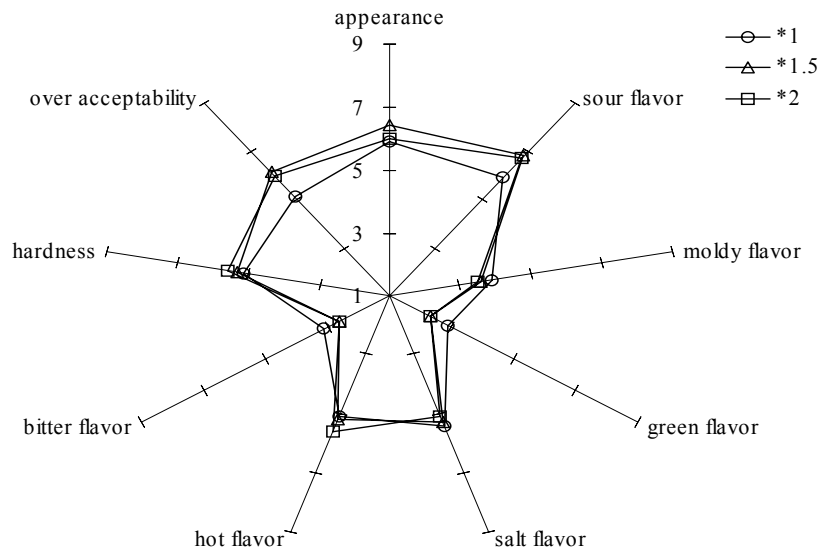


그림 4B. QDA profile of young radish kimchi fermented with different kind of young radish at 5°C after 3 weeks

C. 품종 B

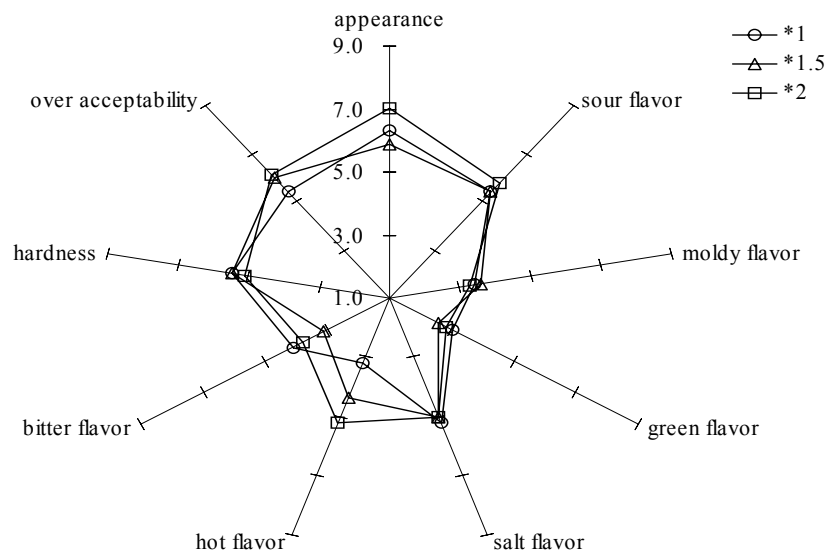


그림 4C. QDA profile of young radish kimchi fermented with different kind of young radish at 5°C after 3 weeks

#### 4) 재료 배합비에 따른 열무김치의 암예방 효과

##### 가) AGS 인체 위암세포의 성장 저해 효과

유황처리 열무의 품종을 달리하여 김치의 부재료 첨가 농도에 달리하여 in vitro 암예방 효과를 알아보려고 하였다. 표 8는 유황처리 토양에서 재배한 열무 품종(품종 C, 품종 A, 품종 B)에 일반 열무김치 표준화(SYRK : Standardized young radish kimchi) 양념의 1배, 1.5배, 2배로 김치를 제조하여 5℃의 발효온도에서 3주간 발효시켜 적숙기에 도달했을 때 열무김치의 즙액을 이용하여 AGS 인체 위암세포의 성장 저해 효과를 관찰한 결과이다.

품종 C 열무김치를 이용하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10 $\mu$ l의 농도에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 9%, 14%, 20%로 낮은 암세포 성장 저해 효과를 나타내었다. 20 $\mu$ l의 농도에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 35%, 48%, 69%로 높은 암세포 성장 저해 효과를 나타냈으며, 첨가 비율에 따라 유의적인 차이를 보였다(표 8A).

품종 A 열무김치를 이용하여 실험을 한 결과 고춧가루의 첨가 농도를 달리하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 13%, 23%, 26%로 낮은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 20  $\mu$ l에서도 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 47%, 70%, 75%로 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다(표 8B).

품종 B 열무김치를 이용하여 실험을 한 결과 10  $\mu$ l에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 7%, 17%, 20%로 낮은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 20  $\mu$ l에서도 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 47%, 66%, 69%로 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다(표 8C).

위의 실험을 통하여 품종 C 열무는 양념의 첨가 비율이 증가할수록 열무김치의 암세포 성장 저해 효과가 증가하는 것이 관찰되었다. 품종 A, 품종 B의 열무는 표준양념의 1.5배와 2배를 첨가하여 제조한 김치가 표준양념으로 제조한 김치에 비하여 암세포 성장 저해 효과가 증가하는 것으로 관찰되었으며, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었으므로, 유황처리 열무김치의 보편 대중화를 위해서는 일반 열무김치 부재료의 1.5배로 하는 것이 적합하다고 사료되며, 이는 앞의 관능검사의 결과와 동일하였다.

표 8A. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 C) on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Methods	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.560±0.004 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.511±0.013 <sup>b</sup> (9)	0.361±0.027 <sup>b</sup> (35)
× 1.5	0.482±0.027 <sup>bc</sup> (14)	0.289±0.024 <sup>c</sup> (48)
× 2	0.449±0.037 <sup>c</sup> (20)	0.173±0.008 <sup>d</sup> (69)

<sup>a-d</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 8B. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 A) on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

Methods	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.560±0.002 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.487±0.035 <sup>b</sup> (13)	0.297±0.046 <sup>b</sup> (47)
× 1.5	0.431±0.041 <sup>c</sup> (23)	0.166±0.049 <sup>c</sup> (70)
× 2	0.414±0.040 <sup>c</sup> (26)	0.142±0.025 <sup>c</sup> (75)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 8C. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 B) on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Methods	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.552±0.005 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.516±0.011 <sup>b</sup> (7)	0.292±0.024 <sup>b</sup> (47)
× 1.5	0.460±0.042 <sup>c</sup> (17)	0.186±0.021 <sup>c</sup> (66)
× 2	0.440±0.019 <sup>c</sup> (20)	0.174±0.025 <sup>c</sup> (69)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(2) HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해 효과

표 9는 유향처리 토양에서 재배한 열무 품종(품종 C, 품종 A, 품종 B)에 일반 열무김치 표준화(SYRK : Standardized young radish kimchi) 양념의 1배, 1.5배, 2배로 김치를 제조하여 5°C의 발효온도에서 3주간 발효시켜 적숙기에 도달했을 때 열무김치의 즙액을 이용하여 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해 효과를 관찰한 결과이다.

품종 C 열무김치를 이용하여 HT-29 인체 결장암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l의 농도에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 13%, 15%, 23%로 낮은 암세포 성장 저해 효과를 나타내었다. 20  $\mu$ l의 농도에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 27%, 29%, 44%의 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다(표 9A).

품종 A 열무김치를 이용하여 실험을 한 결과 고춧가루의 첨가 농도를 달리하여 AGS 인체 위암세포 성장 저해 효과 실험을 한 결과 10  $\mu$ l에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 37%, 46%, 52%의 암세포 성장 저해율을 나타냈으며, 첨가 비율에 따른 유의적인 차이가 있었다. 20  $\mu$ l에서도 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 47%, 70%, 75%의 암세포 성장 저해율로 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다(표 9B).

품종 B 열무김치를 이용하여 실험을 한 결과 10  $\mu$ l에서는 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 35%, 47%, 50%로 낮은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 20  $\mu$ l에서도 표준양념의 1배, 1.5배, 2배에서 각각 56%, 71%, 72%의 암세포 성장 저해율로 1배와 1.5배, 2배 사이에는 유의적인 차이가 있었으나, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다(표 9C).

위의 실험을 통하여 품종 C, 품종 A, 품종 B의 열무 품종에 차이 없이 표준양념의 1.5배와 2배를 첨가하여 제조한 김치가 표준양념으로 제조한 김치에 비하여 암세포 성장 저해 효과가 증가하는 것으로 관찰되었으며, 1.5배와 2배 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 이는 품종 C를 제외하고, AGS 인체 위암세포를 이용하여 암세포 성장 저해 효과를 실험하였을 때와 결과가 동일하였다. 유향처리 열무김치의 보편 대중화를 위해서는 일반 열무김치 부재료의 1.5배로 하는 것이 적합하다고 사료되며, 이는 앞의 관능검사의 결과와 동일하였다.

표 9A. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 C) on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.534±0.003 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.464±0.020 <sup>b</sup> (13)	0.391±0.022 <sup>b</sup> (27)
× 1.5	0.452±0.034 <sup>bc</sup> (15)	0.378±0.022 <sup>c</sup> (29)
× 2	0.411±0.024 <sup>c</sup> (23)	0.301±0.009 <sup>d</sup> (44)

<sup>a-d</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 9B. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 A) on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.526±0.006 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.332±0.035 <sup>b</sup> (37)	0.192±0.019 <sup>b</sup> (63)
× 1.5	0.286±0.020 <sup>c</sup> (46)	0.150±0.012 <sup>c</sup> (72)
× 2	0.253±0.008 <sup>d</sup> (52)	0.150±0.011 <sup>c</sup> (72)

<sup>a-d</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 9C. Inhibitory effects of young radish kimchi juices(품종 B) on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.524±0.006 <sup>a</sup>	
SYRK × 1	0.339±0.013 <sup>b</sup> (35)	0.233±0.012 <sup>b</sup> (56)
× 1.5	0.279±0.008 <sup>c</sup> (47)	0.150±0.025 <sup>c</sup> (71)
× 2	0.263±0.023 <sup>c</sup> (50)	0.145±0.011 <sup>c</sup> (72)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

5) 유향처리 열무김치의 품종에 따른 암예방 효과 비교

유향처리 열무의 품종을 달리하여 김치의 부재료 첨가 농도에 달리하여 *in vitro* 암예방 효과를 알아보려고 하였다. 표s 10과 11에서는 유향처리 토양에서 재배한 열무 품종(품종 C, 품종 A, 품종 B)에 일반 열무김치 표준화 (SYRK: Standardized young radish kimchi) 양념의 1.5배로 김치를 제조하여 5°C의 발효온도에서 3주간 발효시켜 적숙기에 도달했을 때 열무김치즙액을 이용하여 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암세포의 성장 저해 효과를 관찰한 결과를 나타내었다. AGS 인체 위암세포를 이용하여 실험을 한 결과 10  $\mu$ 에서는 품종 C, 품종 A, 품종 B의 차례로 각각 11%, 26%, 24%의 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 품종 C와 품종 A, 품종 B 간에는 유의적 차이가 있었으나, 품종 A과 품종 B 간에는 유의적 차이가 없었다. 20  $\mu$ 에서는 품종 C, 품종 A, 품종 B의 차례로 각각 45%, 64%, 62%의 암세포 성장 저해율을 보여 품종 C에 비하여 품종 A과 품종 B이 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었으며, 품종 C와 품종 A, 품종 B 간에는 유의적 차이가 있었으나, 품종 A과 품종 B 간에는 유의적 차이가 없었다(표 10).

HT-29 인체 결장암세포를 이용하여 실험을 한 결과 10  $\mu$ 에서는 품종 C, 품종 A, 품종 B의 차례로 각각 9%, 13%, 134%의 암세포 성장 저해율을 나타내었으며, 품종 C와 품종 A, 품종 B 간에는 유의적 차이가 있었으나, 품종 A과 품종 B 간에는 유의적 차이가 없었다. 20  $\mu$ 에서는 품종 C, 품종 A, 품종 B의 차례로 각각 45%, 56%, 56%의 암세포 성장 저해율을 나타내어 품종 C에 비하여 품종 A과 품종 B이 높은 암세포 성장 효과를 나타내었으며, 품종 C와 품종 A, 품종 B 간에는 유의적 차이가 있었으나, 품종 A과 품종 B 간에는 유의적 차이가 없었다(표 11).

위의 실험 결과로 품종 C 열무로 제조한 김치에 비하여 품종 A과 품종 B 열무로 제조한 김치가 암예방 효과가 높음이 관찰되었다.

표 10. Inhibitory effects of young radish kimchi juices on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu$ l/assay)	
	10	20
Control	0.586±0.005 <sup>a</sup>	
품종 C	0.524±0.006 <sup>b</sup> (11)	0.321±0.020 <sup>b</sup> (45)
품종 A	0.434±0.022 <sup>c</sup> (26)	0.211±0.026 <sup>c</sup> (64)
품종 B	0.443±0.039 <sup>c</sup> (24)	0.220±0.017 <sup>c</sup> (62)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

표 11. Inhibitory effects of young radish kimchis juice on the growth of HT-29 human colon adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay

Sample	OD <sub>540</sub> (Level of sample, $\mu\ell$ /assay)	
	10	20
Control	0.542±0.008 <sup>a</sup>	
품종 C	0.494±0.030 <sup>b</sup> (9)	0.296±0.015 <sup>b</sup> (45)
품종 A	0.473±0.034 <sup>b</sup> (13)	0.237±0.015 <sup>c</sup> (56)
품종 B	0.471±0.042 <sup>b</sup> (13)	0.239±0.006 <sup>c</sup> (56)

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

라. 유향처리 농도를 달리한 열무김치의 *In vivo* 항암 효과

1) 세포독성 작용 및 고형암 성장 억제 효과

Sarcoma-180 cell에 대한 일반 열무 및 유향 처리 열무로 제조한 열무김치시료의 고형암 성장 억제 효과를 알아보기 위하여, 세포에 대한 열무김치의 독성을 검토하였다. 일반 및 유향처리 열무로 제조한 열무김치추출물은 0-2 mg/ml의 첨가농도까지 종양세포에 대하여 80% 이상의 높은 생존율을 나타내어 이 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나, 이 보다 높은 농도에서는 sarcoma-180 cell에 대한 독성이 급격히 증가하였으므로 세포에 영향을 주지 않는 농도범위 내 (1 mg/ml)에서 고형암 성장 억제 효과를 관찰하였다(표 12). 유향처리에 대한 세포의 생존율은 일반 열무로 제조한 열무김치와 비슷한 생존율을 나타내었다. 일반 열무 및 유향처리 열무로 제조한 열무김치의 메탄올추출물에 의한 고형암 성장 억제 효과를 관찰한 결과는 표 13과 같다. 대조군의 고형암 무게는 7.36 g인데 반해서, 열무김치를 투여한 군에서 고형암의 무게는 각각 6.28 g, 5.89 g, 4.42 g으로 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 일반 열무김치에 비해 유향처리 열무로 제조한 열무김치에서 고형암 무게는 크게 감소하였으며, 토양에 유향처리 후 생육의 저해를 완화하기 위해 복토를 덮어줌으로서 고형암의 성장 억제 효과가 더욱 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 배추김치의 경우 김치추출물이 고형암의 성장을 억제하며 암세포의 암식기능상승에 의한 면역 활성을 증가시킨다고 보고되어 있다. 열무에는 비타민 A, C 및 무기질 이외에도 isothiocyanates와 섬유소를 비롯한 각종 phytochemical이 다량 함유되어 있으며, 이러한 성분들은 항돌연변이성 및 항암성에 관계하고 있는 것으로 보고 된 바 있다. 이러한 활성성분과 발효 산물은 *in vivo*에서도 고형암 성장 억제 효과를 나타내는 것으로 보인다. 특히 유향 처리 열무로 제조한 열무김치에서 그 효과가 높았으며, 복토를 덮어준 시료에서 그 효과는 더욱 증진되었다. 이는 유향처리 토양에서는 일반 토양에 비해 열무의 생리활성성분의 생성이 증진되었으며, 복토는 황토 및 유향에 의한 열무의 생육이 저해되는 것을 완화하여 생리활성 성분의 생성을 더욱 촉진시키는 것으로 사료된다.



㉔ 12. Viability test of sarcoma-180 cells in a culture medium containing methanol extracts from young radish kimchis

Sample	Final conc. (mg/ml)	Total cell number ( $\times 10^4$ )	Viable cell number ( $\times 10^4$ )	Viability of cell (%)
Control		42.4 $\pm$ 3.0*	40.9 $\pm$ 3.0	96
	0.25	33.4 $\pm$ 2.8	28.6 $\pm$ 2.5	86
Control kimchi	0.5	43.0 $\pm$ 2.8	36.2 $\pm$ 3.2	84
	1.0	44.3 $\pm$ 3.3	35.9 $\pm$ 3.2	81
	2.0	32.3 $\pm$ 4.4	25.3 $\pm$ 2.8	78
	0.25	27.2 $\pm$ 2.9	23.7 $\pm$ 2.8	87
kimchi A	0.5	40.7 $\pm$ 4.2	34.6 $\pm$ 3.5	85
	1.0	44.9 $\pm$ 3.5	36.4 $\pm$ 3.9	81
	2.0	39.2 $\pm$ 2.9	31.5 $\pm$ 2.3	80
	0.25	32.5 $\pm$ 2.5	28.2 $\pm$ 2.2	87
kimchi B	0.5	37.4 $\pm$ 3.1	31.7 $\pm$ 2.8	85
	1.0	41.1 $\pm$ 2.5	33.3 $\pm$ 2.6	81
	2.0	35.5 $\pm$ 3.2	28.1 $\pm$ 3.2	79

\* Values are mean  $\pm$  S.D.

㉔ 13. Antitumor activities of methanol extracts from young radish kimchis in tumor bearing Balb/c mice with sarcoma-180 cell after 26 days

Sample	Tumor wt. (g)	Inhibition rate (%)
Sarcoma-180 + PBS	7.36 $\pm$ 0.07 <sup>a*</sup>	-
+ Control kimchi <sup>1</sup>	6.28 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	15
+ kimchi A <sup>2</sup>	5.89 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	20
+ kimchi B <sup>3</sup>	4.42 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	40

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

\* Values are mean  $\pm$  S.D.

<sup>1</sup> Young radish kimchi prepared using young radish commonly cultivated in the soil without sulfur.

<sup>2</sup> Young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil with sulfur content of 1,818 g/m<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil with sulfur content of 1,818 g/m<sup>3</sup> + Soil 2 cm.

## 2) 마우스의 장기무게 변화

유황처리 열무로 제조한 열무김치가 sarcoma-180 cell을 이식한 마우스의 각 장기에 미치는 영향을 살펴본 결과, 체중변화는 sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 대조군에 비해 열무김치를 투여한 군에서 다소 낮은 값을 보였으나 시료들 간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 간과 신장의 중량비 사이에도 큰 차이를 보이지 않았다. 면역계에 관계하는 비장의 중량비는 정상군의 0.40에 비해 sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 대조군에서는 2.12로 비장의 중량비는 크게 증가하였다. 대조군에 비해 열무김치 시료를 투여한 군에서는 비장의 무게가 줄어들었는데, 특히 유황처리 열무로 제조한 열무김치 투여군에서 크게 감소하였다. 전체적으로 고형암의 무게가 클수록 비장의 무게가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 비장에 존재하는 splenic macrophage등 면역계에 관련된 세포에 의해 고형암의 무게가 클수록 독성을 줄이기 위한 면역계의 활성이 증가되었기 때문인 것으로 사료된다. 대사과정 중에 생기는 여러 유해한 물질의 해독작용을 담당하는 간의 중량비는 정상군에 비해 sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 대조군에서 증가하였으나, 열무김치 시료들 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 신장의 중량비도 큰 차이를 보이지 않았다.

## 3) 간에서 GST활성 및 GSH 함량의 변화

Glutathione S-transferase (GST)활성을 관찰한 결과는 그림 5와 같다. Sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 군의 GST활성은 262 nmol/mg-protein/min으로 정상군에 비해 감소하였으나, 일반 열무김치를 투여한 군에서는 339 nmol/mg protein/min으로 GST활성이 증가하여 정상군과 비슷한 정도의 활성을 나타내었다. 유황처리 열무로 제조한 열무김치를 투여한 군에서는 GST활성은 더욱 증가하였으며, 유황처리 후 복토를 덮은 토양에서 재배한 열무로 제조한 열무김치 B는 열무김치 A보다 다소 높은 활성을 나타내었으나 두 시료간의 유의적 차이는 없었다. Glutathione 함량을 관찰한 결과(그림 6)에서는 정상군의 glutathione 함량은 0.291 umol/g인데 반해서 sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 군에서는 0.258 umol/g로 크게 감소하였다. 열무김치를 투여한 군에서는 sarcoma-180 cell+PBS만을 주사한 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 유황처리 열무로 제조한 열무김치를 투여한 군에서 glutathione 함량은 각각 0.409, 0.417 umol/g으로 일반 열무김치를 투여한 군의 0.381 umol/g에 비해 증가하였다.

간에서 일어나는 대사 효소계의 phase II 단계는 내인성 물질이나 독성물질을 포함하거나 수용성 물질로 전환시켜 체외로 배출시키는 작용을 하는데 GST는 reduced glutathione을 이용하여 체내 독성 물질과 과산화물질을 전이 및 배설함으로서 무독화에 관여하는 효소이다. Glutathione은 세포를 유해산소로부터 방어하는 물질로 sulfhydryl radical을 가지고 있으며 친전자성 물질들과 활성산소 및 과산화지질의 대사 작용에 관여하여 여러 활성증가물질과 conjugation을 이루어 glutathione S-transferase의 작용에 의해 urine으로 배설하도록 함으로서 체내의 독성물질들을 제거하는 작용을 하였다. 따라서 발암 상태에서 열무김치는 친전자성 발암물질의 활성대사산물의 자연적인 해독에 관여하는 GST활성 및 GSH함량을 증가시켜 독성물질을 체외로 배설시킴으로서 고형암의 무게가 대조군에 비해 줄여주는 역할을 하는 것으로 사료

된다. 특히 유황처리 열무로 제조한 열무김치는 GST활성을 더욱 증진시켰다. 이는 일반 열무에 비해 유황처리 열무에 다량 함유된 sulforaphane 유사체의 유황화합물에 의한 것으로 열무 중의 sulforaphane 유사체의 농도 증가는 열무김치로 제조하여도 항암활성을 그대로 유지하는 것으로 사료된다. 열무의 생리활성 성분 중 isothiocyanate 계열의 유황화합물은 chemoprevention 및 발암 억제에 관여하는 것으로 알려져 있어 열무재배 토양에 유황을 처리함으로써 열무 자체에 이들 유황화합물의 증가를 기대할 수 있다.

실제로 김 등의 연구에서는 유황처리 열무에서 sulforaphane과 유사한 분획 물질이 증가하는 것을 확인하였다. Sulforaphane은 십자화과 식물에서 주로 검출되는 isothiocyanate 계열의 유황화합물의 일종으로 간에서 중요한 phase II 효소들 (GST)의 활성을 유도하여 해독작용을 상승시키는 반면, 발암전구체를 발암원으로 활성화시키는데 관여하는 일부 phase I 효소는 유도하지 않는 것으로 알려져 있다. 이외에도 sulforaphane의 종양생성 저지 및 항암활성은 여러 실험계에서 확인된 바 있다. 그러므로 열무를 유황처리 토양에서 재배함으로써 열무자체에 유황화합물과 같은 항암활성성분의 생성이 증진되어 이러한 생리활성 성분을 보유한 열무로 제조한 열무김치의 항암기능성까지 증진시키는 것으로 사료된다.

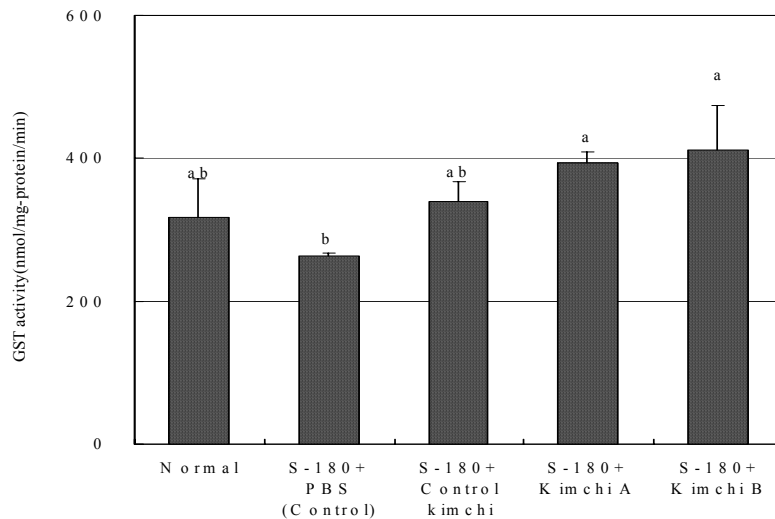


그림 5. Effects of methanol extracts from young radish kimchis on glutathione S-transferase activity in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice

<sup>a-b</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

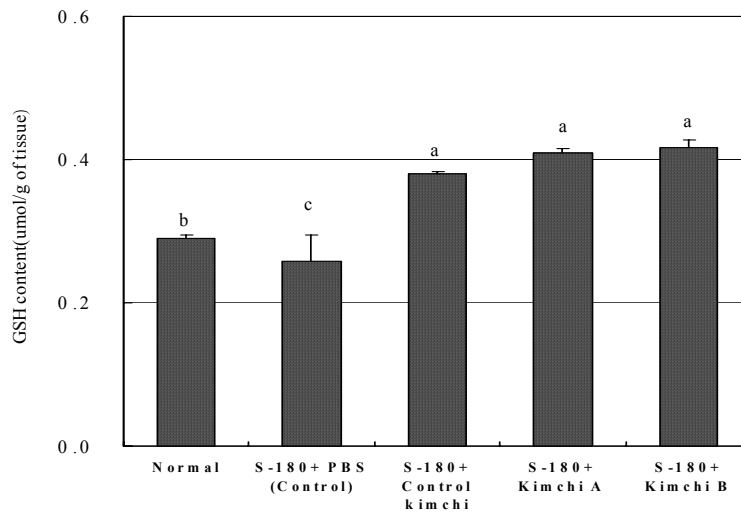


그림 6. Effects of methanol extracts from young radish kimchis on hepatic glutathione content in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice

<sup>a-c</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

#### 마. 유향처리 농도를 달리한 열무김치의 *In vitro* 항암 효과 및 apoptosis

##### 1) 암세포 증식 억제 효과

일반 열무김치와 유향처리 열무김치가 인체 위암 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 AGS 세포주를 대상으로 시간과 농도 의존적으로 hemacytometer count를 실시한 결과는 그림 7과 같다. 이를 위하여 안정화된 AGS 세포를 일반 열무김치와 유향처리 열무김치 추출물이 함유된 배지에서 48시간 배양하였다(그림 7). 열무김치의 첨가 농도가 높을수록, 일반 열무김치보다는 유향처리 열무김치의 경우가 암세포 증식률 및 생존률이 낮은 것을 알 수 있었다. 이는 이전의 MTT 실험과 비슷한 경향을 보인다. 열무김치에는 암세포 성장을 억제하는 많은 성분들이 함유되어 있는데, 열무에 함유되어 있는 sulforaphane은 HT-29 인체 결장암 세포에서 p53과 bax의 발현을 증가시켜 apoptosis를 유발시켜 암세포 성장을 저해시켰다는 보고가 있으며, 무에서 유래하는 isothiocyanates는 높은 항암 기능성을 가지는 것으로 보고 되어 있다. 그리고 마늘에서 유래한 allyl sulfide 화합물들도 매우 높은 세포 증식 억제 효과를 나타낸다. 고춧가루에서 유래하는 capsaicin도 암세포주 등에서 세포 성장을 억제하였다는 보고도 있다. 이러한듯 열무김치는 열무뿐만 아니라 마늘, 고춧가루 등의 여러 화합물들이 함유되어 있으므로 암세포의 성장을 저해하는 것으로 사료되며, 유향처리를 한 토양에서 재배된 열무의 경우 열무 자체에 들어 있는 sulforaphane의 함유량이 증가하여 암세포의 성장을 저해하는 효과가 증가하는 것으로 사료된다.

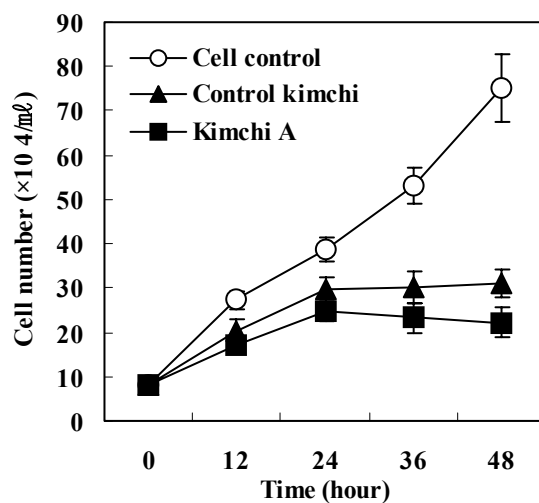


그림 7. Time-dependent growth inhibition by young radish kimchis treatment in AGS human gastric adenocarcinoma cells

\* Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/60mm plate, incubated for 24h and treated with (A)1.5mg/ml (B)3mg/ml of young radish kimchis for 48h. The cells were trypsinized, wash with PBS and the viable cells were scored by hemocytometer counts. Each point represents the mean  $\pm$ SD of three independent experiments.

## 2) Apoptosis 유도 효과

일반 열무김치와 유황 처리 열무김치의 암세포 증식 억제는 apoptosis 유발의 결과로 추측되므로 열무김치 추출물에 의한 apoptosis 가능성을 조사하였다. Apoptosis는 세포막과 소기관의 변화와 함께 빠른 세포 축소가 일어나 세포막에 크고 작은 돌기가 많이 생긴 후 불규칙하게 쭈그러들면서 많은 apoptotic body가 생성된다. 이를 위하여 먼저 DAPI staining을 통한 암세포 핵의 형태적 특징을 관찰하였다(그림 8). 정상 배지에서 자란 AGS 위암세포는 모두 정상적인 핵의 형태를 띠고 있었으나, 열무김치 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포의 핵은 전형적인 apoptosis가 유발되었을 경우 관찰되는 apoptotic body의 출현을 관찰할 수 있었다. 특히 유황 처리 열무김치 추출물을 처리한 군에서 apoptotic body의 출현을 확실히 관찰할 수 있었다.

따라서 일반 열무김치에 비해서 유황처리 열무로 제조한 열무김치가 AGS 위암세포의 성장을 억제하였으며, 이는 apoptosis 유발에 의한 것으로 사료된다(그림 7).

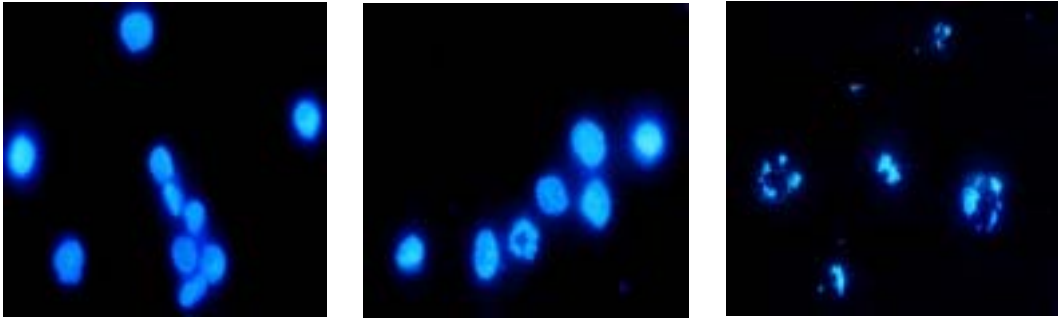


그림 8. Induction of apoptosis by young radish kimchi treatment in AGS human gastric adenocarcinoma cells

\* Cells were incubated with young radish kimchis for 48h and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification,  $\times 400$

### 3) Bcl-2 family의 발현에 미치는 영향

Apoptosis 과정에는 세포의 인자들이 signal로서 전달되어 관련유전자들의 발현과 조절에 관여하는 것도 알려지고 있다. 많은 단백질이 apoptosis 기전에 관련되어 있으며, 특히 Bcl-2, Bax등의 유전자에 의해 발현된 단백질은 서로 상호 작용하여 apoptosis를 유도하는 자극에 대한 세포의 민감 정도를 조절 한다. Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제 하고, Bax는 pro-apoptosis 분자로서 apoptosis 유발과 관련이 있다. 이들 유전자는 mitochondria로 부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제유전자인 p53, caspase, DNA 단편 화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다. Bcl-2와 Bax는 서로 dimer를 이루며, 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 apoptosis를 촉진시키고, Bcl-2가 주종이면 apoptosis가 억제된다. 즉 Bax와 Bcl-2는 서로 heterodimer를 이룸으로써 미세한 발현의 차이로 이 현상을 조절한다.

김치에 의한 apoptosis가 이들 유전자의 발현 조절과 연관이 있는지를 조사한 결과, 그림 9에서 나타난 바와 같이 AGS 위암 세포에서 Bax의 발현이 일반 열무김치에서 보다 유흥처리 열무김치에서 상대적으로 증가한 반면 Bcl-2 유전자의 발현은 감소하였음을 알 수 있었다. 이것으로 보아 유흥처리 열무김치 추출물은 이들 유전자의 발현을 조절하여 apoptosis를 조절하여 암세포 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

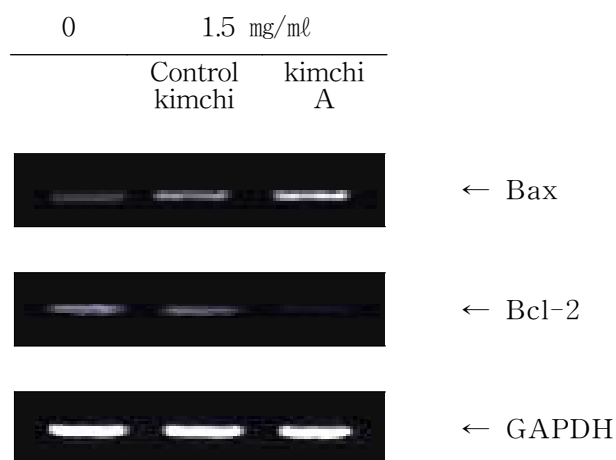


그림 9. Induction of Bax and inhibition of Bcl-2 by young radish kimchis treatment in AGS human gastric adenocarcinoma cells

\* Cells were incubated with young radish kimchis for 48h and total RNA was isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 기능성 열무 생산기술 연구

열무재배시 여러 가지 유용한 기능성을 높일 수 있는 최적 토양조성과 재배방법을 구명하였고, 재배시기나 품종에 따른 생육양상과 영양·기능성과 기호성을 조사하여 생산농가에게는 안정적 재배방법과 경제적인 가치를 제공하고, 소비자에게는 각종 홍보를 통하여 다양한 정보를 제공할 수 있었음.

재배방법, 추출 및 가공제품을 개발하는 일련의 연구를 통해 열무를 단순한 야채에서 고기능성 건강식품으로의 소비확대와, 김치의 새로운 수출시장 개척을 위한 과학적 접근을 시도했음은 대단히 의미가 있었고, 관련연구분야의 기술적 향상이 기대됨

### 제2절 유용물질 탐색 및 추출

재배기술 연구를 통해 생산된 열무의 유용물질을 탐색 추출하고 기능성을 확인.

- 토양에 유향을 처리하여 재배시 quinone reductase inducing activity의 활성이 일반토양 재배에 비해 1.5배 증가함을 확인
- 유향처리열무의 재배시기, 품종, 생육조건에 따른 quinone reductase inducing activity의 활성 변화 확인
- 유향처리열무추출액에는 brocolli에서 발견된 것과 유사한 sulforaphane analogue가 존재하고 이물질은 Hepa 1c1c cell에서 quinone reductase임을 확인
- 마우스에 장기 투여시 간에서 phase II enzyme 의 profile의 변화추정 : glutathione-S-transferase (GST), quinone reductase(QR)는 유향열무추출액 투여 시 현저한 증가를 보이는 것 확인
- B16F10 melanoma cell로 유도한 mouse pulmonary metastasis model 확립 : 유향처리열무추출액 투여는 pulmonary metastasis를 완전 치료할 수는 없지만 상당량 저해시켜 주었음.
- CT-26에 의한 murine colon cancer model 확립 : 유향열무추출액 투여는 암세포의 크기를 상당량 저해시켜주었음.
- 파골세포분화효과측정 system 확립 : 유향열무의 추출액의 성분인 sulforaphane에 의한 파골세포분화억제 확인



### 제 3 절 기능성 열무를 이용한 김치제조 기술개발 및 상품화 연구

기능성 열무를 이용한 김치제조의 표준화를 확립하고, 그 김치에 대한 *In vitro* 및 *In vivo*를 통한 기능성을 연구하여 상품화를 위한 자료를 구축함.

- 유향처리열무김치제조 표준화 확립 : 각종 문헌과 연구를 통해 표준화한 일반 열무김치 부재료의 1.5배로 제조시 항암기능과 맛이 향상되었음.
- 유향처리열무김치의 최적 발효특성 구명 : 발효 2-3주일째 pH4.3, 산도 1.04-1.27% 및 *Leuconostoc* sp. 수 최대. 물김치는 9일째 pH4.3, 산도 0.20%
- 유향처리 열무김치 및 열무물김치에서 MTT assay를 이용한 AGS 인체 위암세포 및 HT-29 인체 결장암의 성장 저해효과 확인
- 유향처리열무김치의 DAPI staining을 통한 apoptosis를 유도확인 : 활성항암물질의 생성으로 Bax는 증가 Bcl-2는 감소
- 고형암 억제기능 확인 : 유향처리김치는 일반김치에 비해높은 high glutathione S-transferase (GST) 활성과 glutathione 함량을 보임

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

확보된 기능성열무재배기술은 단기적으로는 개별 농가단위로 재배를 추진하여 재배 농가 모델을 개발하고, 장기적으로 친환경 기능성 김치소재 단지를 조성하며 김치 수출업체의 육성을 추진하여 세계적 브랜드로 육성코자 함

본 연구에서 얻어진 생산 또는 기능성관련 기술자료들을 소비자들에게 적극적으로 홍보 하여 소비확대에 따른 생산농가의 안정적인 소득증대에 기여하고자 함

기능성 열무를 이용한 표준화된 김치제조법은 특허로써 보호받도록 산업재산권(특허)을 출원한 후, 필요한 가공농가나 기업체에 보급하여 산업화를 지원하고 미 FDA 승인 신청을 하여 미국 수출길을 개척코자 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### ○ 김치의 기능성 확인을 위한 치오리독신 키트 이용기술연구

1. 기존성적 : 인체에 있어서 김치소재가 활성산소의 발생을 억제한다는 보고가 있음 (나고야대)
2. 인체내 항산화 물질의 중요성 : 인체 내 여분의 활성산소는 암, 심근경색, 당뇨병, 허혈증, 자기면역 질환 등의 원인이 되므로 이를 제어 할 수 있는 항산화 물질의 섭취가 필요함.
3. 측정 방법: 식물체 분석, 동물 실험, 인체 실험 등의 방법이 있으나 최근 생명공학기술의 발달로 인해 인체 실험용 키트가 개발되고 있으며 그중 김치와 관련된 치오리독신이 세계에서 처음으로 개발되었음.
4. 치오리독신 : 인체 내 산화 스트레스에 대한 방어 단백질로서 쥐의 실험에서 인위적 증가로 생명 연장 효과가 인정됨.
5. 기대 효과 : 사람의 경우 김치를 먹은 후 치오리독신치가 증가 된다는 사실을 입증하게 되면 우리 김치의 세계적 브랜드화를 가속화 할 수 있으며 수출에 크게 기여 할 수 있을 것으로 사료됨.

### ○ 치오리독신이란 ?

치오리독신은 대장균 DNA합성에 필수적인 효소인 리오투클레오티드 환원효소에 이온을 공급하는 보조소로서 발견되었다. 사람의 치오리독신에 관해서는 성인T세포 백혈병 유래인자로서1989 淀井에 의해서 복제 되었다.

치오리독신은 대장균으로부터 포유류까지 잘 보존된 활성부위를 갖고 이 활성 부위의 2개의 시스테인기의 사이에 S-S결합을 만드는 산화형과 SH-SH를 만드는 환원형이 있다. 치오리독신은 자외선, 방사선, 산화제, 바이러스감염, 허혈재관류상해 및 항암제 투여 등에 따라 유도되는 것이 분명해지고 있다.

그 유도된 치오리독신의 역할로서 치오리독신 단독으로 슈퍼옥사이드나 하이드록실라디칼을 제거한다. 그리고 퍼옥시레독신과의 협조 작용으로 ROS를 소거하는 항산화 물질로서 생 체내에서 활동하는 것이 보고되고 각종의 유전자 발현을 조절하는 轉寫인자나 세포내의 시그날 전달분자의 활성을 억제하고 있다.

한 사람의 혈액 중에 있는 치오리독신 농도는 각 종의 스트레스에 의해 상승할 것이므로 혈액중의 치오리독신 치를 측정하는 것으로서 우리들의 스트레스를 모니터 하는 것이 가능할 것으로 생각된다. 체내의 치오리독신 함량을 증가 시킨 쥐는 여러 스트레스에 저항성을 나타내고 장생하는 것에서 체내 치오리독신 양을 높일 수 있을까. 예를 들면 치오리독신을 마신다든지 주사를 하든지하여 체내의 치오리독신 농도를 높이는 것에 의해서 스트레스에 대응하는 저항성을 높이는 것이 기대되고 있다.

## 제 7 장   참고문헌

- Aruoma, O.I. and Halliwell, B. 1987. *Biochem. J.* 241 : 273-278.
- Chang LC, Gerhauser C, song L, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 1997. Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinine reductase. *J Natl Prod* 60 : 869-873.
- Cho EJ, Park KY, Rhee SH. 1997. Standardization of ingredient ratio of Chinese cabbage kimchi (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 29 : 1228-1235.
- Cho EJ, Lee SM, Rhee SH, Park KY. 1998. Studies on the standardization of Chinese cabbage kimchi (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 30 : 324-332.
- Cho EJ, Rhee SH, Park KY. 1998. Standardization of kinds of ingredient in Chinese cabbage kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30 : 1456-1463.
- Cho HJ. 2002. *Cookbook for Korean children.* Dongailbo Publishing Co.
- Chung FL, Kelloff G, Steele V, Pittman B, Zang E, Jiao D, Rigorty J, Choi CI, Rivensen A. 1996. Chemopreventive efficacy of arylalkyl isothiocyanates and N-acetylcysteine for lung tumorigenesis in Fischer rats. *Cancer Res* 51 : 772-778.
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 11908-11913.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 10367-10372.
- Fahey JW, Haristroy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Iozziewski A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzopyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci, USA* 99 : 7610-7615.
- Hecht S. 2000. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *Drug Metab. Rev.* 32 : 395-411
- Hudson, T.S., Carlton, P.S., Gupta, A, Stoner, G, and Morse, MA. 2001. *Cancer Lett.* 162 : 19-26
- 김일훈. 1989. 신약. 광제원 : p80-81
- Kong CS, Kim DK, Rhee SK, Rho CW, Hwang HJ, Choi KR, Park KY. 2005. Standardization of manufacturing method of leaf radish kimchi and leaf radish watery plain kimchi (in Korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 34-1 : 126-130

- Kim HR, Park JE, Jang MS. 2002. Effect of perilla seed paste on the Yeol Mu mul-kimchi during fermentation (in Korean). *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 18 : 290-299.
- Kim KA, Rho CW, Choi KR, Hwang HJ, Choi HS. 2004. Quinone reductase Inducer from radish leaf cultivated in the soil containing sulfur. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 33-6 : 946-950
- Kim YJ. 1998. Effect of the metallic ions on the variation of ascorbic acid content during Yeol Mu mul-kimchi fermentation. MS. Thesis, Sungshin Women's Univ., Seoul, Korea.
- Kim YJ, Oh JY, Lee TY, Hahn YS. 1998. Effect of the water quality on the variation of ascorbic acid content during Yeol Mu mul-kimchi fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* 30 : 175-183.
- Laky B, Knasmüller S, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Verkerk R, Freywald C, Uhl M, Kassie F. 2002. Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol* 40 : 1077-1083.
- 이선미 등 .1996. 식품산업과 영양, 불포화지방산의 생리적 기능과 건강심포지움. 1(2) : 49-79
- Park, I.S., Kang, E. M., and Kim, N. 2000. *J. Chromatogr. Sci.* 38 : 229-233.
- Rosenthal, L. 1987. *methods. Enzymol.* 152 : 704-720.
- Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R. 2000. 7-methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 21 : 1983-1988.
- Sasaki T, Kudoh K, Uda Y, Ozawa Y, Shimizu J, Kanke Y, Takita T. 1999. Effects of isothiocyanate on growth and metastaticity of B16-F10 melanoma cells. *Nutr Cancer* 33 : 76-81.
- Sticha KR, Starez ME, Wang M, Liang H, Kenny PM, Hecht SS. 2000. Effects of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation in the A/J mouse. *Carcinogenesis* 21 : 1711-1719.
- Stoner, G.D., Morrissey, D.T., Heur, Y.H., Daniel, E.M., Galati, A.J., and Wagner, S.W., 1991. *Cancer Res.* 51 : 2063-2068
- Tan YA, Chong CL, Low KS. 1997. Crude palm oil characteristics and chlorophyll content. *J. the Science Food and Agriculture* 75 : 281-288.
- Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M, Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I and Ozaki, M. 1990. *Chem Pharm. Bull.* 38 : 1049-1052.
- Wallig MA, Kingston S, Staack R, Jeffery EH. 1998. Induction of rat pancreatic glutathione S-transferase and quinone reductase activities by a mixture of glucosinolate breakdown derivatives found in Brussels sprouts. *Food Chem Toxicol* 36 : 365-373.
- Woongjin editorial department. 2003. *Cooking handbook for newlyweds.* Woongjin Publishing Co.

- Xu K, Thornalley PJ. 2000. Studies on the metabolism of the inhibition of human leukemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 60 : 221-231.
- Yano, T., Yajima, S., Virgona, N., Yano, Y., Otani, S., Kumagai, H., Sakurai, H., Kishimoto, M., and Ichikawa, T. 2000. *Cancer Lett.* 155 : 115-120
- Yu, R., Lei, W., Mandelkar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wu, J., and Kong, A.N.T. 1999. *J. Biol. Chem.* 274 : 27545-27552.
- Zhang J, Svehlikova V, Bao Y, Howie AF, Beckett GJ, Williamson G. 2003. Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase I requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis* 24 : 497-503.
- Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C.G., Posner, G. H., and Talalay, P. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 3147-3150
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 2399-2430.
- Zhang, Y., Wade, K.L., Prester, T. and Talalay, P. 1996. *Anal. Biochem.* 239, 160-167.
- Zhang, Ying-Xin et al. 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* 415 : 644-646

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.