

최 종
연구보고서

항암 및 항노화 기능성 김치무리의
개발에 관한 연구

Studies on the Development of Anticancer
and Antiaging Functional Kimchi

연구기관
부 산 대 학 교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “향암 및 향노화 기능성 김치무리의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 12 월 20 일

주 관 연 구 기 관 명 : 부산대학교

총 괄 연 구 책 임 자 : 박 건 영

제 1 세 부 연 구 책 임 자 : 박 건 영

연 구 원 : 이 숙 희

연 구 원 : 김 소 희

연 구 원 : 김 광 혁

연 구 원 : 서 명 자

연 구 조 원 : 정근옥외 6명

제 2 세 부 연 구 책 임 자 : 최 홍 식

연 구 원 : 전 영 수

연 구 원 : 송 영 욱

연 구 원 : 송 영 선

연 구 원 : 문 갑 순

연 구 원 : 한 지 숙

연 구 조 원 : 류복미외 6명

요 약 문

I. 제 목

항암 및 항노화 기능성 김치무리의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라의 항암 및 항노화 기능성 김치 무리의 개발에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구의 목적은 김치의 과학화, 안전성 연구 등의 기초연구를 바탕으로 김치의 항암 및 항노화의 기능성을 연구, 개선하여 이런 기능성 김치를 개발하는데 목표가 있다.

제 1세부는 암예방(항암) 기능을 가지는 김치를 개발함에 목적이 있다. 김치는 통상적으로 짜고 매운 음식이기에 위암의 원인물질이 아니었나 생각되어 왔는데, 이러한 문제를 과학적으로 접근하여 문제점을 해결하는 것은 매우 중요하다. 암과의 관계의 짜고(소금) 매운성분(고춧가루)과 암발생 또는 김치의 다른 성분으로 부터의 암예방과의 관계를 김치 재료와 발효 과정을 통해 과학적으로 밝히고 또 개선하여 선조들이 우리에게 물려준 김치를 암과 관련하여 그 안전성과 암예방 기능성을 연구한다.

김치는 암예방/항암효과가 있는 녹황색 채소가 주원료이기에 김치의 재료와 발효를 통해 양면성을 연구하여 항암 기능성을 증진시킨 김치를 만들어 김치를 세계화 하는데 목적이 있다. 즉, 김치내의 고춧가루와 특히 소금에 대한 연구를 하므로 본래의 녹황색 채소의 항암 기능성을 증진시킨 김치를 제조한다. 구체적으로 1세세부에서는 암예방 김치를 개발하고 제 2 세세부에는 암환자도 먹을 수 있는 항암 김치를 개발한다. 제 3세세부에서는 소금과 관련하여 소금과 암관계를 연구하여 암을 예방할 수 있는 소금과 이를 첨가한 항암 기능을 증진시킨 김치를 제조하고 김치 재료 중 첫걸의 안전성도 연구한다.

김치의 과학화와 기능성에 대한 연구는 매우 중요하다. 실제 김치와 건강에 관련된 연구는 거의 없었다. 오히려 김치는 짜고 매운 음식이기에 위암, 고혈압, 중풍 등의 원인이 아니었나 일반인은 생각하고 있었으며 이와 관련한 우리의 것(김치)에 대한 연구는 실제로 많이 되지 못한 상태였다. 오히려 일본은 김치에 대한 많은 관심으로 상품화, 세계화, 국제 규격화 등에 관심을 두어 우리나라는 김치 중주국으로의 자리가 위험하기도 하였다. 이에 김치와 건강에 대한 연구의 필요가 있었고 특히나 이런 조상으로부터 전수 되어온 식문화 김치를 계승 발전시키는 것도 매우 중요하다 하겠다. 즉, 조상들이 만들어 왔던 이 김치의 과학과 그 원리와 건강과의 기능성을 밝히

는 것이 중요하며 이를 이용해서 현대 과학적인 방법으로 접근하여 개선 발전시켜 김치를 이제 집에서만 담지 않고 산업화하여 대량생산하고 세계에 수출하므로 농산물 수급 안정에도 중요하게 기여하리라 본다.

제 2 세부에서는 김치와 김치의 재료가 가지는 항노화성을 연구하고, 항노화 기능을 가지는 김치 무리를 개발함에 그 목적이 있다. 즉, 김치는 녹색 채소류가 주를 이루는 재료이므로 항노화성 기능이 매우 우수한 것으로 예측될 수 있으나, 김치의 항산화성, 동맥경화 예방성 및 미용증진 효과나 그 기작에 대한 연구 및 이러한 기능을 지닌 김치의 개발은 시도되지 않았다. 이에 김치의 항노화 기능을 밝히고 항산화성이 높은 부재료를 첨가하여 기능이 증진된 항노화 기능성 김치를 개발할 필요가 있다. 김치의 기능성 증진은 김치를 좋아하고 상식으로 하는 우리 국민의 건강을 보장하기 위해서도 매우 중요할 뿐만 아니라 국가적으로도 우리의 우수한 전통 식품이 과학화되고 기능이 향상됨으로서 세계적으로 각광받는 식품으로 개선되어 그의 요구도와 수출 증대가 이루어 질 수 있다.

김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되어, 제 2 세부의 1 세세부에서는 김치의 항산화성 물질을 분리조사하고 활성물질을 찾은 후 이 물질의 생성경로를 추적하여 항산화성 김치를 개발한다. 이때 김치의 항산화성을 증진시킬 수 있는 부재료를 첨가하여 기능성 강화 김치를 제조한다. 제 2 세세부에서는 김치에 풍부하게 함유되어 있는 항산화 물질들이 활성산소를 소거하고 피부의 노화를 억제해 줄 것으로 기대되며, 특히 일본에서는 김치가 피부 미용에 좋다고 하여 젊은 여성들 사이에 인기라고 하나 그에 관한 연구는 전무한 상태이다. 이에 김치의 미용효과를 증진시킬 수 있는 항산화 비타민 및 기타 활성 물질의 활성 기전을 규명하고 건강한 피부를 유지할 수 있는 미용성 증진 기능성 김치를 개발한다. 제 3 세세부에서는 한국인은 심혈관계질환의 발병율이 서구인에 비해 낮은 편이고, 이는 한국인의 항산화성 식이, 특히 한국인이 항상 김치를 섭취하고 있기 때문이라는 사실에 기초하여 동맥경화를 예방할 수 있는 기능성 배추김치를 개발하고자 한다. 즉, 김치의 항동맥경화 예방효과를 가지는 물질을 알아내고 김치의 재료중 어느 성분이 이러한 효과를 지니고 있는지 검토하여 이들을 강화한 김치를 개발한다. 또한 생체를 이용한 *in vivo* 실험에서도 김치의 항산화 항노화성, 항동맥경화성 및 미용성 증진 효과를 확인하고, 이러한 기능이 증진된 김치를 산업화하는데 필요한 기초 실험을 한다.

본 연구를 통하여 김치 식이의 항산화 항노화성, 동맥경화 예방성 및 미용성 증진 효과를 과학적으로 규명할 수 있다면 우리 식생활의 우수성을 세계적으로 밝힐 수 있고 우리국민들의 김치에 대한 자부심을 고양할 수 있을 것이다. 따라서 현대의 신세대 어린이들이나 젊은이들이 점차 기피해 가고 있는 우리나라 전통 식생활을 지켜 가는 데에도 일조할 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 우리 김치의 우수성을 규명함으로써

외국인들의 우리 김치에 대한 관심을 고양시키고 김치의 소비촉진과 수출촉진을 이룰 수 있을 것이다. 또한 기능성이 극대화된 김치 레시피를 개발함으로써 국민 건강에 좋은 좌표를 제시할 수 있고 김치의 기능성을 증진시킴으로서 우리 농산물의 부가가치를 더 높일 수 있고 아울러 김치의 소비 증대를 통해 농민들의 소득 증대에도 기여할 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 항암 및 항노화 기능성 김치무리의 개발을 하는데, 그 연구 개발 내용은 제 1 세세부에서는 항암 실험과 김치제조방법을 이용하여 암예방/항암 김치를 개발하였다. 또한 소금과 김치와 암과의 관계 즉 소금을 과학적으로 연구하여 암예방에 유리한 소금을 개발하고 개발한 소금을 이용한 항암 김치의 개발 등을 하였다.

제 1세세부에서는 먼저 김치의 암예방활성을 검토하였다. 개발하려는 기능성 김치로는 배추김치를 주로 하고 그 외의 김치로는 부추김치를 선택하였다. 암예방/항암 김치를 개발하기 위해, 일반 배추 김치를 표준화하고 표준화된 김치를 기초로 하여 김치의 주재료, 부재료, 양념 등을 이용하여 암예방/항암 김치를 개발하고 소금의 종류, 고춧가루의 종류, 발효 온도, 용기 종류 등 김치의 재료 및 발효방법을 이용하여 김치의 암예방/항암 기능을 증진하는 연구를 하였다. 연구의 목표는 일반인이 암예방이 되면서 일반 김치 형태로 섭취할 수 있는 암예방 기능성 김치를 개발하려 하였다. 김치 종류로는 배추김치가 김치를 대표하기에, 실험에 주로 사용하였고 그 외 김치로는 김치를 만들 수 있는 채소의 주재료들을 이용하여 암예방 활성을 스크리닝 하였고, 가장 기능성이 높은 부추를 선택하였다. 개발되는 김치는 한국을 대표하는 표준화 레시피에서 시작되어 단점은 보완하고 장점을 살리면서, 맛과 보존성 그리고 특히 암예방 기능성을 고려하여 개발하였다.

제 2세세부에서는 제 1세세부에서 개발된 암예방 기능성 김치의 항암효과를 인체암 세포와 마우스 생체를 이용하여 측정하였다. 마우스 생체에서의 암 생성 억제효과, 간에서의 phase II 효소인 glutathione S-transferase(GST) 및 여러 효소계와 간조직의 암화상태, 회복, NK(자연살해) 세포, interleukin 등 면역계의 활성정도를 측정하였다. 항암 김치의 경우 활성물질을 동정하고 항암기작은 암세포의 분자수준에서의 연구를 통해 apoptosis, cell cycle arrest, signal transduction 억제효과 등의 실험법으로 측정하였다. 항암 기능성 김치 개발의 경우는 암환자들이 부담없이 섭취하여 치료에 도움이 될 수 있도록 하였다. 여기에서 개발된 기능성 암예방/항암김치는 산업계에 기술을 이전하려고 하고 있다.

한편 제 3세세부에서는 소금의 종류에 따른 특성연구, 젓갈의 안전성, 저염김치 개발, 암예방 소금의 개발과 이를 이용한 김치를 제조하여 기능성을 측정하였다. 국내

주요 소금의 종류를 이용하여 무기질 함량의 차이와 특히 죽염의 경우 죽염을 여러 차례 굽는 동안의 무기질 함량 변화도 보았다. 그리고 각각의 소금의 항균작용, 과산화물질생성 촉진능, (보)돌연변이유발성 등을 측정하였다. 소금의 종류에 따라 배추 절임속도 등 절임에서의 특성과 김치로 제조시 암예방효과를 검토하였다. 또한 소금의 섭취량을 줄이기 위해 저염김치를 개발하였다. 항균효과가 큰 초피를 이용한 김치와 Na 흡착능(alginate)이 있는 다시마를 이용해 소금을 흡착 제거하는 기능을 이용한 다시마 첨가김치를 개발하여 저염김치로 제조하였다. 소금의 Na 양을 줄이기 위해 김치 제조시 사용되는 소금의 30%를 KCl로 대체하여 KCl 대체김치를 제조하여 암 예방/항암 활성을 측정하였다. 본 연구에서는 KCl을 이용하여 암예방/항암 활성이 높은 KCl 혼합죽염을 개발하여 건강에 유리한 소금을 개발하도록 하였다.

제 2 세부에서는 항노화 기능성 김치무리를 개발하였으며, 그 연구내용의 범위는 다음과 같다. 먼저 김치의 기능성 연구를 위한 모델 김치를 설정하고, 이들 김치의 추출물 및 김치 부재료의 여러 가지 특수 기능성 효과를 확인하였다. 김치의 항산화 항노화성 물질, 항콜레스테롤성 물질 및 미용성 증진 물질을 분리하고, 동물 실험을 통하여 이들 물질의 생체내 효과를 연구하였다. 이러한 연구를 바탕으로 항산화 항노화성, 항콜레스테롤성 및 피부 미용성이 증진된 기능성 김치를 개발하고, 이들 김치의 산업화를 연구 범위로 하였다. 즉, 김치의 항산화성, 피부미용성 및 항동맥경화성 등을 검정하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 김치의 항산화성, 피부미용성 및 항동맥경화성 등을 조사 확인하고, 이들에 대한 김치 레시피를 개발하였다. 또한 김치 중 노화 억제 효과가 가장 우수한 김치의 맛과 관련 기능성을 증진시키기 위하여 김치의 공정개선과 재료물질의 강화 연구, 맛 및 보존성 연구를 수행하였다. 따라서 제 2세부의 세세부별 연구내용을 살펴보면 다음과 같다.

제 1 세세부에서는 항산화성 김치무리 개발에 관한 일련의 연구를 수행하였다. 김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되고 있다. 그러므로 갓김치와 일반적으로 많이 식용하고 있는 배추김치와 무김치의 항산화성을 비교하고 가열우육의 지방질 산화에 대한 항산화성 및 생체모델 실험에서도 이를 확인하였다. 또한 이 항산화성을 갓김치 자체는 물론 용매 추출물을 여러 가지 방법으로 분획하여 상대적인 항산화성을 비교 검토하였다. 그리고 김치류에 존재하는 이미 알고 있는 항산화 물질을 분석하고 이들의 항산화성을 살펴보았다. 특히 갓김치의 chlorophylls(CHL), carotenoids(CAR) 획분, 그리고 CHL a 및 CHL b, pheophytin(PHY) a 및 PHY b, β -carotene 등의 성분 에 대한 항산화성을 확인하였다. 기타 ascorbic acid와 phenol 물질 등도 확인하였으며, phenol 물질을 분리하여 그 조성을 살펴보았다. 또한 갓김치의 항산화 물질의 분리와 동정을 위하여 용매계통 분리 방법에 의한 항산화 물질의 분획, 분리하고 각 획분의 항산화성을 검정하였으며, 기기분석을 통하여 물질을 동정하였다. 한편 청갓김치

보다 적갓 김치의 항산화성이 더 높았으므로 적갓김치의 발효특성, 항산화활성, 항산화 특성을 살펴보았다. 적갓에서 독특하게 함유하는 antocyanin 색소(CAP)의 역할 특히 CAP의 유리라디칼 소거능, lipoxygenase 및 xanthine oxidase 활성을 살펴보았다. 그리고 anthocyanin 성분을 계통 분리하여 기기분석 등으로 유효 성분을 동정하였다. 항산화 항노화 김치의 개발 및 품질개선을 위하여 주재료(청갓 및 적갓)의 조합과 부재료(고춧가루, 생강, 마늘, 파 등)의 조합 그리고 특수 부재료로 항산화성이 있다고 알려진 더덕, 우엉, 청각 등의 조합에 대하여 살펴보았다. 또한 갓김치 담금법 개선을 위하여 기존의 담금법 및 관능성, 발효 특성을 검토하고 레시피에 대한 일련의 연구결과를 바탕으로 1차 갓김치 기본 레시피를 선정하며 여기에 일정 수준의 특수 부재료를 필요에 따라 첨가하였다. 그리고 개발된 기초자료를 바탕으로 산업화 연구를 하였다. 즉, 갓김치에 항산화성이 높은 부재료를 첨가함으로써 기능이 증진된 갓김치를 개발하였으며, 이 김치의 공정개선과 재료 물질의 강화 연구, 상품화된 맛 및 보존성 연구를 수행하였다.

제 2 세세부에서는 한국인이 보편적으로 많이 섭취하고 있는 배추김치, 갓김치 그리고 부추김치의 세 종류의 김치를 선정하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제 효과를 조사하였다. 먼저 김치와 김치 재료 중 피부노화를 억제시키는 효과가 있을 것으로 예상되는 항산화 성분인 chlorophyll, carotenoids, 총 비타민 C 및 페놀화합물의 함량을 분석하며, 피부미용 관련 무기질들의 함량을 측정하였다. 특히 김치의 피부산화 독성 완화 효과를 규명하기 위하여 피부세포인 Keratinocyte와 fibroblast에 paraquat와 과산화수소로 산화적 스트레스를 가해 김치 및 김치재료들의 세포독성 완화효과를 조사하였다. 그리고 세 종류의 김치를 각각 식이에 10%씩 첨가하여 hairless mouse에 16주간 공급하였을 때 피부의 표피층과 진피층에 미치는 김치 식이의 영향을 살펴보고 그 변화를 관찰하였다. 또한 사육 20주 후 hairless mouse의 간과 소기관에서 활성산소 농도를 비교하며, 간과 피부의 균질액에 대해 자외선을 조사한 후 광산화 억제 효과를 측정하였다. 피부노화 억제에 활성이 있는 물질을 찾기 위하여 각 김치를 종류별로 용매 분획하여 용매 획분 중의 항산화 물질의 함량을 측정하고 항산화성과 유리기소거능을 비교하였다. 또한 피부 균질액에 김치 용매획분을 일정농도 첨가하여 자외선을 조사한 후 광산화 억제효과를 살펴보고, 용매별 획분을 크림에 첨가하여 hairless mouse의 피부에 도포한 후 자외선 조사에 의한 홍반생성 억제능을 조사하였다. 이러한 실험의 결과를 근거로 하여 세 가지 김치 실험군 중 피부 미용성이 가장 높은 갓김치로 기능이 증진된 김치를 개발하여 산업화를 위한 기초 실험을 하였다. 즉, 갓김치에 항산화성이 높은 부재료를 첨가함으로써 피부 미용성 성분이 증진된 갓김치를 개발하며, 기능이 증진된 김치의 공정개선과 재료 물질의 강화 연구, 상품화된 맛 및 보존성 연구와 소비자 관능검사를 수행하였다.

제 3 세세부에서는 먼저 배추김치가 동맥경화를 예방하는 효과가 있는지 조사하고자 흰쥐에게 김치 3, 5, 그리고 10%을 첨가하여 사육하며 이때 혈장 및 간의 콜레스테롤 및 중성지방의 농도를 측정하였다. 김치에 의한 이들 효과가 뚜렷이 관찰된 다음, 김치의 지질저하 효과가 재료에서 오는지의 여부를 확인하기 위하여 토끼에게 1% cholesterol을 첨가한 동맥경화식이에 동결건조한 배추가루 8%, 고춧가루 1%, 마늘가루 1%을 첨가하여 16주 사육한 후 대조군과 비교하였다. 동맥경화를 예방하는 활성물질을 확인하기 위하여 김치를 용매별로 분획한 후 이를 토끼의 식이에 김치 5%에 해당되는 양으로 첨가한 다음 16주간 사육하였다. 이때 김치에서 동맥경화 예방효과가 가장 현저한 획분으로부터 활성물질을 분리 동정하였다. 배추김치에 동맥경화를 예방하는 효과가 있음을 기초 연구를 통하여 확인한 다음, 김치의 동맥경화 예방성을 증진할 수 있으면서, 맛, 향미, 질감 등의 기호도가 우수한 기능성 배추김치를 제조하기 위한 연구를 하며, 이러한 연구의 결과로서 동맥경화예방 기능성 배추김치의 레시피를 개발하였다. 개발된 기능성 배추김치(배추갓김치)를 담구어 SAM을 이용하여 동물실험을 행하여 기능성 배추김치의 우수성을 확인하였다. 또한 임상실험에서도 이러한 효과를 확인하기 위하여 김치를 pill로 만들어 하루에 3g(김치 30g에 해당)씩 섭취시키고 기능성 배추김치의 동맥경화 예방성을 확인하였다. 그리고 대량으로 담긴 기능성 배추김치를 소비자들의 기호도 조사를 실시하여 그 상품성을 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

제 1 세부 : 항암 기능성 김치무리의 개발

제 1세세부 : 본 연구에서는 여러 가지의 암예방 기능성 김치가 개발되었다. 배추김치는 선행연구에서와 같이, 일반적으로 항돌연변이 효과, 항발암효과 등 암예방 기능성이 있었다. 이 기능성을 더욱 증진시키기 위해 먼저 배추김치를 표준화하여 이를 기초로 기능성 증진 연구를 하였다. 이 연구에서는 김치의 재료 중 배추종류, 소금종류, 고춧가루 종류, 첨가량 그리고 다른 양념의 농도 등을 조절하였고 발효 방법으로는 온도조절 및 용기의 특성 등을 비교하여 암예방 기능성 김치 I ~ VI을 개발하였다. 암예방 기능성 김치 I은 표준화 배추김치 레시피에서 유기배추, 고춧가루양, 소금종류, 양념종류 등을 이용하여 제조되었으며 이 경우 *in vitro*와 *in vivo*에서 암예방효과가 현저히 증진되었다. 레시피는 표준화김치레시피에 7% 고춧가루, 2.8% 마늘, 0.1% 초피가루, 5%의 갓을 첨가하고 5℃에서 발효 온도는 저온인 5℃에서 저장하고 게르마늄 향아리에서 저장하거나 김치 발효시 게르마늄석이나 맥반석을 넣는 것이 항돌연변이 효과가 컸었다. 암예방 기능성 김

치 II는 첨가소금 중 소금(구운소금)에 30%를 KCl로 대체하였고 즉, 암예방 기능성 김치 I에 KCl대체염을 사용한 김치로 암예방 효과가 10%정도 증가되었다. 이 김치는 colon 26-M3.1 carcinoma 세포를 이용한 종양전이 실험에서 암세포의 전이를 최고 49%까지 억제하는 효과를 나타내었고 소비자 조사 연구에서도 시판 김치에 비해 크게 선호도가 떨어지지 않는았다. 암예방 기능성 김치 III(기능성김치 II에서 고춧가루를 7%에서 5%로 감소시킨 것)에서 맛을 고려한 제품을 만들었다. 암예방 기능성은 다소 떨어지지만(10%) 그 맛은 크게 증진되어 일반인에게 제품화했을 때 선호도가 높을 수 있었으며, 그의 재료비는 다음과 같았다. 암예방 김치III에 버섯, 다시마 우려낸 물을 첨가하고 고춧가루 중 반은 시판용 고춧가루, 반은 통고추를 믹서에 간 것을 사용하였다(암예방김치IV). 암예방 기능성 김치 V는 기능성 김치 IV에 제 3 세세부에서 개발한 KCl혼합(NaCl:KCl=5:5)죽염을 사용한 것으로 암예방 효과가 기능성김치IV에 비해 10~20% 증가되었다. 이 기능성 김치는 암예방 기능과 맛이 고려된 김치라 할 수 있다. 암예방 기능성 김치 VI는 기능성 김치 IV에 녹차잎을 2~4% 첨가한 것으로 암예방 기능성이 기능성 김치IV에 비해 10~20%로 증가되었고 다이어트 효과도(결과생략) 증진되었다. 한편 다른 김치로 선택한 부추김치는 암예방 효과가 컸으며 부추김치의 경우도 암예방 기능성 김치 개발을 위해 문헌과 실험을 통해 표준화 작업을 먼저 실시하였다. 표준화 부추 김치를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 암예방활성을 검토하고 부재료 첨가에 의해 암예방 기능성 부추 김치를 개발하였다. 그 레시피는 표준화 부추김치 재료배합비에 들깨와 초피가루를 각각 0.5%씩을 첨가하고 초피의 매운맛을 감소시키기 위해 버섯과 다시마를 우려낸 물을 이용하여 찹쌀풀을 만들어 첨가하였으며 표준화 부추김치보다도 암예방 활성이 2배(표준화 부추김치 31% 에서 기능성부추김치 78%로 증가) 정도까지 인체 암세포증식억제효과가 높았다. 결국 이 연구를 통해 김치 재료, 발효, 유통 방법 등을 이용하여 7가지 암예방 김치가 만들어졌으며 이들 제품은 벤처 기업((주)효원 메디푸드)에 기술을 이전 중에 있다.

제 2세세부 : 항암 기능성 김치의 개발에서도 일반 배추김치의 항암성을 확인하고, 제 1세세부에서 개발된 암예방 기능성 김치의 항암성을 인체 암세포와 마우스 생체 실험을 통해 확인하였다. 일반 배추김치는 인체 암세포의 성장 및 DNA합성을 억제하였고 유선상피세포의 성장, 분화에도 영향을 주었다. 그리고 마우스에서 종양의 성장을 억제하였고 마우스간의 실험에서도 GST활성과 glutathione의 활성을 증가시키고 lipid peroxide 함량과 xanthine oxidase는 감소시켜 김치추출물은 생체 실험계에서 항암효과가 있었다. 김치 추출물 중 dichloromethane 분획이 항암 활성이 컸으며 β -sitosterol과 linoleic acid derivative가 중요 활성물질로 동정되었다. 이 활성 물질과 분획물은 암세포의 apoptosis를 유도하고 G₂/M phase에서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 김치 활성 물질(분획물)은

signal transduction을 조절하여 Ha-ras발현을 억제 하는 방법으로 항암효과를 나타내었다. 김치(유기배추김치)추출물은 마우스의 면역 활성을 증가시키는 효과도 있었는데, 마우스의 NK 활성화와 interleukin-2의 생성을 높이는 효과가 관찰되었다. 항암성을 증진시키기 위한 실험 결과 암예방 기능성 김치 I은 항암활성이 다른 김치에 비해 높았으며 이 연구는 마우스 종양생성 억제, 간의 효소계 활성화 효과, *in vivo*에서 면역활성 효과 및 *Helicobacter*를 이용한 NO생성 및 TGF- β_1 활성을 증가시킴이 확인되었다. 결국 암예방 기능성 김치 I은 항암효과도 있는 것으로 나타나 암예방/항암 김치 I으로 개발되었다. KCl 대체 소금을 사용했던 암예방 기능성 김치 II는 *in vivo*에서도 역시 항암 활성이 컸으며 이 경우 구운소금(70%) + KCl(30%) 소금을 김치 담금시 사용할 때 김치의 항암성이 증진되었고 마우스 간의 조직학적 관찰에서도 대조군(sarcoma-180 tumor cell처리군)과는 달리 Kupffer 세포변화, 지방변성, 국소적 괴사가 줄어들고 정상군으로 회복되어 항암 효과가 확인되었다. 항암 기능성 김치 II에서 고춧가루 함량을 2% 줄이고 (총 5%) 고추종자와 과피를 7:3으로 조절하여 제조된 김치를 소비자 기호도 조사를 한 경우 선호도는 감소되어 고춧가루 사용시 씨가 항암효과가 컸으나 관능검사, 선호도 조사에서 떨어져 30% 정도의 씨가 들어가는 일반 고춧가루를 사용하는 것이 좋게 나타났다. 위의 소비자 기호도 조사를 근거로 암환자용 항암 김치를 맛과 항암 기능을 고려하여 개발하였다. 암환자를 대상으로 설문 조사를 하고 맛을 고려하여 김치를 제조하고 제조 유통 실험을 한 결과 좋은 선호도 결과를 얻었다. 이 경우 항암 기능성 김치 II에 고춧가루를 2.5%로 낮추고 마늘과 갖의 농도를 높이고 소금은 3세세부에서 개발한 KCl 혼합 죽염을 사용하였다. 1세세부에서 개발된 녹차 첨가 암예방 기능성김치는 역시 항암효과가 높았다. 녹차 김치는 인체 위암세포, 그리고 마우스에서 sarcoma 180 종양생성억제, 간의 GST활성증가 등의 항암효과를 나타내어 항암 김치로도 손색이 없었다. 부추 김치는 일반 배추 김치보다 항암 활성이 높았고(2배 정도), 활성물질은 dichloromethane층에 있었으며, 활성 분획은 암세포의 G₂/M phase를 arrest하는 효과가 있었다. 항암 기능성 부추김치는 암예방 기능성 부추김치로 항암활성이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 다시 확인되었다.

제 3세세부 : 국내에 시판되고 있는 소금을 이용하여 소금 종류에 따른 특성과 생리적 기능의 차이점 등을 검토하고, 김치에서 소금의 함량을 줄이기 위한 저염 김치 개발, KCl 대체염 김치개발을 하였다. 또한 본 연구에서는 소금의 암예방 기능을 증진시키기 위해 KCl 혼합 죽염을 제조하였으며 이를 이용하여 암예방/항암 기능성 김치를 개발하였다. 그리고 김치에서 소금의 주요 급원인 젓갈의 안전성도 검토하였다. 소금은 종류에 따라 미네랄 함량이 달랐으며 천일염과 가공염 중 구운소금은 Ca, K, Mg, S 등이 많았고, 죽염은 NaCl이 93.6%였고, K와 Fe 함량이 크게 증가되었으며, 정제염은 99.8%가 NaCl이었다. 9회 죽염은 핏수가 높아질수록 pb의

함량은 줄고 Cu, Zn, P, K, Fe 함량은 증가하였다. 죽염 제조시 사용되는 진흙은 Cu, K, Fe, P 등의 함량이 높았고 종류에 따라 pb가 다소 오염되어 있었다. 소금은 종류에 따라 항균성, 과산화물 축진능, 돌연변이 유발능이 각각 달랐는데 항균성은 정제염이 높았으나 *Leu. mesenteroides* 균에 대해서는 정제염이 항균력이 컸으나 *Lac. plantarum* 부패젖산균에 대해서는 구운소금, 죽염이 항균력이 높았다. 과산화물 축진 및 돌연변이 유발능에 있어서는 정제염이 가장 높았으며 죽염이 가장 낮았고, 이 경우 경제적으로 볼 경우 구운 소금이 좋았다. 한편 젓갈을 익히지 않은 상태 (생젓갈)는 소금 때문에 돌연변이 유발성이 있었고 대신 12개월 숙성하여 익은 젓갈은 다소의 항돌연변이 효과가 있어 암예방 측면에서 유리하다고 하겠다. 소금 종류에 따라 배추의 절임속도가 달랐으며 죽염이 가장 빠르고 구운소금, 한주소금, 천일염, 호주산염 순이었다. 김치 발효시 구운소금이 맛, 저장성, 암예방 효과면에서 가장 좋았고, 동맥경화 유발의 경우도 구운 소금을 사용하는 것이 유리하였다. 저염김치를 개발하기 위해 소금의 양을 0.8% 감소시키고 초피의 항균성을 이용한 김치를 제조하였다. 이 김치의 특성은 1.7%NaCl과 0.2%초피 첨가김치로 2.5%NaCl 첨가 보통김치와 비교해 맛과 발효패턴 등에 큰 차이가 없었다. 또 다른 저염김치로 다시마 첨가 김치를 개발 하였다. 다시마는 알진산을 20% 정도 함유하고 있으며 이 식이섬유소는 Na를 30%정도 위, 작은창자 pH 조건 내에서 흡착하는 효과가 있었다. 다시마 김치는 다시마를 0.5×3 cm flake로 만들어 김치에 30% 첨가하여 제조하였는데 기호도 측면에서 대조김치와 큰 차이를 나타내지 않았고, 기능적인 면에서 우수하였다. 또한 암예방 및 고혈압을 예방하기 위해 김치내의 소금의 양을 줄이는 기술로 KCl 대체염(30%)를 사용하였다. KCl은 NaCl보다 생리적으로 우수하였고, 과산화지질 생성, 돌연변이 유발억제면에서 우수하였다. KCl 대체염으로 제조한 김치는 다른 소금으로 제조한 것보다 *in vitro* 및 *in vivo*에서 암예방/항암 효과가 우수하게 나타났다. 소금의 특성과 기능성 연구에서 KCl과 NaCl을 3~7 : 7~3의 비율로 혼합하여 1회 또는 2회 구운 죽염은 암예방 활성이 높았다. 이 소금을 이용한 김치는 맛에도 크게 영향을 끼치지 않으며, 암예방/항암 활성이 크게 높아졌다. 이 KCl 혼합 죽염은 특허를 출원하였으며 벤처기업에 기술이전을 할 예정이다.

제 2 세부 : 항노화 기능성 김치무리의 개발 연구

제 2 세부에서는 김치와 김치의 재료가 가지는 항노화성을 연구하고, 항노화 기능성을 가지는 김치 무리를 개발함에 그 목적이 있었다. 이에 각 세세부별 연구 개발한 결과를 살펴보면 다음과 같다.

1세세부에서는 항산화성 김치무리 개발에 관한 일련의 연구를 수행한 결과, 김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화

성에 깊이 관여하고 있다고 판단되었다. 특히, 갓김치는 일반적으로 많이 식용하고 있는 배추김치나 무김치보다 항산화성이 높았으며, 가열우육의 지방질 산화에 대한 항산화성이 인정되었고 또한 생체모델 실험에서도 이를 확인하였다. 이러한 항산화성은 김치의 발효 적정 시기에 더 높았다. 갓 김치 자체는 물론 용매 추출물을 여러 가지 방법으로 분획하여 상대적인 항산화성을 비교 검토한 결과 우육지방질의 모델 시스템에서 지방질의 과산화 방지 특성, TBARS(TBA가) 생성억제, 유리라디칼 소거 특성 그리고 rat liver homogenate와 EPC liposome에 대한 높은 항산화 특성을 보였다. 따라서 갓김치 및 갓김치 성분들은 지방질의 과산화 억제, 유리라디칼 등의 소거능력 그리고 항산화 관련효소의 활성 촉진 작용이 있었다. 김치류에 존재하는 항산화 물질을 분석하고 이들의 항산화성을 살펴본 결과 갓김치의 chlorophyll(CHL), carotenoids(car) 획분에서 대단히 높았으며, CHL a 및 CHL b, pheophytin(PHY) a 및 PHY b, β -carotene 등의 성분이 항산화성에 중요한 역할을 하였으며, 기타 ascorbic acid와 phenol 물질 등도 확인되었다. Phenol 물질을 분리하여 그 조성을 살펴 본 결과 vanillic acid, hydroxycinnamic acid, ferulic acid 등 10여개의 물질이 함유되어 있었다. 갓김치를 용매계통 분리 방법에 의하여 항산화 물질의 분획, 분리하여 각 획분의 항산화성을 검정하였으며, Phenol 물질 중 flavonoids를 분리하여 동정한 결과 kaempferide-7-o-glucoside 등이었다. 한편 청갓김치보다 적갓김치의 항산화성이 더 높았으므로 적갓김치의 발효특성, 항산화활성, 항산화 특성을 살펴본 바 적갓에서 독특하게 함유하는 antocyanin 색소(CAP)가 중요한 역할을 하였다. CAP는 유리라디칼 소거능도 높을 뿐만 아니라 lipoxygenase 및 xanthine oxidase 활성을 저하시키는 특성도 높았다. 이러한 anthocyanin 성분을 계통분리하여 기기분석 등으로 동정한 결과 주성분은 P₁ [peonidin 3-O-(6-O-p-coumaryl)- α -L-rhamnopyranoside]-5-O- β -D-glucopyranoside]등 이었다. 따라서 갓김치에 함유하는 항산화물질은 극히 다양하며 결과적으로 광범위한 물질의 종합적인 역할에 의하여 높은 항산화성을 나타낸다고 판단되었다. 그리고 주재료(청갓 및 적갓)의 조합과 부재료(고춧가루, 생강, 마늘, 파 등)의 조합 그리고 특수 부재료로 항산화성이 있다고 알려진 더덕, 우영, 청각 등의 조합에 대하여 살펴보았으며 계절별 갓의 특성도 검토하였다. 또한 갓김치 담금법 개선을 위하여 기존의 담금법 및 관능성, 발효 특성을 검토하고 레시피에 대한 일련의 연구결과 1차 갓김치 기본 레시피를 선정하였으며 여기에 일정 수준의 특수부재료를 필요에 따라 첨가하도록 하였다. 그리하여 2차로 개발된 기능성 증진 갓김치를 바탕으로 산업화 연구를 하였다. 즉, 갓김치에 항산화성이 높은 부재료를 첨가함으로써 기능성이 증진된 갓김치가 개발되었으며, 이 김치의 공정개선과 재료 물질의 강화 연구, 상품화된 맛 및 보존성 연구를 수행하고 소비자 관능검사를 행한 결과 대조군보다 기능성이 증진된 갓김치 실험군에서 기호도의 높은 점수를 얻었으며 선호도도 더 높았다.

제 2 세세부에서는 배추김치, 갓김치 그리고 부추김치 세 종류를 선정하여 *in vitro* 와 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제효과를 살펴보았다. 먼저 김치와 김치재료 중 피부노화를 억제시키는 효과가 있는 여러 가지 항산화 성분의 함량을 분석하였으며, 세 종류의 김치를 각각 식이의 10%씩 첨가하여 hairless mouse에 공급하였다. 사육 기간별로 피부에 나타나는 변화와 간에서의 활성산소 농도, 간과 피부의 균질액에 자외선 조사 후 광산화 억제효과, 용매분획 후 피부노화 억제 성분을 분석, 광산화 억제효과 및 흥반생성 억제능에 대한 실험을 행하였다. 그 결과 김치를 섭취한 hairless mouse의 피부는 피부두께가 두껍고 각질화가 적게 일어났으며, collagen의 합성이 활발해 특히 갓김치군과 배추김치군은 대조군에 비해 피부노화에 억제효과가 있었다. 김치 섭취시 활성산소 소거능을 측정한 결과는 간의 mitochondria에서 superoxide anion 함량은 대조군에 비해 모든 김치 투여군들이 낮게 나타났으며 갓김치군에서 가장 낮았다. 또한 항산화물질인 비타민 C 및 carotenoids 함량과 칼슘, 구리, 셀레늄의 무기질 함유량은 갓김치군에서 가장 높았다. 진피에서 collagen 형성에 관여하는 rough endoplasmic reticulum 활성에서는 갓김치와 배추김치군에서 현저히 발달하였으며, UV 조사후 갓김치군과 배추김치군은 대조군보다 광산화가 억제되었다. 김치의 피부노화억제에 관한 활성물질을 확인하기 위하여 갓김치의 메탄올 추출물의 과산화물가를 측정한 결과 항산화성은 갓김치에서 높았다. 이처럼 김치 속에는 많은 생리활성물질들과 항산화물질이 들어 있어 김치의 섭취는 피부 미용에 효과가 있고 더 나아가 피부 노화를 방지할 수 있다고 할 수 있는데 특히 세 가지 김치 실험군 중 피부 미용성이 가장 높은 것은 갓김치로 나타났다. 이에 갓김치에 항산화성이 높은 부재료를 첨가함으로써 피부 미용성 성분이 증진된 갓김치를 제조하고자 하였다. 피부 미용성 증진 부재료는 녹차와 늙은호박으로 선정되었으며 이들을 동결건조한 후 비율을 각기 달리하여 첨가한 다섯 개의 실험군의 갓김치를 제조하여 실험을 행한 결과 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 갓김치 실험군이 저장성 및 관능성에서 가장 우수하였다. 또한 피부 노화를 억제시키는 효과가 있는 항산화 성분과 무기질 성분들도 이 실험군에서 높은 함량을 나타내었다. 따라서 항노화 A type 갓김치 최종 상품화를 위하여 선정된 갓김치 실험군은 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 갓김치 실험군으로 이 실험군의 레시피와 개선된 담금공정을 이용하여 대량으로 갓김치를 담은 후 소비자 관능검사를 실시하였다. 그 결과 대조군보다 기능성이 증진된 갓김치 실험군에서 기호도의 높은 점수를 얻었으며 선호도도 더 높았다.

제 3 세세부에서는 첫째 배추김치가 동맥경화를 예방하는 효과가 있는지를 흰쥐에게 김치 3, 5, 그리고 10%를 첨가하여 사육하였을 때 혈장 및 간의 콜레스테롤 및 중성지방의 농도가 김치 첨가 농도에 의존적으로 감소하였고, LDL-C 은 감소하고, HDL-C는 증가하여 김치에 의한 효과가 뚜렷이 관찰되었다. 이에 김치의 지질저하 효

과가 재료에서 오는지의 여부를 확인하기 위하여 토끼에게 1% cholesterol을 첨가한 동맥경화식이에 동결건조한 배추가루 8%, 고춧가루 1%, 마늘가루 1%을 첨가하여 16주 사육한 후 대조군과 비교하였을 때 혈장 및 간의 지질농도를 떨어뜨리고, 토끼 동맥 내벽의 미세구조는 대조군에 비해 지질침착정도가 적었다. 그리고 LDL 산화억제에 관한 *in vitro* 실험에서 마늘 및 고춧가루의 첨가 농도에 의존적으로 LDL 산화가 억제됨이 확인되어 항동맥경화성을 증진시키기 위해 김치담금시 두 부재료의 첨가량을 높일 필요성이 있었다. 동맥경화를 예방하는 활성물질을 확인하기 위하여 김치를 용매별로 분획한 후 이를 토끼의 식이에 김치 5%에 해당되는 양으로 첨가한 다음 16주간 사육하였을 때 dichloromethane 획분을 첨가한 식이를 섭취한 군의 동맥경화 예방 효과가 가장 현저하였으며, 이 획분으로부터 물질을 분리 동정하였다. 배추김치에 동맥경화를 예방하는 효과가 있음을 기초 연구를 통하여 확인하였기에, 김치의 동맥경화 예방성을 증진할 수 있으면서, 맛, 향미, 질감 등의 기호도가 우수한 기능성 배추김치를 제조하기 위한 연구를 실시하였다. 절인배추에 대하여 갓잎 30중량%, 고춧가루 3.4% 및 마늘 3.1%의 양을 중량비로 첨가하였을 때 혈장 및 간의 지질저하 효과가 가장 높았으며, 이러한 연구결과 동맥경화예방 기능성 배추김치의 레시피를 개발하였다. 제조된 배추갓김치는 실온에서 일정 시간(여름철 3시간, 겨울철 15시간) 둔 다음 5°C에서 저장하였을 때 김치의 적성이 가장 우수하였다. 개발된 기능성 배추김치(배추갓김치, 향노화 B type 김치)를 상기의 방법으로 담구어 SAM을 이용하여 1년간 동물실험을 한 결과 대조군과 배추김치를 비교하였을 때 배추갓김치를 섭취하게 되면, 혈장지질 농도 및 간조직의 지질이 저하되고, 콜레스테롤의 생합성 조절효소인 HMG-CoA 환원효소의 활성이 억제됨이 확인되었고, 이러한 효과를 임상실험에서 확인하기 위하여 김치를 pill로 만들어 하루에 3g씩(김치 30g에 해당) 섭취시켰을 때 쌀가루를 첨가한 위약군을 섭취한 사람에 비해 혈중 중성 지방을 떨어뜨리고, 고밀도지단백질을 높여 동맥경화지수를 낮추는 결과를 얻어 기능성 배추김치의 동맥경화 예방성을 동물실험 및 임상실험을 통하여 확인하였다. 그리고 대량으로 담근 배추갓김치를 pH 4.1-4.3사이에 도달하였을 때 대조군인 배추김치와 같이 소비자들의 기호도 조사를 실시하였을 때 맛, 외관 등에서 기호성이 우수하게 나타났으며, 이 배추김치에 동맥경화를 예방하는 과학적인 근거가 있으므로 사먹겠다고 대답한 사람이 약 80%로 상품성이 높은 것으로 조사되었다.

위의 1세부와 2세부 연구를 통해 특허가 6건, 국내 학술지 게재는 61건, 해외학술지는 3건, 국내학회발표 82건, 국제학술대회 발표 17건, TV, 신문, 잡지보도 83건, 기타(교육 등) 6건으로 총 258건의 실적이 있었으며 김치의 새로운 기능과 그 기능이 강조된 제품이 산업화되는 계기가 되었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 많은 김치의 기능성이 알려지게 되었다. 김치는 짜고 매워서 위암이나 고혈압의 원인으로 생각했던 것에서부터 제 1세부에서의 김치의 항암성, 암예방 효과, 고춧가루의 기능성, 소금의 건강과의 관계, 젓갈의 안전성 등 암과 관련된 기능성의 결과가 메스콤을 통해 알려졌다.

한편 제 2세부에서의 연구를 통해서도 김치는 노화를 억제 할 수 있음이 알려지고 항동맥경화 활성 및 피부미용 증진 효과가 있음이 확인되어 노화를 지연시키는 효과가 있음이 알려 지게 되었다. 또한 최근에는 이 연구를 통해 김치의 다이어트 효과가 있음이 밝혀지기도 했다(결과 생략). 역시 이러한 기능도 메스콤에 알려졌다.

결국 연구를 통해 국내 뿐 아니라 국외(일본 등 : 2000년 8월~12월 Internet Conference, Pre-Congress for 11th World Congress of Food Science and Technology on April 22-27 of 2001 에 발표)에 김치의 기능성과 우수성이 알려지게 되어 김치에 대한 좋은 홍보가 되었으며 김치의 섭취 증가도 있었고 수출 확대 (2000 한일 김치 세미나 주최, 농림부-부산대 김치 연구소 주관)도 있었다.

이 연구 개발의 결과는 김치에 대한 과학적 기능성 연구 확인, 증진, 홍보, 섭취 확대, 수요 창출 등이 일어남으로 김치의 연구를 활성화하는데 널리 관여했다고 하겠다.

그러나 이러한 홍보와 함께 일본은 김치의 국제 규격화를 통해 일본 뿐 아니라 김치를 세계화하는데 상품화에 진력을 기울이고 있다. 이런 기능성이 연구되고 또 제품화까지 이 연구를 통해 제시되었지만 일본과 비교해 김치의 상품화 기술이 약하므로 이에 대한 뒤따른 연구가 절실하다고 하겠다. 정부(농림부)에서는 김치에 대한 후속적인 상품화, 세계화 연구에 더 후원하여 이 연구의 결과가 외국 특히, 일본에 이용되지 않도록, 우리가 먼저 좋은 상품화 및 세계화, 내수시장 확대 등이 되도록 계속적인 지원을 바란다.

SUMMARY

The antimutagenic/anticancer, and antioxidative/antiaging functional kimchi groups were developed. In the first section of **the first part of this project**, various kinds of antimutagenic/anticarcinogenic functional kimchi were developed. The chinese cabbage kimchi(generally called kimchi) was first standardized by using the references from literatures and cook books, kimchi making experts, experimental studies etc. The standardized kimchi showed antimutagenic/anticarcinogenic activities. The ingredient ratios, kinds, fermentation methods, etc were manipulated to increase antimutagenic/anticarcinogenic activities of the kimchi. In the main ingredient, organically cultivated chinese cabbage contained higher levels of nutrients such as vitamin C, carotenoids, chlorophyll and dietary fibers than commonly cultivated cabbage. The antimutagenic/anticarcinogenic effect was also greater when a kimchi was prepared with the organically cultivated cabbage. The cancer preventive functional kimchi I was prepared by using organically cultivated chinese cabbage, gueun salt(a processed salt), and different levels of various condiments, especially, with increased levels of garlic, red pepper powder and addition of chinese pepper and mustard leaf. The cancer preventive functional kimchi II was developed by changing only the salt type in the functional kimchi I, 30% KCl +70% NaCl(gueun salt) instead of 100% NaCl, and then the antimutagenic/anticarcinogenic activities were increased compared to the functional kimchi I. The functional kimchi III(decreased red pepper powder content from 7% to 5%) was again developed for the purpose of increasing the taste of the functional kimchi II. Functional kimchi IV was developed using soup of mushroom and sea tangle, and the taste of the kimchi III increased, the antimutagenic activity was somewhat decreased by about 10% in this case. The functional kimchi V was developed by using anticarcinogenic salt(KCl+NaCl mixed bamboo salt) that developed by the section 3. The antimutagenic/anticarcinogenic activity was considerably increased(10~20%) compared to the kimchi IV. The cancer preventive functional kimchi V exhibited higher antimutagenic/anticarcinogenic activities with good taste. The functional kimchi VI was again developed by the addition of 2~4% of green tea leaves(GTL). The GTL added functional kimchi was delayed the fermentation period and

increased anticancer activity along with diet effect(data not shown). Another cancer preventive kimchi using buchu(leek) was developed. The buchu kimchi was standardized and the functional buchu kimchi was developed using ingredients levels and kinds, KCl +NaCl mixed bamboo salt, etc. The functional buchu kimchi showed higher anticlastogenic activity in the micronucleus test in the mice. Thus seven different kinds of cancer preventive functional kimchi were developed in the first section of the first part of this project.

In the 2nd section, the antitumor/anticancer functional kimchi had been developed. The antimutagenic/anticarcinogenic functional kimchis that prepared in the first section had been confirmed their antitumor activities using sarcoma 180 transplanted mouse. The kimchi samples showed antitumor activities, increased the activities of NK cells and macrophages in the mouse and decreased the growth of various human cancer cells, etc. The anticancer mechanisms of the kimchi were determined on the molecular levels. The active compounds were also isolated and identified by GC-MS and EI-MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum. The kimchi exhibited anticancer activities in human cancer cells, reduced DNA synthesis and the growth was inhibited. And the kimchi induced differentiation of the mammary epithelial cell. The kimchi extract also inhibited the tumor formation in the sarcoma-180 transplanted mouse. The extracts increased the activity of GST, and content of glutathione and decreased the lipid peroxide content in the mouse liver. The anticancer activity was found in dichloromethane fraction of the kimchi extract. β -sitosterol and linoleic acid derivatives were identified as the major active compounds in the dichloromethane fraction. The fraction and β -sitosterol induced apoptosis of the HL-60 human leukemia cells and arrested G2/M phase in the cell cycle, indicating the anticancer effect may be the results of induction of apoptosis and cell cycle delay on G2/M phase. The dichloromethane fraction of the kimchi increased the immunity by stimulating interleukin-2 production and NK cell activity. Also the fraction and β -sitosterol blocked the signal transduction pathway via ras to nucleus in HIRc-B cells that microinjected oncogenic H-ras^{v12}. The anticarcinogenic functional kimchi samples that developed in section 1 also exhibited antitumor effect *in vivo* and in human cancer cells. The anticancer functional kimchi had been developed for cancer patients. The recipe of the kimchi was manipulated by reducing red pepper powder content from 5~7% to 2.5%, increasing the contents of garlic, mustard leaf and using

KCl-mixed bamboo salt that developed in section 3. The leek functional kimchi also showed antitumor activity and showed similar anticancer mechanisms to that of the chinese cabbage kimchi. The anticancer activity of the leek kimchi was higher than general chinese cabbage kimchi.

In section 3, the salt(NaCl) was evaluated for their general characteristics, safety and functionality depending on various kinds of salt available in Korea. We tried to develop a functional salt that can be used as a table salt and for kimchi making. In this study, the safety of fermented anchovy juice that added as an ingredient in kimchi to improve taste and as a source of salt was also studied. The different kinds of salt contains different levels of minerals, The natural(chunil) salt and gueun salt(a processed salt) contained higher levels of Ca, K, Mg, S, etc. The bamboo salt contains higher levels of K, Fe, Si, with 93.6% NaCl compared to other salt, however, the purified(hanju salt) contains 99.8% NaCl. The bamboo salt which is a traditional Korean made salt showed antimicrobial and antimutagenic activities and decreased formation of malondialdehyde compared to other salts. The gueun salt was an appropriate salt that can be used as a table salt and for kimchi preparation in terms of the functionality and economically among the tested salts. The raw salted anchovy had mutagenic activity due to the presence of the salt(20%), but the 12 month-fermented anchovy showed antimutagenic activity. Thus the salt fermented anchovy that can be used for kimchi preparation should be well ripened. The salting rate of the chinese cabbage was different depending on the kinds of the salt. The heat processed salt, especially bamboo salt increased the salting rate, followed by gueun salt, natural(chunil) salt and imported salt from Australia. The low salt(or sodium) kimchis were developed. The chinese pepper which has antimicrobial activity was used. 1.7% NaCl+0.2% chinese pepper powder added kimchi was developed as a low salt kimchi, which was very similar to the common kimchi in fermentation pattern and the taste. Another low sodium salt kimchi was developed using sea tangle that contains approximately 20% alginate. The alginate captures Na in stomach and small intestine pH conditions, and removed the Na in feces. 30% of 0.5×3cm flake of the washed sea tangle was added to the kimchi to make sea-tangle kimchi, The taste, appearance, and fermentation patterns were all acceptable. The KCl mixed(NaCl:KCl=3~7:7~3) bamboo salt was developed that shows antimutagenic/anticancer effects in the test systems. This salt showed higher anticancer activity and lowered lipid

peroxide values in kidney and heart in the mice. The KCl mixed bamboo salt can be used as a table salt. Also the antimutagenic/anticancer functionality was considerably increased when it was used to make kimchi. In the first part of this project, we especially developed various kinds of anticancer functional kimchis that can be practically used in kimchi industry along with a new functional salt of KCl-mixed bamboo salt.

In the second part of this project the antiaging functional kimchis were developed in order to develop an recipe and standardized preparation process for making *kimchi* that mainly emphasized on retarding aging, three different subjects relevant to anti-aging effects of *kimchi* were studied. The antioxidant potential of *kimchi* has been carried with mustard leaf *kimchi* and the preventive effects of skin aging was studied with Korean cabbage *kimchi*, mustard leaf *kimchi* and leek *kimchi*. And anti-atherogenic effects of *kimchi* was investigated with Korean cabbage *kimchi*. Fundamental researches regarding ingredients or active principles in *kimchi* which are responsible for retarding aging has been carried out individually followed formulation of anti-aging *kimchi* recipe A and B. Type A recipe is for the functional mustard leaf *kimchi* and that of type B is for the functional Korean cabbage *kimchi*. The anti-aging effects of type A and B *kimchi* has been proved from one year of animal study using SAM as well as from the clinical trial. The consumer's field test for the acceptance or preference of the functional *kimchi* were carried out. The followings are the results from the fundamental studies from each subjects and results from the anti-aging study of the functional *kimchi*.

The antioxidant property of mustard leaf *kimchi*(MLK) were started to find out the antioxidative activities of various solvent extracts and fractions separated by the systematic separation technique from MLK and mustard itself. And also it was conducted for the identification of antioxidative components. Finally, this study was performed to develop a functional *kimchi* which has antioxidative characteristics. The antioxidative effect of MLK on the lipid peroxidation reaction, DPPH radical system and other reaction were observed. Properly fermented *kimchi* exhibited a higher antioxidant activity than improperly fermented *kimchi* on the oxidation system. By determining the content of related compounds during *kimchi* fermentation, it was suggested that ascorbic acid, carotene, chlorophylls and phenolic compounds were major antioxidant components in *kimchi* systems. Various solvent fractions and isolated components

from freeze dried MLK have an antioxidant activity on the oxidation process. Identified chemical components through the analytical process were kaempferide-7-*o*-glycoside among flavonoid compounds and two compounds of anthocyanins. By the proper combination for major raw materials, spices, seasonings and other optional ingredient, recommended basic recipe was developed. With this basic recipe adjustment and modification was made and the first model MLK was suggested. And the improvement of MLK quality through the modification of processes was conducted.

The effect of Korean cabbage *kimchi*, mustard leaf *kimchi* and leek *kimchi* on inhibition of skin aging was studied *in vitro* as well as *in vivo*. The purpose of this study is to investigate morphologic changes on the skin of hairless mouse, free radical scavenging effect and suppression effect of UV-induced photooxidation when fed Baechu *kimchi*, mustard leaf *kimchi*, leek *kimchi* containing diet during 16wks. Also, antioxidant ability of each *kimchi* and cosmetic-related components of *kimchi* was investigated. The thickness of epidermis was thicker in *kimchi* fed groups than control group. Total collagen staining area was smaller in *kimchi* fed groups than control group, but RER(rough endoplasmic reticulum) activity of fibroblast was higher in the *kimchi* fed groups, especially highest in the mustard leaf *kimchi* fed groups. In the repression effect on photo-oxidation by UV irradiation, TBARS content and protein carbonyl value was lowest in the mustard leaf *kimchi* fed groups. Carotenoids, Ca, Cu and Se in mustard leaf *kimchi* were the most abundant compounds having an antioxidant property. Therefore *kimchi* consumption can retard skin aging due to the presence of compounds that have antioxidant properties. Specially mustard leaf *kimchi* was inhibitor of skin aging compared to other group. According to these results, mustard leaf *kimchi* was studied by adding sub-ingredients to improve the inhibited effect of skin aging. Selected sub-ingredients were green tea and pumpkin powder. Five kinds of mustard leaf *kimchi* having different ratios of pumpkin powder and green tea powder were investigated by measuring the antioxidant property and the changes of physicochemical, microbiological and sensory characteristics during fermentation. As result of these experiments, mustard leaf *kimchi* adding pumpkin powder(0.3%) and green tea powder(0.2%) was selected as final anti-aging A type mustard leaf *kimchi*.

Lipid lowering effect of Korean cabbage *kimchi* was observed from the animal

study. Male Sprague-Dawley fed *kimchi*-free diet or diet containing 3, 5, and 10% *kimchi* for 6 weeks showed decrease in the concentration of plasma and hepatic cholesterol and triglyceride compared to those of control dose dependently ($p < 0.05$). And LDL-C levels from *kimchi* diet groups were decreased whereas those of HDL-C increased ($p < 0.05$). The anti-atherogenic effects of *kimchi* ingredient such as Chinese cabbage, red pepper powder, garlic were studied in order to find out where the active component responsible for preventing arteriosclerosis presents. Rabbits were fed basal diet containing 1% cholesterol (control diet) or control diet either containing 8% Chinese cabbage, 1% red pepper powder, or 1% garlic by weight for 12 weeks. Plasma and hepatic lipid level was lowered in both red pepper and garlic fed group than control group. When the endothelium of aorta was seen under SEM, the condition of endothelium aorta in both red pepper and garlic fed group was kept intact as that in rabbit fed basal diet. And also *kimchi*, garlic, red pepper powder, and Chinese cabbage showed antioxidative effect against LDL oxidation *in vitro*. The isolation and identification of active principle for preventing arteriosclerosis was tried. Freeze-dried Korean cabbage *kimchi* was sequentially fractionated with different solvents. The atherogenic effects of solvent fractions of Korean cabbage *kimchi* were studied in rabbit before isolating and identifying the active principle. Experimental diet was prepared with 1% cholesterol, solvent fraction of *kimchi* of which amount was equivalent to 5% of freeze-dried *kimchi*. Dichloromethane fraction of *kimchi* showed a significant antiatherogenic effects, therefore further isolation and identification were continued with this fraction. Compound I is identified as β -sitosterol and compound II is under identifying.

The anti-aging effects of functional mustard leaf *kimchi* and Korean cabbage *kimchi* formulated based on the results obtained from the fundamental studies were carried with senescence accelerated mice (SAM p-8). Control diet (semi-purified AIN-76 diet), functional mustard leaf *kimchi*, Korean cabbage *kimchi*, functional Korean cabbage *kimchi* were fed to 240 SAM (each group has 50 SAM) for one year. Cholesterol and triglyceride in plasma and liver were found to be lowered in *kimchi* fed groups, especially from functional mustard and Korean cabbage *kimchi* group. And also HMG-CoA reductase activity were lowered in functional *kimchi* groups. The free radical, collagen, and lipofuscin level which are the aging index in the functional *kimchi* groups was lower than

those of control. To confirm this anti-atherogenic effect of the functional Korean cabbage *kimchi*, clinical trial was carried out *Kimchi* group, 7 people took 3g of pill containing freeze-dried functional Korean cabbage *kimchi* that is equivalent to 30g of *kimchi* and placebo group, 7 people took same amount of glutinous parched powder for 6 weeks. The plasma cholesterol, triglyceride, LDL-C and atherogenic index were decreased significantly compare to those of placebo group.

The consumer's field test was carried out to see how much the functional *kimchi* will have a success in the commercial market. Acceptance and preference for the functional mustard leaf *kimchi* made according to Type A recipe (mustard leaf 100g, garlic 3g, ginger 1.5g, green onion 5.5g, red pepper powder, 3.9g, pear juice 22.5g, roasted sesame 0.3g, glutinous rice paste 8g, fermented anchovy juice 2.6g, carrot 1g, shredded red pepper 1g, pumpkin powder 0.3g, green tea powder 0.2g) were carried out with 122 consumers. The sensory scores of functional mustard leaf *kimchi* adding pumpkin powder(0.3%) and green tea powder(0.2%) were higher than those of control mustard leaf *kimchi*. And also functional Korean cabbage *kimchi* prepared by type B recipe (Brined Chinese cabbage 70g, brined mustard leaf 30g, red pepper powder 4g, garlic 3.7g, fermented shrimp juice 2.3g, fermented kanari juice 2.3g, glutinous rice paste 1.3g, sugar 1g, shrimp stock 4.3g) were carried out with 240 consumers for the field test. The one who was willing to buy the functional Korean cabbage *kimchi* was 79.58% since scientific evidence in terms of anti-atherogenesis of this *kimchi* is clear enough to trust(63.75%). And 66.25% consumers answered the taste of functional Korean cabbage *kimchi* is better than control Korean cabbage *kimchi*.

CONTENTS

Part I .

Chapter 1. Introduction	39
Section 1. Purpose and scope of project	39
Section 2. Content and background of project	41
1. Content of project	41
Chapter 2. Development of Cancer Preventive Functional Kimchi	47
Section 1. Introduction	47
Section 2. Materials and Methods	48
1. Preparation of chinese cabbage kimchi(called "kimchi") and leek kimchi	48
2. Extraction and identification of antimutagenic active compound of kimchi	49
3. Extraction and identification of antimutagenic active compound of dichloromethane fr. from leek kimchi	50
4. Experimental methods	51
5. Statistical analysis	58
Section 3. Results and Discussion	59
1. Cancer preventive effect of kimchi	59
2. Standardization of kimchi and its cancer preventive effect	63
3. Enhanced cancer preventive effect of kimchi	68
4. Development of cancer preventive functional leek kimchi	123
Section 4. Conclusion	138
Section 5. References	139
Chapter 3. Development of Anticancer Functional Kimchi	142
Section 1. Introduction	142
Section 2. Materials and Methods	143
1. Kimchi ingredients and preparation of kimchi	143
2. Experiments for anticancer effect	143
3. Research and experiment for marketing of kimchi	153

Section 3. Results and Discussion	154
1. Anticancer effect of kimchi	154
2. Identification of anticancer active compound of the standardized kimchi and its anticancer mechanisms	162
3. Enhanced anticancer effect of kimchi	169
4. Anticancer effects of green tea leaf added kimchi	208
5. Anticancer effects of cancer preventive functional leek kimchi	210
Section 4. Conclusion	217
Section 5. References	219
Chapter 4. Characteristics of salts and safety of salt-fermented anchovy, and development of cancer preventive functional salt	222
Section 1. Introduction	222
Section 2. Materials and Methods	223
1. Materials and sample preparation	223
2. Experimental methods	223
Section 3. Results and Discussion	228
1. Chemical and physical characteristics of salt types	228
2. Safety of salt-fermented anchovy	242
3. Development of antimutagenic/anticarcinogenic functional kimchi	251
4. Development of low-salt kimchi	263
5. Development of cancer preventive functional KCl-mixed bamboo salt	281
Section 4. Conclusion	294
Section 5. References	295

Part II.

Chapter 5 Development of <i>kimchi</i> having antioxidant properties	299
Section 1. Introduction	299
Section 2. Material and Methods	299
1. Material and reagent	299
2. Mustard leaf <i>kimchi</i> preparation	300
3. Studies on the characteristics of antioxidative	

and antiaging <i>kimchi</i>	303
4. Antioxidant mechanism of mustard leaf <i>kimchi</i> and isolation of antioxidant, antiaging compound in mustard leaf <i>kimchi</i>	308
Section 3. Results and discussion	311
1. Mustard leaf <i>kimchi</i> and its antioxidant effects	311
2. Antioxidative characteristics of mustard leaf <i>kimchi</i>	314
3. Antioxidant property and compounds in mustard leaf <i>kimchi</i>	318
4. Formulation of functional <i>kimchi</i> recipe having antioxidative and antiaging effects and improvement of <i>kimchi</i> quality	329
Section 4. Conclusions	342
1. Antioxidant characteristics of mustard leaf <i>kimchi</i>	342
2. Antioxidants in mustard leaf <i>kimchi</i>	343
3. Isolation and identification of active compounds responsible for antioxidant effect in mustard leaf <i>kimchi</i>	343
4. Formulation of functional mustard leaf <i>kimchi</i> recipe and improvement of its quality	343
Section 5. References	344
 Chapter 6. Development of <i>kimchi</i> having retarding effects against skin aging	348
Section 1. Introduction	348
Section 2. Material and method	349
1. Material	351
2. Methods	351
Section 3. Results and Discussion	363
1. The protective effects of <i>kimchi</i> extracts on skin damage by active oxygen species	363
2. The protective effects of extracts of <i>kimchi</i> ingredients on skin damage by active oxygen species	369
3. The protective effects of extracts of <i>kimchi</i> or its ingredients on skin damage from ultra violet exposure	375
4. The compounds having antiaging property in the <i>kimchi</i> or its ingredients	379
5. The retarding effects of <i>kimchi</i> diet on skin aging of hairless mouse	383

6. Inhibition of oxidation and scavenging effects of active oxygen species in hairless mouse fed <i>kimchi</i> diet	392
Section 4. Conclusion	407
Section 5. References	408
 Chapter 7. Antiatherogenic Korean cabbage <i>kimchi</i> development	410
Section 1. Introduction	410
Section 2. Material and Method	410
1. Preventive effects of Korean cabbage <i>kimchi</i> on arteriosclerosis in rats	410
2. Antiatherogenic effects of Korean cabbage <i>kimchi</i> in rabbits	413
3. Antioxidant effects of water or lipid soluble fractions of Korean cabbage <i>kimchi</i> against LDL oxidation	417
4. The antioxidant effects of solvent fraction of Korean cabbage <i>kimchi</i> against LDL oxidation	418
5. Isolation and identification of active principle in Korean cabbage <i>kimchi</i>	418
Section 3. Results and Discussion	420
1. The preventive effects of <i>kimchi</i> on arteriosclerosis in rats	420
2. The effects of <i>kimchi</i> on hematological parameters and fibrinolytic activity in rats	423
3. The effects of Korean cabbage <i>kimchi</i> on immune function in cell culture system	425
4. The fibrinolytic activity of Korean cabbage <i>kimchi</i> and its ingredients	427
5. Antioxidant effects of water or lipid soluble fractions of Korean cabbage <i>kimchi</i> against LDL oxidation	429
6. Isolation and identification of active principle in Korean cabbage <i>kimch</i>	441
7. Antiatherogenic effects of solvent fractions of Korean cabbage <i>kimchi</i> in rabbit	445
8. Formulation of functional Korean cabbage <i>kimchi</i> recipe	448
 Chapter 8. Antiaging effects of functional <i>kimchi</i> from animal study and clinical trial	463

Section 1. Introduction	466
Section 2. Material and Method	467
1. Studies on the antiaging functional <i>kimchi</i>	474
2. Lipid lowering effects of anti-aging functional <i>kimchi</i>	477
3. Analysis of antiaging indexes of functional <i>kimchi</i>	477
Section 3. Results and Discussion	480
1. Lipid lowering effects of type A1 antiaging <i>kimchi</i> (mustard leaf <i>kimchi</i>) and its preventive effects against skin aging in SAM	480
2. Antiatherogenic effects of type B antiaging <i>kimchi</i> (Korean cabbage <i>kimchi</i>) in SAM	491
3. Antiatherogenic effects of type B antiaging <i>kimchi</i> (Korean cabbage <i>kimchi</i>) from clinical trial	506
Section 4. Results and Discussion	514
Section 5. References	515
Chapter 9. Functional <i>kimchi</i> preparation having anti-aging property and its commercialization	519
Section 1. Introduction	519
Section 2. Fomulation of type A1 antiaging <i>kimchi</i> and industrialization	519
Section 3. Fomulation of Type AII anti-aging <i>kimchi</i> and industrialization	523
1. Preparation of anti-aging functional <i>kimchi</i> focused on retardation of skin aging	527
2. Improvement of <i>kimchi</i> preparation process for commercialization ..	542
Section 4. Formulation of type B anti-aging <i>kimchi</i> focused on antiatherogenic effects and industrialization	542
1. Preparation of Korean cabbage <i>kimchi</i> having antiatherogenic effects	553
2. Improvement of Korean cabbage <i>kimchi</i> preparation process for commercialization	554
3. Consumer's field test	557

목 차

요 약 문	1
I. 제 목	1
II. 연구개발의 목적 및 중요성	1
III. 연구개발 내용 및 범위	3
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	6
1. 연구개발 결과	6
SUMMARY	14
CONTENTS	21
목 차	26
제 1장 서 론	39
제 1절 연구개발의 목적과 범위	39
제 2절 연구개발의 내용과 배경	41
1. 연구 개발 내용	41
제 2장 암예방 김치무리의 개발 분야	47
제 1절 서 설	47
제 2절 재료 및 방법	48
1. 배추김치와 부추김치의 제조	48
가. 표준화 배추김치의 재료 및 담금방법	48
나. 부재료 첨가에 의한 암예방 증진 배추김치	48
다. 발효온도에 의한 배추김치의 기능성 증진 효과	48
라. 표준화 부추김치의 재료 및 담금방법	48
마. 부재료 첨가에 의한 암예방 증진 부추김치 제조	49
바. 메탄올추출물의 조제	49
2. 배추김치의 항돌연변이 물질의 추출 및 분리 동정	49
가. 추출 및 분획	49
나. Dichloromethane fr.의 항돌연변이와 항암 물질의 추출 및 분리 동정	49
3. 부추김치 Dichloromethane fr.의 항돌연변이와 항암 물질의 추출	

및 분리 동정	50
가. Silica gel column chromatography에 의한 활성 물질의 분리	50
나. Thin layer chromatography를 이용한 정성	51
다. GC-MS에 의한 활성성분의 분석과 동정	51
4. 김치의 관능검사 및 이화학적 실험	51
가. 반복화된 randomized block design에 의한 관능검사	51
나. 이화학적 실험	52
다. 영양·기능성물질 정량	53
라. 항돌연변이 실험	54
마. C3H/10T1/2 cell에서 암화억제 실험(<i>in vitro</i> 항발암실험)	55
바. GST-P 양성병소 foci측정(<i>in vivo</i> 항발암실험)	56
사. 말초혈의 망상적혈구를 이용한 <i>in vivo</i> 초생체염색 소핵실험	57
아. 종양전이억제 실험	57
5. 통계 분석	58
제 3절 결과 및 고찰	59
1. 배추김치의 암예방효과 측정	59
가. Ames 실험법을 이용한 김치의 항돌연변이 효과	59
나. <i>Drosophila melanogaster</i> 를 이용한 항돌연변이 효과	59
다. C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제 및 항발암효과	59
라. 유산균의 항돌연변이효과	60
2. 배추김치의 표준화와 표준화된 배추김치의 암예방효과	63
가. 배추김치의 표준화 연구	63
나. 표준화된 배추김치의 분획물의 암예방효과와 활성물질 동정	66
3. 배추김치의 암예방효과 증진 연구	68
가. 배추김치재료와 비율조절에 의한 암예방증진 연구	68
나. 배추김치 발효방법에 의한 암예방 증진 연구	90
다. 암예방 배추김치의 개발	97
라. 맛을 증진시킨 암예방 배추김치의 제조 및 유통 연구	103
마. 녹차 첨가 배추김치의 개발	117
4. 암예방 부추김치의 개발	122
가. 부추김치의 표준화 연구	122
나. 부추김치의 암예방 효과	126
다. 부추김치에서 항돌연변이 활성물질 동정	128
라. 부추김치의 암예방증진효과 연구	132
마. 부추김치의 포장 유통실험	134

제 4절 결론	138
제 5절 참고문헌	139
제 3장 항암김치무리의 개발 분야	142
제 1절 서설	142
제 2절 재료 및 방법	143
1. 김치 재료 및 제조	143
2. 항암실험	143
가. 인체 암세포에서의 항암실험	143
나. 항암물질 분리 동정	145
다. 분자수준에서의 항암기작 연구	145
라. <i>In vivo</i> 항암실험	148
마. 면역효과 증강실험	152
3. 상품화 및 산업화연구	153
가. 포장유통연구	153
나. 소비자 기호도 조사	153
다. 상품화 및 산업화	153
제 3절 결과 및 고찰	154
1. 배추김치의 항암효과 측정	154
가. 인체 암세포에서의 <i>in vitro</i> 항암효과	154
나. 유선상피세포의 성장과 분화에 있어 김치추출물의 영향	155
다. <i>in vivo</i> 에서 김치추출물의 항암효과	156
라. 면역 활성화 증강 효과	161
2. 표준화된 배추김치(제 2장 참조)의 항암활성물질 동정 및 항암기작 연구	162
가. 배추김치 분획물의 암세포증식억제효과	162
나. 배추김치 디클로메탄 분획물의 apoptosis 유도효과와 cell cycle에서 G2/M phase 저해효과	163
다. 배추김치 추출물의 oncogene(Ha-ras) 발현 억제효과	165
라. 표준화 배추김치로부터 항암물질의 추출 및 분리동정	166
마. 활성 물질로 동정된 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 <i>in vitro</i> 항암효과	167
3. 배추김치의 항암효과 증진 연구	169
가. 배추종류	169
나. 양념류 첨가 암예방 배추김치의 항암효과 확인 연구	174

다. 암예방(항암) 기능성김치 I의 면역증강효과	180
라. 암예방/항암 기능성김치 II의 <i>in vivo</i> 항암활성 및 조직학적 변화 연구	192
마. 고춧가루를 조절한 암예방 김치 제조: 소비자 기호도 조사	196
바. 암환자 설문조사 및 암환자 김치 개발	198
사. 항암 배추김치의 제조 및 유통 연구	206
4. 녹차첨가김치(암예방 기능성 김치 VI)의 항암활성 측정	208
가. 녹차첨가 배추김치의 <i>in vitro</i> 항암성 증진효과	208
나. 녹차첨가 배추김치의 <i>in vivo</i> 항암성 증진 효과	208
5. 암예방 부추김치의 항암활성 측정	210
가. 암예방 부추김치추출물의 항암효과 및 항암물질의 분리, 동정 연구	210
나. 부추김치의 항암성 증진 연구	214
제 4절 결론	217
제 5절 참고문헌	219
제 4장 소금의 특성, 젓갈의 안전성, 저염김치 개발 및 암예방 소금 김치개발	222
제 1 절 서설	222
제 2절 재료 및 방법	223
1. 시료	223
가. 소금	223
나. 멸치젓갈	223
2. 실험방법	223
가. 무기질 정량	223
나. 소금과 젓갈의 mutagenicity/carcinogenicity 측정	224
다. C3H/10T1/2 세포를 이용한 NaCl의 발암효과 실험	224
라. 항고혈압 활성 측정실험	225
마. 이화학적실험	226
바. 관능 검사	226
사. 다른 소금으로 제조된 김치 및 식탁용 소금의 <i>in vivo</i> 항암실험	227
제 3절 결과 및 고찰	228
1. 소금종류별 화학적 및 생리적 특성	228
가. 소금의 무기질 함량 측정	228
나. 소금의 항균성, 돌연변이, 과산화촉진 및 암세포성장 억제와 소핵실험	234
2. 젓갈의 안전성 연구	242

가. Ames 실험계에서 멸치젓추출물의 돌연변이 및 보돌연변이 유발효과	243
나. SOS Chromotest	245
다. 젓갈의 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제 및 항발암효과	248
라. <i>In vivo Drosophila wing test</i> 에서 멸치젓갈의 보/항돌연변이 효과	248
3. 소금을 이용한 암예방/항암김치 개발	251
가. 배추 연절임 특성 및 염도, 무기질 변화	251
나. 소금종류별로 제조한 김치의 특성	256
4. 저염김치 개발	263
가. 초피 첨가김치의 개발	263
나. 다시마 첨가김치의 개발	264
다. KCl 대체 암예방증진 김치 개발	268
5. 암예방성 KCl 혼합숙염개발	281
가. KCl 혼합숙염의 돌연변이 유발 촉진/억제 효과	281
나. KCl 혼합숙염이 고행암의 성장과 면역활성 및 지질과산화에 미치는 영향(I)	283
다. KCl 혼합숙염이 고행암의 성장과 자연살해세포의 면역활성 및 지질과산화에 미치는 영향(II)	287
라. KCl 혼합 숙염을 이용한 배추김치의 항돌연변이 및 <i>in vitro</i> 항암성 증진효과	290
제 4절 결론	294
제 5절 참고문헌	295
제5장 항산화성 김치 무리의 개발	299
제 1 절 서설	299
제 2 절 재료 및 방법	299
1. 실험재료 및 시약	299
가. 갓	299
나. 갓김치의 부재료	300
다. 시약	300
2. 항산화성 갓김치의 설정	300
가. 갓김치 시료의 이화학적 실험	300
나. 관능 검사	302
다. 갓김치의 항산화 실험	302
라. 갓김치의 담금과 발효 그리고 조정	303

3. 향산화항노화 김치의 특성 연구	303
가. 갓김치에 함유된 향산화물질의 분석	304
나. 갓김치의 일반적인 향산화특성	305
4. 갓김치의 향산화기전 탐색 및 향산화항노화 기능성물질 연구	305
가. 향산화기능성 flavonoids의 분리 및 확인	305
나. 적갓 기능성 anthocyanins의 분리 및 확인	306
다. 분리 획득의 기능성 검토	306
5. 향산화항노화 기능성 김치의 개발 및 품질개선	308
가. 갓김치 담금법 개선 및 레시피 선정	308
6. 통계처리	308
제 3 절 결과 및 고찰	311
1. 향산화성 갓김치의 설정 및 향산화성	311
가. 가열우육 지방질의 산화에 대한 갓김치의 향산화성	311
나. 가열우육에 대한 발효기간이 다른 갓김치의 첨가농도별 향산화성	312
다. 갓김치에서 chlorophylls와 carotenoids(CCC) 분석의 향산화성	312
라. 생체모델에서의 향산화 활성	312
마. 유효 성분의 향산화 작용	313
2. 갓김치의 향산화특성	314
가. 갓김치에 함유된 향산화물질의 분석	314
나. 갓김치의 일반적인 향산화특성	315
3. 갓김치의 향산화성과 향산화물질	318
가. 적갓 김치의 발효특성 및 천연 향산화물질 분석	318
나. 청갓 김치의 발효특성 및 향산화물질 특성	322
다. 향산화기능성 flavonoids의 분리 및 확인	324
라. 적갓 기능성 anthocyanins의 분리 및 확인	326
4. 향산화항노화기능성김치의 개발 및 품질개선	327
가. 향산화항노화기능성 김치(A-I형) 1차 조제	330
나. 갓김치 담금법에 따른 발효양상 및 주요 성분의 변화	338
다. 관능검사	341
라. 1차 모델 recipe의 선정	342
제 4 절 결론	342
1. 향산화성 갓김치와 향산화 특성	342
2. 김치의 향산화성 물질의 분석	343
3. 갓김치의 향산화 물질의 분리와 동정	343
4. 향산화 항노화 김치의 개발 및 품질개선	343

제 5 절 참고문헌	344
제6장 미용증진을 위한 기능성 김치무리의 개발	348
제 1 절 서설	348
제 2 절 재료 및 방법	349
1. 실험재료	349
가. 김치 원부재료	349
나. 김치재료의 선정 및 시료김치	349
다. 사용 세포주	351
라. 시약	351
2. 실험방법	351
가. 김치 원부재료의 추출	351
나. 세포배양 및 세포생육 억제 활성	351
다. 동물실험	352
제 3 절 결과 및 고찰	363
1. 김치 추출물의 활성산소에 대한 독성 완화효과	363
2. 김치 재료 추출물의 활성산소에 대한 독성 완화효과	369
3. 김치 및 김치 재료 추출물의 UVB에 대한 독성 완화효과	375
4. 김치 및 김치 재료 중의 피부노화 관련 성분의 함량	378
가. Chlorophyll 함량	378
나. 총 비타민 C 및 carotenoids	379
다. 총 페놀 함량	380
라. 무기질 함량	381
5. 김치첨가 식이가 hairless mouse의 피부에 미치는 영향	383
가. 실험동물의 체중 및 장기 무게 변화	383
나. 피부의 표피 및 진피에 미치는 영향	385
6. 김치 식이 섭취에 의한 산화 억제 효과 및 활성산소 소거 효과	392
가. 김치 식이의 산화 억제 효과	392
7. 김치용매획분의 피부노화 억제 효과	398
가. 김치 용매획분 중의 피부노화 관련 성분 함량	398
나. 김치 메탄올 추출물의 항산화성	400
다. 김치 용매획분의 광산화 억제효과	403
라. 김치 용매획분 크림의 동물도포후 UV 조사에 의한 흥반억제효과	405
제 4 절 결론	407
제 5 절 참고문헌	408

제7장 항동맥경화성 김치무리의 개발	410
제 1 절 서 설	410
제 2 절 재료 및 방법	410
1. 김치섭취가 흰쥐의 동맥경화 예방에 미치는 영향	410
가. 실험동물의 사육 및 식이제조	410
나. 실험동물의 처리 및 시료수집	410
다. 혈장과 지단백 획득의 분리	411
라. 혈장 및 지단백의 지질성분 분석	412
마. 혈액의 성상	412
바. Cell culture를 이용한 면역기능 연구	412
사. 혈액의 fibrin 용해능 조사	413
2. 김치재료가 토끼의 동맥경화 예방에 미치는 영향	413
가. 간의 지방 정량	413
나. CCK(Cholecystokinin)농도 측정	414
다. CETP 활성 측정	414
라. Microsomal HMG-CoA reductase 활성 측정	415
마. 김치부재료 투여가 apolipoprotein 농도에 미치는 영향	415
바. 동맥조직의 지방침착도 측정	415
사. 항산화효소계 측정	416
아. 담즙 및 콜레스테롤 흡수에 미치는 영향	417
3. 김치의 수용성 및 지용성 성분의 LDL에 대한 항산화성	417
가. <i>In vitro</i> 상에서 항산화력 측정	417
나. Bovine endothelial cell culture	418
4. 김치의 활성획분의 분리 및 LDL에 대한 항산화성 측정	418
5. 배추의 동맥경화 예방 활성물질의 분리 및 활성획분 확인	418
가. 간의 인지질 지방산 조성 분석	418
나. 과산화물 측정	419
다. LDL 산화능 측정	419
제 3 절 결과 및 고찰	420
1. 김치섭취가 흰쥐의 동맥경화 예방에 미치는 효과	420
가. 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율	420
나. 혈장의 지질 및 단백질 함량	420
다. 혈액의 thyroxine 농도	421
라. 간의 지질 및 단백질 함량	421

마. 간의 apolipoprotein 함량	422
바. 분변의 지질 함량	422
사. HMG-CoA reductase 활성	423
2. 김치가 혈액성상과 혈전용해능에 미치는 영향	423
가. 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율	423
나. 혈액 성상	424
3. 김치가 <i>in vitro</i> 에서 생쥐의 면역활성에 미치는 영향	425
가. 생쥐의 비장세포 배양에 미치는 영향	425
나. 생쥐의 골수세포배양에 미치는 영향	426
다. 생쥐의 흉선세포의 배양에 미치는 영향	426
4. 김치와 김치부재료 추출물의 fibrin 분해능	427
가. <i>In vivo</i> 상에서의 fibrin 분해능	427
나. <i>In vitro</i> 상에서의 fibrin 분해능	427
5. 김치부재료의 섭취에 따른 토끼의 항동맥경화 효과에 관한 연구	429
가. 기간별 혈중콜레스테롤의 농도변화	429
나. 기간별 혈중 중성지방 농도변화	429
다. 혈장에 있어서 동맥경화 관련 요인에 대한 김치 재료의 효과	430
라. 간의 지질 농도 변화에 대한 김치재료의 효과	430
마. 김치 재료를 섭취한 토끼의 대동맥(Aorta)의 콜레스테롤, 중성지방, 총지방함량	435
바. 분변의 콜레스테롤, 중성지방 및 총지방함량	436
사. 김치재료의 섭취가 토끼의 지질 과산화에 미치는 영향	436
아. 김치재료 섭취가 토끼간의 항산화계 효소 및 항산화 영양소에 미치는 효과	438
5. 김치의 수용성 및 지용성 성분의 LDL 산화억제 효과	441
가. Cell free system에서의 김치 추출물의 LDL 산화억제 효과	441
나. Bovine aorta endothelial cell culture system에서 세포 매개성 LDL 산화에 대한 김치추출물의 산화억제 효과	443
6. 배추의 동맥경화 예방 활성물질의 분리 및 활성획분 확인	445
7. 김치용매 획분의 동맥경화 예방효과	447
가. 김치의 활성 용매 획분이 토끼의 혈중 지질 조성에 미치는 영향	447
나. 김치의 용매획분이 간과 분변의 지질조성에 미치는 영향	454
다. 배추김치로부터 동맥경화 예방 물질의 분리	461
8. 항동맥경화 배추김치의 조제	463
제 4 절 결론	466

제 5 절 참고문헌	467
제8장 항노화기능성 김치의 동물성 실험 및 임상연구	474
제 1 절 서설	474
제 2 절 재료 및 방법	474
1. 기능성 김치무리의 항노화성에 관한 연구	474
가. 항노화 기능성이 강조된 김치 무리의 recipe 선정	474
나. 실험용 김치의 발효특성 및 일반성분	475
다. 실험동물 사육	475
라. 동물실험 계획	476
2. 항노화성 김치의 혈중 지질저하 효과	477
가. 임상실험용 시료의 제조	477
나. 2차 임상 실험 대상자 선정	478
3. 항노화지표의 분석	480
제 3 절 결과 및 고찰	480
1. SAM에 있어서 항노화 A I 형 김치의 지질저하 및 피부노화 억제효과	480
가. 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율	480
나. 혈장의 지질농도	480
다. 장기의 콜레스테롤 농도	481
라. 장기의 중성지방 농도	482
마. 장기의 과산화물 함량	482
바. 항산화효소계 측정	483
사. 피부의 노화에 미치는 영향	484
아. Collagen 농도의 변화	488
자. 총활성산소 농도의 변화	489
차. 고환의 노화억제에 미치는 영향	489
카. 안구에서의 lipofuscin농도 변화	491
2. SAM에 있어서 항노화성김치(B형, 항동맥경화성 김치)의 동맥경화 예방 효과	491
가. 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율	492
나. 혈장의 지질농도	492
다. 장기의 콜레스테롤 농도	493
라. 장기의 중성지방 농도	494
마. 장기의 과산화물 함량	494
바. HMG-CoA reductase 활성	495

사. 항산화효소계 측정	495
아. 피부의 노화에 미치는 영향	498
자. Collagen 농도의 변화	502
차. 총활성산소 농도의 변화	503
카. 고환의 노화억제에 미치는 영향	504
타. 안구에서의 lipofuscin농도 변화	506
3. 2차 항노화성 김치(B형, 향동맥경화성 김치)의 임상실험결과	506
가. 실험대상자의 특성 및 생활습관	506
나. 중성지방 농도	511
다. 총 콜레스테롤	512
라. HDL 콜레스테롤	512
마. LDL 콜레스테롤	513
바. 동맥경화 관련지수	513
사. 혈전 용해능에 미치는 영향	514
제 4 절 결론	514
제 5 절 참고문헌	515
제9장 항노화 기능성 김치의 제조 및 산업화 연구	518
제 1 절 서설	518
제 2 절 항노화 AI형 김치의 개발 및 산업화연구	518
1. 항노화항산화 기능성김치의 제조방법	519
가. 항산화기능성 김치의 공정개선연구	519
나. 항노화 AI형 갓김치의 맛과 품질개선	520
2. 항산화 AI형 갓김치의 공정개선 연구	522
가. 주재료의 전처리에 의한 절임 비교	522
나. 절임방법개선	522
다. 갓김치 절임온도 개선	524
라. 절임 후 탈수시간 비교	525
마. 포장에 따른 발효 양상	526
제 3 절 항노화 AII형 갓김치 개발 및 산업화연구	527
1. 항노화 AII형 갓김치의 피부 미용성 증진 김치 개발	527
가. 항노화 AII형 갓김치의 피부 미용성 증진을 위한 부재료 조정연구	527
나. 항노화 A II형 갓김치의 상품화를 위한 맛 및 보존성 연구	535
2. 항노화 AII type 갓김치의 최종 상품화 및 산업화 연구	542
가. 담금 공정의 개선	542

제 4 절 항노화 B type 김치(항동맥경화성 김치) 개발	554
1. 레시피의 개발	554
2. 산업화를 위한 담금공정의 개발	555
3. 소비자 기호도 결과	556
제 5 절 결론	558
제 6 절 참고문헌	558

여 백

제 1장 서론

제 1절 연구개발의 목적과 범위

본 연구 개발의 목적은 김치를 과학적으로 연구하여 건강 기능성과 관련한 안전성 연구와 김치의 기능성을 확인 증진 시키므로 전통 김치를 현대화 및 세계화를 하는 기초 작업을 하는데 있다.

김치는 전통적으로 한국을 대표하는 식품이며 선조들이 긴 겨울을 위해 과학적인 견해, 경험 및 지혜로 제조된 전통 발효 식품인데 그의 우수성에 대한 과학적 연구가 부족해 왔었다. 한편 한국인에게 많이 발생하는 위암 또는 뇌졸중, 고혈압등이 짜고 매운 김치 섭취 때문이라는 말들도 있었다. 즉 김치 재료중 사용되는 소금, 고춧가루, 젓갈, NO₂, NO₃, 니트로소아민등은 부정적으로 작용하여 건강에 불리하게 작용 할 것이라는 우려가 있었다. 그러나 김치의 재료는 녹황색 채소로 여러 phytochemicals, 식이섬유소, 발효중 생성되는 유산균등은 오히려 항암, 항노화 기능을 가지리라고 추측된다. 이러한 상반되는 의견을 과학적으로 접근하여 측정, 확인하고 더욱이 문제가 되는 점을 개선 발전 시키므로 김치가 가지고 있는 우수한 기능성을 보완 증진시키고 반면 문제가 될 수 있는 것들은 과학적인 접근을 통해 문제점과 개선점을 찾아 내므로 김치를 최고의 의약 식품, 기능성 식품을 만드는데 목적이 있다.

이 연구에서는 김치의 기능성 중 문제가 될 수 있는 암과의 관계 연구와 항산화 활성을 갖는 채소의 기능을 증진시키는 항노화 관계의 기능을 높이는 김치를 만들고자 하였다.

구체적으로 제 1 세부 연구에서는 항암 기능성 김치의 개발이 목적이라 할 수 있다. 제 1세세부에서는 암예방 기능성 김치를 개발하여 일반 건강인이 김치 섭취시 소금, 고춧가루, 젓갈 등을 고려하여 암예방 활성이 연구 확인된 제품을 김치로 개발한다.

김치의 주재료, 부재료, 암예방 기능성 양념류를 이용한 활성 증진 연구와 발효 방법중 발효온도, 유통 용기에서의 암예방 활성 증진과 소금, 고춧가루, 부재료 등을 이용하여 암예방 김치 무리(배추김치, 부추김치)를 개발한다. 제 2 세세부에서는 암환자도 섭취할 수 있는 항암 기능성 김치의 개발이 목표이다. 역시 항암 활성을 증진시키기 위해 암예방 김치 개발과 같은 방법을 사용하고 활성 물질동정 및 김치의 항암 기작등을 연구한다. 항암활성이 있는 김치를 개발하여 실제 암환자들이 또는 건강을 걱정하는 사람들이 섭취할 수 있는 김치를 개발한다. 제 3 세세부는 김치 제조시 사용되는 소금의 특성, 젓갈의 안전성, 저염 김치 개발 및 암예방 소금(KCl혼합 죽염)을 개발하여 식탁용 소금 및 김치 제조시 항암효과를 증진시킬 수 있는 소금을 개발한다.

제 2 세부에서는 김치와 김치의 재료가 가지는 항노화성을 연구하고, 항노화 기능을 가지는 김치 무리를 개발함에 그 목적이 있다. 즉, 김치는 녹색 채소류가 주를 이루는 재료이므로 항노화성 기능이 매우 우수한 것으로 예측될 수 있으나, 김치의 항산화성, 동맥경화 예방성 및 미용증진 효과나 그 기작에 대한 연구 및 이러한 기능성을 지닌 김치의 개발은 시도되지 않았다. 이에 김치의 항노화 기능성을 밝히고 항산화성이 높은 부재료를 첨가하여 기능이 증진된 항노화 기능성 김치를 개발할 필요가 있다. 김치의 기능성 증진은 김치를 좋아하고 상식으로 하는 우리 국민의 건강을 보장하기 위해서도 매우 중요할 뿐만 아니라 국가적으로도 우리의 우수한 전통 식품이 과학화되고 기능이 향상됨으로서 세계적으로 각광받는 식품으로 개선되어 그의 요구도와 수출 증대가 이루어 질 수 있다.

그러므로 제 2 세부의 1 세세부에서는 김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되어, 김치의 항산화성 물질을 분리조사하고 활성물질을 찾은 후 이 물질의 생성경로를 추적하여 항산화성 김치를 개발한다. 이때 김치의 항산화성을 증진시킬 수 있는 부재료를 첨가하여 기능성 강화 김치를 제조한다. 제 2 세세부에서는 김치에 풍부하게 함유되어 있는 항산화 물질들이 활성산소를 소거하고 피부의 노화를 억제해 줄 것으로 기대되며, 특히 일본에서는 김치가 피부 미용에 좋다고 하여 젊은 여성들 사이에 인기라고 하나 그에 관한 연구는 전무한 상태이다. 이에 김치의 미용효과를 증진시킬 수 있는 항산화 비타민 및 기타 활성 물질의 활성 기전을 규명하고 건강한 피부를 유지할 수 있는 미용성 증진 기능성 김치를 개발한다. 제 3 세세부에서는 한국인은 심혈관계질환의 발병율이 서구인에 비해 낮은 편이고, 이는 한국인의 항산화성 식이, 특히 한국인이 항상 김치를 섭취하고 있기 때문이라는 사실에 기초하여 동맥경화를 예방할 수 있는 기능성 배추김치를 개발하고자 한다. 즉, 김치의 항동맥경화 예방효과를 가지는 물질을 알아내고 김치의 재료중 어느 성분이 이러한 효과를 지니고 있는지 검토하여 이들을 강화한 김치를 개발한다. 또한 생체를 이용한 *in vivo* 실험에서도 김치의 항산화 항노화성, 항동맥경화성 및 미용성 증진 효과를 확인하고, 이러한 기능이 증진된 김치를 산업화하는데 필요한 기초 실험을 한다.

제 2절 연구개발의 내용과 배경

1. 연구 개발 내용

본 연구에서는 항암 및 항노화 기능성 김치무리를 개발하는데 그 연구 개발 분야는 두 분야로 제 1 세부는 3가지 세세부로 구별되는데 제 1 세세부에서는 김치의 암예방 효과를 연구하고 암발생과 암예방과 관련된 연구를 하여 김치의 암예방 효과를 증진 시키 결국 암예방 하는 김치를 제조하도록 한다. 우리나라도 암발생이 크게 증가되어 4~5명중 한 사람이 암으로 사망하고 있으며 특히 위암 발생율이 높다. 김치내에는 소금, 고춧가루, NO₂, NO₃, 니트로소아민등으로 위암 발생의 원인이 될 수 있는 요인도 있기에 이에 대한 과학적 원인 연구는 매우 중요하다고 하겠다.

본 연구실에서는 김치에서 NO₂, NO₃, 니트로소아민등은 문제가 없으며 소금이 보돌 연변이(보발암성)이 있음을 연구한 바 있다. 고춧가루도 발암에 문제가 되지 않으며 오히려 다이어트효과가 있음이 밝혀지고 있다. 제 1 세세부에서는 기존 김치의 암예방 효과를 측정 확인하고 암을 예방하는 기능을 가진 김치를 개발 하기 위해 먼저 표준화를 한다. 이 김치를 기초로 주재료, 부재료, 양념 등의 암예방 효과를 측정하여 암예방 효과가 유리한 재료를 선택한다. 발효방법중 온도와 용기에 따른 김치발효의 특성과 암예방 기능성을 측정하여 암예방 증진효과를 가지는 김치를 개발한다. 특히 소금과 고춧가루를 연구하여 암예방 효과가 좋은 김치를 연구한다. 이 기능성 김치의 제품화를 위해 맛 증진 효과, 유통조건 연구 등을 통해 최종의 암예방 기능성 김치를 개발한다.

제 2세세부에서는 김치의 항암효과를 측정하고 생체실험을 이용하여 김치의 항암성 증진효과를 연구한다. 연구방법은 제 1세세부와 같이 재료 종류 및 레시피, 양념첨가, 발효방법등을 이용하여 항암성을 증진시킨다. 김치의 항암 활성 물질을 동정하고 분자수준에서의 항암 기작을 연구한다. 소금, 젓갈, 고춧가루 등을 조절하여 암환자가 섭취할수 있는 항암 김치를 제조한다.

제 3세세부에서는 김치에서 암과 관련이 가장 크게 연구되었던 소금에 대한 연구로, 국내 시판 소금 종류의 특성연구와 건강과의 관계를 연구한다. 여러 가지 소금을 이용하여 김치 제조시의 특성과 그 김치의 암예방/항암성을 측정하며 김치에 소금원 중 하나인 젓갈의 안전성을 연구한다. 또한 소금 섭취를 줄이기 위해 저염 김치도 개발 하며 무엇보다도 국내 소금종류를 이용하여 암예방 효과가 좋은 소금을 개발하고 그 소금을 이용하여 김치의 암예방 또는 항암성을 증진시키는 연구를 하며 즉, 총괄적으로 제 1 세부는 김치와 관련된 암발생에 대한 안전성과 김치의 항암 기능성을 증진시키기 위해 김치의 재료 및 발효 방법등을 이용하여 항암 기능성 김치를 개발한다.

제 2세부 역시 3가지 세세부로 구성되며, 제 2세부의 1 세세부에서는 항산화성 김치

무리 개발에 관한 일련의 연구를 수행한다. 김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되고 있다. 그러므로 갓김치와 일반적으로 많이 식용하고 있는 배추김치와 무김치의 항산화성을 비교하고 가열우육의 지방질 산화에 대한 항산화성 및 생체모델 실험에서도 이를 확인한다. 또한 이 항산화성을 갓 김치 자체는 물론 용매 추출물을 여러 가지 방법으로 분획하여 상대적인 항산화성을 비교 검토한다. 그리고 김치류에 존재하는 항산화 물질을 분석하고 이들의 항산화성을 살펴본 다음, 항산화성 물질을 분리하여 그 조성을 살펴본다. 갓김치의 항산화 물질의 분리와 동정을 위하여 용매계통 분리 방법에 의하여 항산화 물질을 분획, 분리하고 각 획분의 항산화성을 검정하며, 기기분석을 통하여 물질을 동정한다. 한편 청갓김치보다 적갓 김치의 항산화성이 더 높았으므로 적갓김치의 발효특성, 항산화활성, 항산화특성을 살펴보고, 적갓에서 독특하게 함유하는 anthocyanin 성분을 계통 분리하여 기기분석 등으로 유효 성분을 동정한다. 항산화 항노화 김치의 개발 및 품질개선을 위하여 주재료 및 부재료의 조합에 대하여 살펴본다. 또한 갓김치 담금법 개선을 위하여 기존의 담금법 및 관능성, 발효 특성을 검토하고 레시피에 대한 일련의 연구결과를 바탕으로 1차 갓김치 기본 레시피를 선정하며 여기에 일정 수준의 특수 부재료를 첨가하여 기능성이 증진된 김치를 개발하고 이를 바탕으로 산업화 연구를 한다.

제 2 세세부에서는 배추김치, 갓김치 그리고 부추김치의 세 종류의 김치를 선정하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제효과를 조사한다. 먼저 김치와 김치 재료 중 피부노화를 억제시키는 효과가 있을 것으로 예상되는 여러 가지 항산화 성분과 피부미용 관련 무기질들의 함량을 측정한다. 특히 김치의 피부산화 독성 완화 효과를 규명하기 위하여 피부세포에 산화적 스트레스를 가해 김치 및 김치재료들의 세포독성 완화효과를 조사한다. 그리고 세 종류의 김치를 각각 식이에 첨가하여 hairless mouse에 16주간 공급하였을 때 피부의 표피층과 진피층에 미치는 김치 식이의 영향을 살펴보고 그 변화를 관찰한다. 또한 사육 20주 후 hairless mouse의 간과 소기관에서 활성산소 농도를 비교하며, 간과 피부의 균질액에 대해 자외선을 조사한 후 광산화 억제 효과를 측정한다. 피부노화 억제에 활성이 있는 물질을 찾기 위하여 각 김치를 종류별로 용매 분획하여 용매 획분 중의 항산화 물질의 함량을 측정하고 항산화성과 유리기소거능을 비교한다. 또한 피부 균질액에 김치 용매 획분을 일정농도 첨가하여 자외선을 조사한 후 광산화 억제효과를 살펴보고, 용매 별 획분을 크림에 첨가하여 hairless mouse의 피부에 도포한 후 자외선 조사에 의한 홍반생성 억제능을 조사한다. 이러한 실험의 결과를 근거로 하여 세 가지 김치 실험군 중 피부 미용성이 가장 높은 갓김치로 기능성이 증진된 김치를 개발하여 산업화를 위한 기초 실험을 한다. 즉, 갓김치에 항산화성이 높은 부재료를 첨가함으로써 피부 미용성 성분이 증진된 갓김치를 개발하며, 기능성이 증진된 김치의 공정개선과

재료 물질의 강화 연구, 상품화된 맛 및 보존성 연구와 소비자 관능검사를 수행한다.

제 3 세세부에서는 먼저 배추김치가 동맥경화를 예방하는 효과가 있는지 조사하고 자 흰쥐에게 김치를 첨가하여 사육하며 이때 혈장 및 간의 콜레스테롤 및 중성지방의 농도를 측정한다. 김치에 의한 이들 효과가 뚜렷이 관찰된 다음, 김치의 지질저하 효과가 재료에서 오는지의 여부를 확인하기 위하여 토끼에게 cholesterol을 첨가한 동맥경화식이에 동결건조한 배추가루, 고춧가루, 마늘가루를 첨가하여 16주 사육한 후 대조군과 비교한다. 동맥경화를 예방하는 활성물질을 확인하기 위하여 김치를 용매별로 분획한 후 이를 토끼의 식이에 첨가한 다음 16주간 사육한다. 이때 김치에서 동맥경화 예방효과가 가장 현저한 획분으로 부터 활성물질을 분리 동정한다. 배추김치에 동맥경화를 예방하는 효과가 있음을 기초 연구를 통하여 확인한 다음, 김치의 동맥경화 예방성을 증진할 수 있으면서, 기호도가 우수한 기능성 배추김치를 제조하기 위한 연구를 하며, 이러한 연구의 결과로서 동맥경화 예방성 배추김치의 레시피를 개발한다. 개발된 기능성 배추김치를 담구어 SAM을 이용하여 동물실험을 행하여 기능성 배추김치의 우수성을 확인한다. 또한 임상실험에서도 이러한 효과를 확인하기 위하여 김치를 pill로 만들어 섭취시키고 기능성 배추김치의 동맥경화 예방성을 확인한다. 그리고 대량으로 담긴 기능성 배추김치를 소비자들의 기호도 조사를 실시하여 그 상품성을 확인한다.

2. 연구배경

김치는 본래 한국의 전통식품으로 한국인의 건강과 직접적인 관계를 가져 왔다. 식탁에서 비타민, 무기질, 식이섬유소원으로 또는 식물화합물, 유산균등으로 그 기능이 의약품과 같이 많은 식품이라 할 수 있다. 그러나 김치의 긴 역사와는 달리 그의 과학적인 연구는 미흡했고 특히 기능성에 대해서는 오히려 김치의 짜고 매운 특징이 고혈압과 위암의 원인으로 생각해 왔다. 김치에 사용되는 소금은 보발암성이 있어 짜게 먹을 경우 발암물질과 함께 암의 유발을 도와 주는 효과를 나타낼 수도 있다. 또한 고춧가루의 매운 성분인 capsaicin에 대해서도 건강과 관련하여 문제가 제기된바 있다. 그리고 김치에 사용되는 젓갈, 배추 등으로부터, NO3, NO2, 니트로소아민 등도 문제가 있을 것이라고 추정되었다. 그러나 본인의 선행연구에 의하면 소금이 다소 문제가 있을 수 있으며 고춧가루, 니트로소아민 등은 안전성에 문제가 없었다. 그러나 소금 중에도 여러종류가 있으며 오히려 전통적으로 만들어져 왔던 죽염은 오히려 암을 예방하는 효과가 있음이 알려져 있다.

한편 김치는 180여종의 종류가 있으며 대부분의 채소로도 다 김치가 만들어 질 수 있으며 이런 김치는 그 주원료 뿐 아니라 부재료들이 녹색채소로 암예방/항암/항노화 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 김치가 발효되면서 저장성이 증진되고 무엇보다도 유산균이 많아 정장작용등에도 유리하다. 이렇듯 김치는 장점과 단점을

가지고 있기에 이를 잘 조절하는 연구가 필요하다. 즉 장점은 더욱 살리고 단점은 보완하므로 김치를 최고의 기능성 식품으로 만드는 것이 필요하다.

그 동안 김치는 집에서 주부들이 담아먹는 식품으로 여겨져 왔다. 그러나 이제 그 기능과 우수성이 알려지면서 산업화, 국제화등이 중요하게 대두되고 있다. 김치의 기능을 과학적으로 증진시킨 기능성 김치의 개발은 김치의 종주국으로서의 해야 할 일이라고 생각된다. 최근에는 일본이 기쁘치로 김치의 국제규격화를 들고 나오고 있으며 일본내에서의 김치산업이 제 1위로 대두되고 있다. 이런 분야의 연구를 선도한다는 의미에서 김치와 건강과 관련된 연구를 하는 것은 매우 필요 적절하다고 하겠다.

그리고 김치를 과학적으로 접근하여 활성성분의 동정과 그 항암 기능성을 과학적으로 밝히는 것이 필요하다. 이제 김치는 세계적으로 알려지게 되었다. 한국을 대표하는 식품으로 대두되고 있기에 이에 대한 기능적 연구 특히 우려해왔던 암과의 관계를 연구하고 항암성을 더 증진시킨 김치를 제조, 산업화 하는 일은 중요하다.

김치의 기능성중 또 항산화 기능성, 항노화 기능성을 연구하여 젊음을 유지하는 주요 식품으로 대두 된다면 김치의 국제화는 훨씬 빨라 질 것이다.

제1세부

항암 기능성 김치무리의 개발연구

여 백

제 2장 암예방 김치무리의 개발 분야

제 1절 서 설

암은 무서운 질병으로 80~90%가 여러 가지 환경요인에 의해 발생 될 수 있다. 암발생의 원인 중에 30~60%는 음식과 관련이 되어 있다고 알려져 있고(1) 반면 음식을 잘 섭취하면 암에 걸릴 확률을 크게 감소시킬 수 있다. 그런데 특히 녹황색 채소는 암을 예방 또는 치료하는데 중요하게 관여하고 있음이 알려져 있다(2). 대부분의 김치는 녹황색 채소가 주원료이며 이들 녹황색 채소와 김치에 사용되는 마늘을 비롯한 여러 양념류도 암을 예방 하는 효과가 있다고 알려져 있다(3).

김치는 한국의 주요 전통식품이며, 각 가정의 전통에 따라 여러 가지 부재료를 넣을 수 있기에 부재료의 종류에 따라 영양물질을 강화할 수 있으며 이를 이용하여 기능성을 증진시킬 수 있다.

그러나 김치는 소금에 절여서 발효되는 식품이기에 김치에서 소금의 생리적 역할이 중요하며 그외에 고춧가루, 젓갈 등이 암발생과 관련되어 어떤 역할을 하는지에 대한 연구는 김치의 암예방 기능성을 연구하는데 먼저 확인되어야 할 문제이다. 본인은 이 연구를 시작하기 전 김치의 발암성과 항발암성에 대한 두 양면적인 것을 연구 한 적이 있으며, 그 연구에서 배추와 젓갈에서부터 유래될 수 있는 NO₃, NO₂ 및 니트로소아민 생성에 의한 발암성은 크게 문제가 되지 않음을 보고한 바 있다(4). 그리고 고춧가루의 경우도 활성성분인 캡사이신은 발암활성이 없었으며 오히려 적당량 섭취시 항암 효과와 면역활성 증강 효과가 있음(5,6)에 대해 연구된 바 있다. 반면 김치에서 고농도의 소금 첨가는 보툴리누스 효과가 있어(7) 김치의 암예방 기능성을 증대시키기 위해서는 소금에 역할 또는 소금의 사용종류 등을 조절함이 필요하다.

이 연구에서는 선행 연구를 기초로하여 일반 김치의 암예방 효과를 재확인하고, 김치의 주재료, 부재료의 양과 종류를 조절하고, 소금종류의 조절, 고춧가루의 사용량 및 발효 방법 조절 등을 이용해 김치의 암예방 효과를 증진하려고 하였다.

즉, 본 연구에서는 김치재료, 발효 방법 등을 이용한 암예방 기능성 김치와 양념, 녹차 등을 첨가 또는 양을 조절하여 암예방 기능성 김치를 제조하였다. 그리고 암과 관련하여 소금의 역할이 중요하므로 제 3 세세부에서 연구 제조된 소금을 이용한 암예방 김치도 제조하였다. 암예방 김치는 일반인이 건강 증진면에서 일상 섭취 할 수 있으므로 맛과 보존성 등도 고려하여 제품을 제조하였다. 또한 김치 무리 중 가장 암예방 활성이 좋고 별미 김치로 사용되는 부추김치를 이용하여 암예방 기능성 부추김치로도 제조하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 배추김치와 부추김치의 제조

가. 표준화 배추김치의 재료 및 담금방법

배추는 가락 신1호, 고춧가루는 영양 태양초, 젓갈은 청정멸치액젓((주)미원), 소금은 천일염((주)우일염업)을 사용하였으며, 이외 무, 파, 마늘, 생강은 부산 부전시장에서 구입하였다. 배추를 10% 소금물에서 10시간 절이고, 절인 배추는 수도물로 3회 씻고 3시간 동안 물기를 뺀 후, 무와 파는 채 썰고 무체에 고춧가루 갠 것을 넣어서 버무린 다음 멸치액젓과 마늘 및 생강을 고루 섞은 후 염도는 소금으로 조절하여 담궈(절인배추 100에 대해 고춧가루 3.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 설탕 1.0, 젓갈 2.2, 무 13, 파 2, 최종염도 2.5%) 유리로 된 pint jar에 넣어 15°C에서 4일간(적숙기) 또는 0-10일간 발효시켰다.

나. 부재료 첨가에 의한 암예방 증진 배추김치

표준화 배추김치를 바탕으로 고춧가루를 3배(10.5%), 마늘을 3배(5.2%), 고춧가루와 마늘을 각각 2배씩(7%, 2.8%) 첨가한 김치와 갓 5%, 청각 5%, 초피, 계피가루, 인삼가루, 키토산 올리고당, 알긴산 나트륨과 첨차분말을 각각 1% 첨가한 김치와 유기배추김치를 담그어 실험에 이용하였다.

다. 발효온도에 의한 배추김치의 기능성 증진 효과

13종류의 배추김치를 15°C에서 1일간 발효시킨 후 5°C, 15°C와 25°C에서 각각 발효시켜 pH 4.3이 될 때까지 걸리는 시간을 살펴 보았으며, 이 때의 배추김치 즙액을 이용하여 실험에 사용하였다. 또 15°C에서 1일간 발효시키고 5°C에서 pH 4.3이 될 때 발효시킨 김치는 methanol ext. 을 제조하여 Ames 실험과 SOS 실험으로 항돌연변이 효과를 검토하였으며, *in vitro* 항암활성을 살펴보았다.

라. 표준화 부추김치의 재료 및 담금방법

본 실험에 사용한 부추는 포항산 만생종 및 김해산 그린벨트종으로 산지에서 직접 구입하였으며 마늘, 생강은 김치를 담그는 당일 부산 장전시장에서 구입하였다. 또한 사용한 양념류 중 고춧가루는 영양 태양초, 젓갈은 청정멸치액젓((주)미원), 소금은 구운소금((주)산내들)을 사용하였으며, 설탕은 정제당을 사용하였다. 부추김치는 부추를 반으로 잘라 20% 소금물에서 20분간 절이고, 절인 배추는 수도물로 2회 씻고 1시간 동안 물기를 뺀 후, 찹쌀풀(15g/100ml)에 고춧가루와 멸치액젓을 넣고, 마늘, 생강을 고루 섞은 후 염도는 소금으로 조절하여 담근 후(절인부추 100에 대해 고춧가

루 9, 마늘 5, 생강, 2, 멸치액젓 13, 설탕 2, 찹쌀풀 13, 최종염도 2.3%) 유리로 된 pint jar에 넣어 15°C에서 6일간 발효(pH 4.3)시켜 암예방 효과를 살펴보았다.

마. 부재료 첨가에 의한 암예방 증진 부추김치 제조

표준화 부추김치에 초피, 들깨가루, 계피가루, 인삼가루, 키토산 올리고당, 알긴산 나트륨과 첨차분말을 각각 1% 첨가한 김치를 담그어 15°C에서 6일간 발효하였다. 초피(chinese pepper powder)는 경남, 김해지역에서 9월경에 수집한 것으로 과피부분을 마쇄하여 분말화하였다. 들깨가루는 부천시장에서, 계피가루(cinnamon powder)는 오뚜기(주)로부터 구입한 것을 사용하였다. 인삼가루(ginseng powder)는 6년근 고려인삼을 분말화한 것이며, 항암효과, 면역증진작용으로 주목받고 있는 수용성 타입의 키토산 올리고당(chitosan oligosaccharide), 미역에서 추출한 알긴산 나트륨(sodium alginate)을 수용성 타입으로 전환시킨 가용성 알긴산 나트륨 및 당류의 원료로서 항균작용이 알려져 있는 첨차분말(sweet tea extract)은 명성화학공업(주)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

바. 메탄올추출물의 조제

배추김치와 부추김치는 동결건조한 다음 분말화하여 각각 20배의 메탄올을 넣고 3회 추출하였다. 회전식 진공농축기(Buchi 011 & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 DMSO에 녹여 실험에 이용하였다.

2. 배추김치의 향들연변이 물질의 추출 및 분리 동정

가. 추출 및 분획

배추김치를 15°C에서 4일간 발효시켜 동결 건조한 후 분말로 만들어 methanol로 3회 추출하여 methanol ext.로 하였다. 또 hexane으로 3회 추출(hexane fr.)하고 잔사물을 2배의 methanol을 사용하여 3회 추출(methanol soluble fr.)하였다. 회전식 진공농축기(Buchi oil & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후, 다시 용매의 극성별로 dichloromethane fr., ethylacetate fr., butanol fr.과 aqueous fr.로 분획하여 용매를 제거하고 DMSO에 녹여 들연변이 유발 억제 실험 및 *in vitro* 항암실험을 행하였다.

나. Dichloromethane fr.의 향들연변이와 항암 물질의 추출 및 분리 동정

1) Silica gel column chromatography에 의한 dichloromethane fr.으로부터 활성 성분의 분리

Dichloromethane fr.은 더욱 세분하여 분획하고 최종적으로 그 성분들을 분리하기 위하여 silica gel(Kiesel gel Art. 7734, Merck)을 충분히 현탁시켜 고정된 column

(150cm×8cm² i.d.)에 조심스럽게 가하였다. 시료를 silica gel 10g과 섞어서 잘 흡착시킨 후 완전히 건조시켜 packing된 column에 가하였다. 처음 dichloromethane의 용매를 가하다가 점점 methanol의 양을 늘려주면서 용출을 시작하여 100ml씩 분취하여 200개 분획물을 얻었다.

2) Thin layer chromatography를 이용한 정성

각 용매 분획물과 column chromatography에서 활성 성분을 정성하기 위해 thin layer chromatography(TLC)를 수행하였다. Precoating된 TLC용 silica gel plate(kiesel gel 60 F₂₅₄)에 각 분획물과 column chromatography에서 분리된 획분의 농축액을 점적하고 전개용매로 전개시켰다. 이때 사용된 전개용매는 dichloromethane, dichloromethane-methanol(10:1 v/v), dichloromethane-methanol (5:1, v/v), ethylacetate, ethylacetate-methanol(5:1, v/v), dichloromethane-methanol-H₂O(65:35:10, v/v/v)과 dichloromethane-methanol-2% acetic acid(7:3:1, v/v/v)을 사용하였다.

활성성분이 어느 전개부위에 위치하는지를 알기 위해 UV 254nm에서 확인하였고 동일 조건에서 전개시켜 50% H₂SO₄를 뿌린 후 탄화시켜 TLC plate 상에서 활성성분을 확인하였다.

3) GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 EI-MS에 의한 활성성분의 분석과 동정

앞에서 추출 분리한 활성물질 I을 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry)를 이용하여 분석하였으며, 분석결과 얻은 mass spectral data는 NBS 및 Wiley library로 검색, 비교하여 동정하였다. 또 활성물질 II는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 EI-MS로 분석 동정하였다. NMR spectrum은 Unity Varian사의 Varian Plus(300MHz, 75.5MHz) spectrometer를 사용하여 측정하였고 용매는 CDCl₃를 사용하였다. Chemical shift는 trimethylsilane(TMS)를 내부표준물질로 하여 δ치(ppm)로 나타내었고, 결합정수(J치)는 Hz로 표시하였다. EI-MS spectrum은 Jeol사의 SX-102A를 사용하여 측정하였다.

3. 부추김치 dichloromethane fr.의 항돌연변이와 항암 물질의 추출 및 분리 동정

가. Silica gel column chromatography에 의한 활성 물질의 분리

부추김치의 7개의 분획물 중 항돌연변이 및 *in vitro* 항암효과가 높았던 dichloromethane fr.(40g)은 다시 methanol fr.(16g)과 hexane fr.(24g)으로 나누어 methanol fr.을 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. silica gel(Kiesel gel Art. 7734, Merck)을 충분히 현탁시켜 고정된 column(150cm×8cm² i.d.)에 조심스럽게 가하였다. 시료를 silica gel 10g과 섞어서 잘 흡착시킨 후 완전히 건조시켜 packing된 column에 가하였다. 처음 dichloromethane-methanol(20:1 v/v)의 용매를 가하다가 점점 methanol의 양을 늘려주면서 용출을 시작하여 250ml씩 분취하여 100개 분획물을 얻었다.

나. Thin layer chromatography를 이용한 정성

각 용매 분획물과 column chromatography에서 활성 물질을 정성하기 위해 thin layer chromatography(TLC)를 수행하였다. Precoating된 TLC용 silica gel plate(kiesel gel 60 F254)에 각 분획물과 column chromatography에서 분리된 획분의 농축액을 점적하고 전개용매로 전개시켰다. 이때 사용된 전개용매는 dichloromethane, dichloromethane-methanol(10:1 v/v), dichloromethane-methanol (5:1, v/v), methanol, ethyl acetate-methanol(5:1, v/v), ethyl acetate-methanol-H₂O (60:10:8, v/v/v)과 ethyl acetate-methanol-H₂O(3:3:1, v/v/v)을 사용하였다. 활성성분이 어느 전개부위에 위치하는지를 알기 위해 UV 254nm에서 확인하였고 동일 조건에서 전개시켜 50% H₂SO₄를 뿌린 후 탄화시켜 TLC plate 상에서 활성성분을 확인하였다.

다. GC-MS에 의한 활성성분의 분석과 동정

앞에서 추출 분리한 활성물질을 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry)를 이용하여 분석하였으며, 분석결과 얻은 mass spectral data는 NBS 및 Wiley library로 검색, 비교하여 동정하였다.

4. 김치의관능검사 및 이화학적 실험

가. 반복화된 randomized block design에 의한 관능검사

반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)에 따라서 훈련된 8명의 관능요원이 1회에 3가지 시료를 평가하게 하고 이를 4회 반복 실시하였다(8). 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), 군덕내(moldy smell), 풋내(green smell)와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 군덕맛(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 여러차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신내와 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 풋내와 덜익은 맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕내와 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

나. 이화학적 실험

1) pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(Corning 220)로 실온에서 측정하였다. 산도는 시료 20ml를 20배 희석하여 여기에서 10ml을 취하여 AOAC방법(9)으로 측정하였는데, 0.1% phenolphthalein을 지시약을 1ml 첨가하고 0.1N NaOH로 적정하여 분홍색을 띠는 점을 종말점으로 하였다. 적정값은 Lactic acid로 환산하고 함량 %로 나타내었다.

$$\text{Lactic acid(\%)} = \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 9}{\text{weight of sample (g)}}$$

2) 환원당 함량 측정

김치의 환원당은 Schoorl법(10)으로 측정하였다. 즉 시료액 25ml, CuSO₄ · H₂O 10ml, Rochell염 용액 10ml, 증류수 5ml를 삼각플라스크에 넣고 끓기 시작할때 부터 2~3분 가열한 후 급히 냉각하고 실온 정도로 식으면 30% KI 10ml, 25% H₂SO₄ 10ml을 동시에 넣은 후 잘 혼합해서 0.1N Na₂SO₄로 적정하였다. 적정색깔이 없는 황색이 되면 녹말지시약 3~4방울을 가하여 남보라색이 없어지고 황색으로 변하지 않을 때를 종말점으로 하였다.

3) 젖산균수의 측정

젖산균수의 측정에는 평판계수법(plate count technique)을 이용하였다. 즉 시료액 1ml를 멸균한 증류수로 단계적으로 희석하여 각 희석액 중 0.1ml씩을 미리 가열 용해하여 43℃~45℃로 냉각한 MRS배지 10ml에 넣고 혼합한 후 petri dish에 평판을 만들고 37℃ incubator에서 48시간 배양하여 나타난 colony의 수를 세어 젖산균수로 측정하였다. 배지는 젖산균 분리에 주로 쓰이는 MRS agar배지를 사용하였다.

Lactobacillus 배지는 *Lactobacillus* selection medium(LBS medium)에 *Pediococcus*의 생육을 억제하기 위하여 acetic acid 와 sodium acetate를 첨가한 modified LBS agar medium(m-LBS medium)를 사용하여 30℃에서 3일간 평판배양하였다(11). *Leuconostoc* 선택배지로 phenylethyl alcohol과 sucrose를 첨가한 phenylethyl alcohol sucrose agar medium(PES medium)를 사용하여 20℃에서 5일간 평판배양하였다(12).

4) 배추의 외관 및 색도 비교

배추의 외관은 잎, 줄기, 전체배추의 무게, 잎의 수, 길이 등을 측정하였으며 색도 측정은 배추를 1/4포기로 나누어 블렌더로 간후 Minolta Chroma Meter CT-310을 이용하여 색도를 측정하였다

5) 일반성분 분석

5가지 일반성분을 분석하기 위해서 조단백은 Kedhal법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 회화법, 수분은 105℃ 상압 가열 건조법, 탄수화물은 dextrin 정량법을 이용하여 측정하였다.

6) Texture의 측정

생배추와 절임 배추는 0.7~0.8 cm두께의 잎을 골라 뿌리에서 5cm 부분을 측정하였으며 15℃에서 0, 6, 12일 동안 발효시킨 김치의 경우 최외각에서 3번째 잎을 골라 뿌리에서 5cm의 잎부분을 선별하였다. 배추조직의 텍스처는 Instron (model 1011, USA)로 puncture test와 cutting test에 의하여 측정하였고 배추의 두께는 야미 caliper (0.01-150mm VMS 150, Japan)을 사용하여 측정하였다. 각 시료들은 5반복 측정하여 측정치가 비슷한 3개의 값을 평균값으로 하였다.

7) 배추의 염절임 특성

일반배추(common Chinese cabbage)와 유기농법배추(organic cultivated Chinese cabbage 또는 소금종류에 따른 소금 흡수속도를 측정하기 위해 배추를 1/4포기로 나누어 10℃에서 2.5배의 10%소금물에 2~12시간 절이면서 줄기, 잎 전체로 나누어서 Sinar salt meter (Model NS-3P)염도계로 염농도를 측정했다.

다. 영양·기능성물질 정량

1) 식이 섬유소

Prosky방법(13)에 따라 불용성(insoluble dietary fiber, IDF)과 수용성 식이섬유(soluble dietary fiber, SDF)를 측정하였다.

2) Ascorbic acid 함량 분석

마쇄한 김치시료에 같은 양의 5% metaphosphoric acid 용액을 가하여 12,000rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 5% metaphosphoric acid로 4배 희석한 시료 침출액 2ml씩을 시험관에 취하여 oxidation, osazone형성, osazone 용해의 순서로 조작 한 후 spectrophotometer를 이용하여 파장 540nm에서 비색 정량했다(14).

3) Carotenoids의 분석

Carotenoids는 시료 20g을 100ml acetone으로 추출하여 흡입여과한 다음 60% KOH로 24시간 검화시킨후 petroleum ether(PE)로 재추출 하였다. 총 carotenoids의 정량은 PE중에서의 가시부 흡수 spectrum의 max의 흡광도에 의하여 McBeth법에 따라 흡광계수 E1% 2500으로 하여 계산하였다(15).

4) Chlorophylls의 분석

시료 10g을 osterizer blender에 넣고, 85% acetone 200ml를 가하여 마쇄한 후 흡입 여과한 뒤 냉암소에 방치한 것을 원액으로 하여 anthocyan 등의 수용성 물질을 제거하기 위해 diethyl ether와 물을 가하여 정제하였다. 정제한 추출액을 무수 Na2SO4로 탈수하고 유리 여과기로 여과한 후 diethyl ether로 정용하여 660,

642.5nm에서 흡광도를 측정하고 chlorophylls의 농도를 다음의 Comar 및 Zscheile의 정량식(20)으로 계산하였다(16, 17).

$$\text{총 클로로필 (mg/ml)} = 7.120D(660\text{nm}) + 16.80D(642.5\text{nm})$$

$$\text{클로로필 a} = 9.930D(660\text{nm}) - 0.7770D(642.5\text{nm})$$

$$\text{클로로필 b} = 17.60D(642.5\text{nm}) - 2.810D(660\text{nm})$$

라. 항돌연변이 실험

1) Ames test

Ames test 는 *in vivo*에서 동물 발암실험 사이에서 정의 상관관계(85%)가 알려져 있다. 이 실험에서 주로 이용한 preincubation test는 S9 mix 0.5ml(간접돌연변이인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5ml(직접돌연변이인 경우), 하룻밤 배양된 균주($1 \sim 2 \times 10^9$ cells/ml) 0.1ml, 희석 된 시료($50\mu\text{l}$) 와 돌연변이 유발물질($50\mu\text{l}$)을 ice bath 에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex 한 후 37°C에서 30분간 예비배양하였다. 45°C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다(18).

한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다. 돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

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

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

2) SOS chromotest

Frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 이 실험에서 Quillardet 등(19)의 방법을 변형시킨 백과 함의 방법(20)을 이용하였다. 냉동 보관된 *E. coli* PQ37균액 $50\mu\text{l}$ 를 5ml L 배양액에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 이를 다시 5ml L 배양액에 접종하고 37°C에서 A_{660} 측정치가 0.3~0.4에 이를 때까지 2시간 정도 진탕배양하였다. 얻어진 균액을 L 배양액에 1/10로 희석하여 각 농도 별로 준비된 시료와 돌연변이원을 혼합한 시료 $20\mu\text{l}$ 를 미리 분주하여 둔 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 90분간 37°C에서 진탕하여 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β -galactosidase(β -G)의 활성 측정을 위하여 0-nitrophenyl- β

-D-galacto- pyranoside(ONPG) 100 μ l를 첨가하였다. 발색 시간은 20분으로 하고 β -G는 1.5M Na₂CO₃ 100 μ l로 A-P는 1M HCl 50 μ l로서 효소에 의한 발색 반응을 정지시키고 5분 후 A-P쪽에 50 μ l의 2M tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 분광광도계로 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 O.D. 420nm 측정치는 다음의 Miller의 공식에 의해 enzyme unit(Eu)값을 구하였다.

$$Eu = (1000 \times A_{420}) / t(\text{min})$$

3) *in vivo*에서의 초파리 돌연변이 검출계를 이용한 항돌연변이 효과

가) *Drosophila* stocks와 배양조건

사용되는 strain은 표지유전자로서 *mwh*(multiple wing hairs : 3-0.0) 유전자를 homo로 가지는 *y:mwh jv* strain과 *w*(white:1-0.0) strain이다. *mwh-w* 교배를 위해 미교배 *mwh* 암컷과 *w* 수컷을 3~4일간 분리하여 둔 후 40:40의 40ml agar 배지 (agar 1.5%, sugar 3%, propionic acid 0.5%) 상에서 12시간 동안 교배시킨 후 40ml의 표준배지가 들어있는 새로운 사육병(3 \times 10cm)으로 옮겨 8시간 동안 산란시켰다. 산란 72 \pm 4시간(3령기 유충) 후 얻어진 이형집합체(*mwh/+*) 유충을 20% sucrose 용액으로 수세한 후 실험에 사용하였다.

실험을 위해 상기 3령기 유충들이 들어있는 사육병(3 \times 10cm)에 발암원(AFB₁)이 0.5mg 들어 있는 희석액 250 μ l를 배지표면상에 떨어뜨린 후 25 $^{\circ}$ C 암실에서 성체가 될 때까지 사육하였다.

이형집합체를 가진 한쪽 날개를 절취하여 Faure's solution(gum arabic, 30g; glycerol, 20ml; chloral hydrate, 50g; water, 285ml)으로 영구 프레파라트를 만들어 배울 400배의 현미경하에서 mutant hairs를 가진 세포의 clone을 검색하였다. 프레파라트 제작은 초파리를 70% 에탄올에 고정시켜 두었다가 증류수가 담긴 용기에서 쌍안실체현미경을 통해 날개를 몸체로부터 떼어내어 Faure's solution에 담겼다. 다음 slide glass 위에 이 날개를 일렬로 배열한 후, 45 $^{\circ}$ C heat plate에 얹어 1시간 동안 말린 후 1일간 건조시킨 다음 Faure's solution을 slide glass 위에 1~2방울 떨어뜨려 cover glass를 덮고 약 40g의 추를 cover glass 위에 얹어 하루동안 방치하였다. 그런 다음 small *mwh* spots와 large *mwh* spots를 계수하였다(21).

마. C3H/10T1/2 cell에서 암화억제 실험(*in vitro* 항발암실험)

1) 세포 독성실험

C3H/10T1/2 세포를 2,000 cells/5ml의 농도로 60mm dish에 seeding한 후 24시간 동안 배양한 후 배양액을 버리고 free serum medium에 발암물질, MCA(5 μ g/ml)와 시료를

첨가한 후 5ml씩 60mm dish에 feeding하였다. 한편, 대조군에는 MCA와 DMSO를 첨가하여 24시간 배양하였다. 실험군과 대조군을 10% FCS가 함유된 신선한 배지로 refeeding하면서 일주일 배양 후 메탄올로 고정화하여 Giemsa stain으로 염색한 뒤 20 또는 그 이상으로 군집을 이룬 cell colony를 계수하여 아래 공식에 따라 C3H/10T1/2 세포에 대한 cytotoxicity 억제효과를 측정하였다(22).

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

2) Transformation test

C3H/10T1/2세포를 2,000cells/5ml로 계수하여 60mm dish에 seeding한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 free-serum medium에 MCA(5 μ g/ml)와 시료를 넣고 48시간동안 배양하고 대조군에는 MCA와 DMSO를 첨가하였다. 새로운 배지로 refeeding한 후 7일 간격으로 계속 refeeding하면서 6주간 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 메탄올로 고정화하고 Giemsa stain으로 염색하여 transformed foci가 형성되는 집약도에 따라 3가지 type(type I, II, III)로 구분하여 계수하였다(22).

바. GST-P 양성병소 foci 측정(*in vivo* 항발암실험)

이 실험에서는 발암물질인 2-acetylaminofluorene (2-AAF)이 랫드의 간에 일으키는 전암병변인 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 양성병소의 발생에 미치는 영향을 조사하여 항암효과를 추정하였다.

실험동물은 5-6주령의 F344/NHSD 수컷 랫드로 미국에서 입수하여 약 1주간의 순화 기간을 거친 뒤 6-7주에 실험에 사용하였다. 실험동물은 5마리씩 2군으로 나누었다. 이들 2개군에 간암 유발물질인 diethylnitrosamine (DEN, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜 (200 mg/10 ml) 체중 kg 당 200 mg/kg씩 복강내로 투여하였으며, 실험개시후 2주 및 5주에 D-galactosamine (DGA, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜 (300 mg/10 ml) 체중 kg 당 300 mg/kg씩 복강내에 각각 1회 투여하였다. 그리고 3주차부터 8주까지 6주간, 1 및 2군에 발암촉진물질인 2-AAF를 1% carboxymethyl cellulose에 0.07% (7 mg/5 ml)가 되도록 현탁하여 체중 kg 당 7mg씩 주 5회 경구투여하였으며, 2군의 경우에는 동기간동안 2-AAF 투여후 약 30분 뒤에 김치시료의 methanol 추출물을 증류수에 희석하여(920 mg/ml) 체중 kg 당 920mg씩 주 5회 강제 경구 투여하였다.

시험기간 중 경시적으로 체중을 측정하였으며, 투여종료후에 부검하여 간의 증량을 측정하고, 간조직을 적출하여 10% phosphate buffered formalin solution에 고정하였다. 고정된 간조직의 left lobe에서 2-3 mm 두께의 조직편을 채취하여 일반적인

조직제작과정을 행하고 avidin biotin complex (ABC)법을 이용하여 GST-P에 대한 면역조직화학적 염색을 행하였다. GST-P 양성병소의 간조직 단위면적 (cm^2) 당 수와 면적은 칼라 화상분석기 (LA-555, PIAS Co., Japan)를 이용하여 직경 0.1 mm 이상의 병소에 대하여 측정하였다(23, 24).

사. 말초혈의 망상적혈구를 이용한 *in vivo* 초생체염색 소핵실험

설치류의 골수내 다염성적혈구(polychromatic erythrocytes, PCE)를 이용한 소핵시험법(micronucleus assay)은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 cytogenic 시험법이다.

6-7주령의 웅성 ICR계 마우스에 양성대조군으로 mitomycin C(MMC)를 생리식염수에 용해시켜 0.1ml/10g body weight가 되도록 복강주사하였다. 시험물질의 용량은 50%치 사용량(LD50)의 1/2값을 최고용량으로 하여 복강주사하였으며 시험물질의 소핵 유발의 최적시간을 결정하기 위해 시험물질 투여후 12시간부터 72시간까지 12시간 간격으로 혈액을 채취하였다. 복강주사한 마우스의 꼬리혈관으로부터 혈액 5 μ l를 취하여 acridine oreange-coated slide에 떨어뜨린 후 cover glass로 덮은 다음, 2시간 동안 4 $^{\circ}$ C에 방치하여 세포와 acridine oreange가 충분히 반응하게 하였다. Slide는 형광현미경으로 10 \times 100배에서 관찰하였으며 망상적혈구는 I형에서 III형까지 2000개를 계수하고 그 중 소핵을 지니는 망상적혈구를 계수한 다음 Cochran Armitage법에 의한 통계처리로 유의성을 평가하였다(25).

아. 종양전이억제 실험

6주령의 female Balb/c mouse(한국화학연구소, 대전)로, 체중이 35g 전후의 것을 사용하였으며, 사료는 표준사료로 사육하였다. 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였고, 동물실험실은 온도 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도 55 \pm 5%를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다. 종양전이억제효과를 살펴보기 위하여 폐(lung)에 대하여 전이력을 획득한 고전이성 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma(한동대학, 윤택준박사)를 100units/ml의 penicilin-streptomycin과 7.5%의 FBS가 함유된 EME배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 PBS를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 100 μ l(2.5 \times 10⁴/ml)를 Balb/c 마우스의 꼬리에 정맥주사하였다. 각 군은 5마리로 하였으며, 김치메탄올추출물은 종양세포접종 2일전에 피하주사하였다. 전이된 종양의 판정은 종양접종 14일 후에 마우스를 희생시켜 종양의 표적기관인 폐를 적출한 다음, Bouin's 용액(saturated picric acid 15 : formaline 5 : acetic acid 1)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집수를 count하였고, 김치에 의한

종양전이억제효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 측정하였다(26).

5. 통계 분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test와 Student's t test를 이용하여 통계 분석하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 배추김치의 암예방효과 측정

김치는 종류가 180여종이 있는 것으로 알려져 있으나 일반적으로 김치라면 총 김치 소요의 70%이상을 차지하는 배추김치이다. 배추김치의 암예방효과는 Ames test와 *Drosophila melanogaster*를 이용한 wing spot test 및 진핵세포를 이용한 C3H/10T1/2 cell에서의 항발암효과를 측정하였다. 본인의 선행연구를 기초로 이 실험에 사용된 배추김치의 레시피는 절인 배추 100에 대해서 고춧가루 2, 마늘 2, 생강 0.5를 첨가하고 최종염도를 3%로 맞추어 5℃에서 3주간 발효시킨 적숙기 김치(일반적으로 김치의 암예방효과는 적숙기(pH 4.3)에 가장 높았다(박건영 : 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. 한국영양식량학회지, 24, 169-182(1995))를 동결건조 한 후 methanol extract, hexane extract, methanol soluble fraction(MSF)을 만들어 사용하였다.

가. Ames 실험법을 이용한 김치의 항돌연변이 효과

화학적 발암물질에 의해 일어날 수 있는 돌연변이를 유발하는 *in vitro* 실험방법 중 *in vivo*에서의 발암성을 검토할 경우 85%의 연관관계를 가지고 있는 Ames 실험방법을 통해 배추김치의 항돌연변이효과를 측정하였다. Ames실험 방법에 의한 김치의 항돌연변이효과 실험에서는 앞에서 언급한 바와 같이 3주 발효(5℃)김치가 가장 활성이 컸는데 그 결과는 Table 2-1과 같다. 이 실험결과에서는 methanol 추출물도 효과가 있었지만 hexane추출물이 항돌연변이 활성이 가장 컸었다.

나. *Drosophila melanogaster*를 이용한 항돌연변이 효과

*Drosophila melanogaster*를 이용한 spot wing test를 하였는데 Table 2-2에서 보는 바와 같이 항돌연변이 활성이 있었는데, small mwh spots발생에 있어서 효과가 나타났는데 특히 MSF추출물의 경우 효과가 컸으며 5% 농도에서도 92%의 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다. 그리고 염색체 재조환 및 유전자 돌연변이를 나타내는 large mwh spots에 있어어도 김치추출물은 고르게 큰 저해효과를 나타내었고 이 경우 Ames test에서와 같이 hexane ext.가 높은 항돌연변이 활성을 보였다.

다. C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제 및 항발암효과

C3H/10T1/2 mouse embryo fibroblast cell은 진핵세포에서 neoplastic transformation의 기작을 연구하고 발암을 일으키는 화학물질을 검색하는데 있어서 target indicator 세포 시스템으로 널리 이용되고 있다.

Table 2-1. Antimutagenic effect of methanol extract, hexane extract and methanol soluble fraction (MSF) from 3 weeks fermented kimchi* at 5°C samples against aflatoxin B₁(AFB₁, 1μg/ plate) *Salmonella typhimurium* TA98

Sample	Revertants / plate	Inhibition (%)
Spontaneous Control	38 ± 6	
AFB ₁ + Methanol ext. 1%	794 ± 96	
AFB ₁ + Methanol ext. 1%	493 ± 23	40
AFB ₁ + Methanol ext. 2.5%	475 ± 56	42
AFB ₁ + Methanol ext. 5%	333 ± 15	61
AFB ₁ + Hexane ext. 1%	250 ± 36	72
AFB ₁ + Hexane ext. 2.5%	149 ± 12	80
AFB ₁ + Hexane ext. 5%	93 ± 2	93
AFB ₁ + MSF ext. 1%	562 ± 29	31
AFB ₁ + MSF ext. 2.5%	516 ± 58	37
AFB ₁ + MSF ext. 5%	490 ± 34	40

*Freezedried kimchi was extracted with methanol and extracted hexane and methanol(methanol soluble fraction, MSF), see the materials and method.

Table 2-2. Effect of the kimchi extract¹ on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.02mg/ml) in the *Drosophila* wing hairs spot system

Exposure dose	Frequency per wing(number) of			Number of wings scored
	small <i>mwh</i>	large <i>mwh</i>	<i>flr</i>	
Control	0.077 ² (50) [0] ³	0.025(16) [0]	0.000(0) [0]	653
AFB ₁ 0.02mg/ml	0.300(134) [100]	0.575(261) [100]	0.009(4) [100]	452
Methanol ext. 2.5%	0.266(25) [85]	0.340(32)* [57]	0.011(1) [122]	94
5%	0.135(10)* [26]	0.135(10)* [20]	0.000(0)* [0]	74
10%	0.309(21) [104]	0.221(15)* [36]	0.000(0)* [0]	68
Heane ext. 2.5%	0.277(13) [90]	0.255(12)* [42]	0.021(1) [233]	47
5%	0.138(4) [27]	0.069(2)* [8]	0.000(0)* [0]	29
MSF 2.5%	0.059(1)* [-8]	0.176(3)* [27]	0.000(0)* [0]	17
5%	0.094(8)* [8]	0.165(14)* [25]	0.000(0)* [0]	85
10%	0.068(6)* [-4]	0.205(18)* [33]	0.000(0)* [0]	88

¹Methanol extract, hexane extract and methanol soluble fraction(MSF) are the extracts of 3weeks fermented kimchi at 5°C.

²Number of spots/number of wings

³Relative frequency(%) : Calculated from the number-per-wing values by subtracting the control value. For example, 100% for small *mwh* spot corresponds to 0.300-0.077=0.223(number per wing in mg/ml treatment group), and 85% corresponds to 0.266-0.077 =0.189(number per wing).

*Significantly different from the control at the p< 0.05

마우스 embryo 세포인 C3H/10T1/2 cell에서 김치추출물들이 MCA에 대한 cytotoxicity억제효과는 Table 2-3과 같다. 5°C에서 3주 발효시킨 적당히 익은 김치가 생김치보다 발암물질에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 크게 나타났었다. 김치추출물 MSF(methanol soluble fraction) 500 μ g첨가시 약 2배의 발암물질에 대한 보호 효과가 관찰되었다. Table 2-4에서는 3주 발효김치의 MSF 및 hexane추출물의 MNNG에 의한 cytotoxicity억제효과를 나타내고 있는데 비슷한 억제효과가 관찰되었다.

Table 2-3. Effect of methanol soluble fraction(MSF) from the fresh, and 3 weeks fermented kimchi on 20-methylcholanthrene(MCA, 5 μ g)-induced cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells¹⁾

Treatment	Cell colony	Survival fraction ²⁾
Control(MCA)	46.3 \pm 3.2	1.00
MCA + MSF (100 μ g)	fresh kimchi	51.3 \pm 7.2
	3 wks fermented kimchi	61.3 \pm 2.5
MCA + MSF (200 μ g)	fresh kimchi	62.0 \pm 6.2
	3 wks fermented kimchi	75.3 \pm 4.5
MCA + MSF (500 μ g)	fresh kimchi	85.3 \pm 5.1
	3 wks fermented kimchi	92.5 \pm 2.1

Values are means \pm SD

¹⁾2 \times 10⁵ C3H/10T1/2 cells were cultivated in serum-free Eagle's basal medium in the presence of various concentration of the above samples for 48 hours. Following treatment, the cells were allowed to grow an additional 7 days in the medium supplemented with 10% FCS. Surviving colonies were fixed with methanol, stained and counted.

²⁾Survival fraction =
$$\frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

Table 2-4. Effect of methanol soluble fraction(MSF) and hexane extract from 3 weeks fermented kimchi on N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG, 1 μ g/ml) induced cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells¹⁾

Treatment	Cell colony	Survival fraction ²⁾
Control(MNNG)	36.0 \pm 4.4	1.00
MNNG + MSF 100 μ g	42.0 \pm 3.4	1.17 (17%)
MNNG + MSF 200 μ g	55.3 \pm 3.2	1.53 (53%)
MNNG + Hexane 100 μ g	50.7 \pm 4.2	1.42 (42%)

Values are Means \pm SD

^{1,2)}The experimental procedure and survival fraction are the same as Table 2.

Table 2-5은 3주 김치의 MSF에 의해 C3H10T1/2 cell의 transformation억제효과를

나타내고 있다. Type II foci는 50%, Type III foci는 C3H mouse에 처리하면 각각 50% 및 85%의 암을 발생시키는 것으로 알려져 있는데 control(MCA 단독처리)인 경우는 Type II + III foci가 7.4개였는 반면 김치 MSF 추출물 200 μ g 처리시 0.8개로 감소되므로 김치 MSF 추출물은 chemical carcinogen에 의한 발암성을 크게 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 2-5. Inhibitory effects of the methanol soluble fraction(MSF) of 3 weeks fermented kimchi on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 20-methylcholanthrene (MCA, 5 μ g/ml)

Kimchi extract	Total number(foci)			
	Type I	Type II	Type III	Type II+III
Control(MCA)	2.4 \pm 0.9	3.2 \pm 0.8	4.2 \pm 1.1	7.4
MCA + MSF 100 μ g	4.2 \pm 1.3	2.8 \pm 1.5	2.2 \pm 1.5	5.0
MCA + MSF 200 μ g	1.8 \pm 0.8	0.6 \pm 0.6	0.2 \pm 0.5	0.8

Values are Means \pm SD

¹⁾Twenty four hours after seeding, C3H/10T1/2 cells were treated with MCA(5 μ g/ml) and MSF (100, 200 μ g) from 3 weeks fermented kimchi for 24 hours, at which time a medium change was made. Medium with 10% serum was changed 5 times weekly until confluence was attained.

라. 유산균의 항돌연변이효과

Ames test와 SOS chromotest 실험계를 이용하여 김치 주요 유산균 균체 시료들의 돌연변이 유발억제효과를 실험하였다. 그 결과 *Leu. mesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Lac. brevis*, *Lac. fermentum* 등의 김치 유산균들은 대체로 4-NQO (4-nitro-quinoline-1-oxide)에 대한 돌연변이 유발을 크게 억제하였으며 반면 MNNG(N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine)에 대한 돌연변이 유발은 그다지 억제하지 않았다. 또한 S9의 활성화를 필요로 하는 간접돌연변이원인 MeIQ(2-amino-3,4-dimethylimidazo(4,5-f)quinoline)와 Trp-2(3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)에 대한 돌연변이 유발을 모든 김치 유산균체는 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 그 중 *Leu. mesenteroides* 균체가 다른 유산균들 중에서 가장 높은 효과를 나타내었으나 *Ped. acidilactici*는 4-NQO에 대해서는 항돌연변이 효과를 나타내지 않았다. 대조균으로 사용했던 *Lac. acidophilus*는 가장 연구가 많이된 probiotics로 항암가능성이 많이 알려져 있다. 김치 유산균들 특히 *Leu. mesenteroides*와 *Lac. plantarum*은 *Lac. acidophilus*와 비슷한 항돌연변이 효과를 나타내었다(Fig. 2-1).

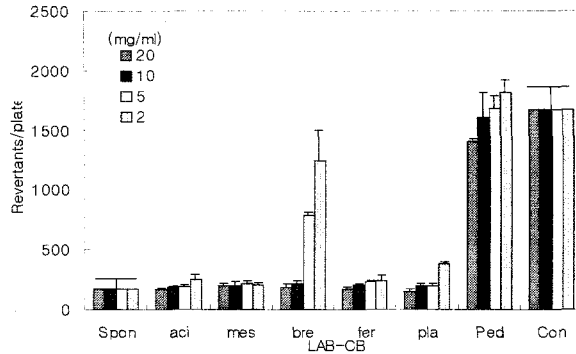


Fig. 2-1. Antimutagenic activity of kimchi lactic acid bacteria-cell body (LAB-CB) against 4-NQO(0.15g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA100
 Spon: spontaneous, aci: *Lactobacillus acidophilus*, mes: *Leuconostoc mesenteroides*, bre: *Lactobacillus brevis*, fer: *Lactobacillus fermentum*, pla: *Lactobacillus plantarum*, Ped: *Pediococcus acidilactici*, Con: control

2. 배추김치의 표준화와 표준화된 배추김치의 암예방효과

가. 배추김치의 표준화 연구

암예방 효과를 가지는 배추김치의 항발암 활성 또는 항암활성(제 3장)을 증진시키는 연구를 위해 우리나라의 김치(배추) 담금의 표준화를 시도하였다. 이는 김치 담금의 대표값을 얻은 후 암예방/항암 기능이 증진된 김치를 개발하기 위한 기초연구이다. 배추김치의 표준화는 김치제조 관련 문헌과 전수자, 관능검사, 이화학실험 및 기능성실험을 고려하여 표준화작업을 하였다.

1) 문헌에 의한 배추 김치의 표준화

조리서와 관련 문헌 및 김치공장에서 사용되어지는 다양한 재료중 사용빈도가 50% 이상인 부재료로는 무와 파, 양념류로는 고추가루, 마늘, 생강, 젓갈, 생강, 설탕으로 나타났다. 이외에도 부재료로 갓, 미나리, 굴, 실고추, 동태, 청각, 당근, 참쌀풀, 통깨 등을 배추김치 담금시 사용하는 것으로 나타났고, 특히 이들 부재료는 조리서의 경우에 있어서는 50%이상의 사용빈도를 보였으나, 논문 등의 관련문헌과 김치공장의 경우는 거의 사용되어지지 않는 부재료였으므로, 배추김치의 표준화를 위한 부재료에는 포함시키지 않았다. 드물게는 배, 밤, 사과, 갈치 등도 배추 김치의 부재료로 이용하는 경우도 있었다. 또 배추김치에 사용되어지는 부재료의 종류는 지역적인 차이를 보이는데 이는 선호하는 배추김치의 맛이 각각 다르기 때문으로 여겨지며, 경상도와 전라도의 경우는 매운 김치를 즐겨 먹고 서울과 충청도에서는 담백하고 새콤하며, 짜지도 맵지도 않은 맛을 선호하며, 제주도에서의 배추김치는 조기양념의 맛이 특징적이다. 이러한 지역적인 차이를 고려하고 우리나라를 대표할 수 있는 표준화 배추김치의 재료로는 무, 파, 마늘, 생강, 젓갈, 설탕인 것으로 나타났으며 이들 재료

배합비의 표준값은 Table 2-6에 나타내었다. 조리서 및 각종문헌과 김치공장에서 얻어진 각각 20개씩의 자료중 최대값과 최소값을 제외하고 평균값을 구하고 이들사이의 표준편차를 구하였으며, 이 값을 문헌에 입각한 배추김치의 표준화를 위한 표준값으로 하였다. 즉 배추김치에 사용되는 재료의 배합비는 절인 배추 100에 대해 무 13.0 ± 7.0, 파 2.0 ± 0.5, 마늘 1.4 ± 0.4, 생강 0.6 ± 0.3, 찻갈 2.2 ± 1.6, 설탕 1.0 ± 0.3이었으며, 고추가루는 조리서를 비롯한 각종 문헌의 경우와 김치공장에서 배합비에 큰 차이를 보여 각각 2.5 ± 0.3와 3.5 ± 0.8로 나타났다.

Table 2-6. Standardized ingredients ratio of baechu kimchi

Ingredients	Weight(g)
Baechu	100.0
Red pepper powder	2.5/3.5
Crushed garlic	1.4
Crushed ginger	0.6
Anchovy juice	2.2
Sugar	1.0
Radish	13.0
Green onion	2.0
Final salt	2.5%

재료의 선별에 있어서는 가장 보편적으로 이용되고, 구하기 쉬우면서도 우수한 품종으로 알려진 것들을 이용하였다. 배추는 김장용 배추로 좋다고 알려진 포합성 결구배추인 가락 신1호를 사용하였고, 푸른 잎이 많고 껍질은 얇으며, 단단하고 잎이 밀착되어 있는 중간크기의 약 2.5kg의 배추를 이용하였다. 김치 담금을 위한 소금은 크게 천일염과 정제염으로 나누는데 천일염은 해수를 모아 태양열과 바람을 이용해 수분을 증발시켜 염의 결정을 얻은 것으로, 절임류를 담글 때에는 정제염보다 천일염이 좋다고 알려져 있어 배추 김치의 표준화를 위한 소금의 종류로는 천일염을 이용하였다. 또 찻갈의 종류는 원료에 따라 30여종이 있고, 배추김치에 주로 이용되는 찻갈의 종류로는 멸치젓, 새우젓, 굴젓, 조개젓, 명란젓, 오징어젓 등을 들 수 있으며, 이중 멸치젓과 새우젓이 가장 많이 이용되며 지역에 따른 차이도 있어 경상도와 전라남도에서는 주로 멸치젓을 사용하고 전라북도에서는 새우젓을 사용하였다. 찻갈은 생선이나 어패류가 잘 삭은 것을 걸러서 사용하면 좋으나 최근에는 김치공장에서 뿐만 아니라 가정에서도 걸러진 액젓을 더 많이 사용하므로 표준화를 위한 찻갈로는 멸치액젓을 이용하였다. 이 외의 재료중 고추가루는 색택이 선명하고 윤기가 있는 영양태양초를 사용하였고, 마늘은 크기가 균일한 육쪽 마늘을 사용하였으며, 생강은 발이 굵고 넓으며 크기와 모양이 일정한 것을 선택하였다.

배추김치의 담금방법을 분석하여 표준화한 결과는 Fig.2-2과 같다. 배추는 밑동을 다듬고 칼집을 포기의 반 혹은 4등분을 넣고 조개어 10% 소금물에서 10시간 절이고,

절인 배추는 수도물로 3회 씻고 3시간 동안 물기를 뺀다. 무우, 파는 5cm로 채 썰고 무우채에 고추가루 갠 것을 넣어서 빨갛게 버무린 다음 멸치액젓을 넣고, 파, 마늘, 생강을 고루 섞은 후 염도는 소금으로 2.7%로 조절하여 절인 배추잎과 배추잎 사이에 양념을 골고루 켜켜로 넣는다. 이 때 소금절임에 있어서 소금을 직접 뿌리거나 소금물에 담궈 두어 배추를 절이는 방법이 있으나, 주로 소금물로 절이는 방법이 사용되고, 절이는 소금물의 농도는 8~12%, 절이는 시간은 온도에 의해 영향을 받는데, 작업장의 온도 15℃를 기준으로 하였을 때 보통 10% 소금물에서 10시간 정도 절이는 것이 가장 보편적이고 일반적인 방법이었다. 또한 최종염도는 조리서를 비롯한 각종문헌은 2.5%였으나, 김치공장의 경우 3.0%였으므로 배추 김치의 표준화를 위한 최종염도는 2.7%로 조절하였다.

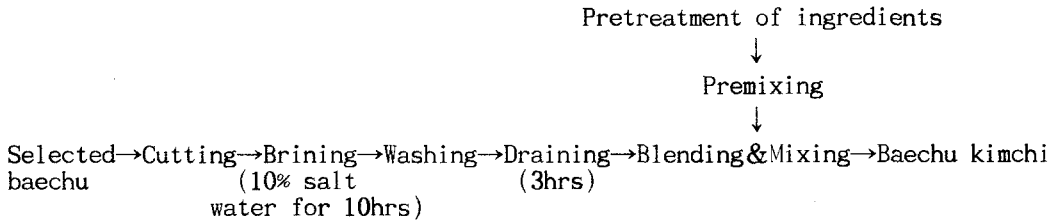


Fig. 2-2. A diagram for preparation of baechu kimchi

2) 고추가루 농도의 표준화

문헌에서 큰 차이를 보인 고춧가루 농도는 관능검사, 여러 이화학적실험(보존성포함) 및 기능성(항돌연변이 및 *in vitro*항암효과)을 한 결과 2.5%보다는 3.5%가 적당한 것으로 나타났다(실험결과 생략).

3) 실험에 의한 배추김치의 표준화

앞의 연구에서와 같이 문헌을 통한 배추김치의 표준화에서 얻은 결과를 재료 배합비의 표준값으로 하여 표준편차 만큼의 양을 가감하여 담근 김치를 가장 잘 숙성되고 관능적으로 우수했던 15℃에서 4일간 발효시킨 배추 김치에 대해 관능검사를 실시하였다.

위의 결과로 부터 절인 배추 100에 대해 무 13.0%, 파 2.0%, 설탕 1.0%, 고추가루 3.5%, 마늘 1.4%, 생강 0.6%, 멸치액젓 2.2%를 첨가하고 최종염도는 2.5%나 2.7%로 조절한 배추김치가 주관적인 평가항목인 종합적인 냄새, 향미, 종합적인 평가에서 좋았고, 객관적인 평가항목인 군덕내, 군덕맛이 적어 관능적으로 우수하였으며, 이것은 조리서 및 관련문헌과 김치공장에서의 배합비의 표준값과 일치하는 결과였다(실험결과 생략). 또한 고춧가루, 마늘, 생강, 멸치액젓의 배합비를 달리하여 pH, 산도, *Leuconostoc*속 젖산균수, 항돌연변이 및 *in vitro* 항암효과로 스크리닝 해 본 결과 관능검사와 문헌에서 나타났던 배합비에서 여러 가지 측면에서 우수하게 나왔다. 반

면 소금농도는 2.5%가 저염이라는 면에서 2.7%대신에 2.5%로 감소되었다(실험결과 생략).

나. 표준화된 배추김치의 분획물의 암예방효과와 활성물질 동정

1) 배추김치 분획물의 항돌연변이 효과

배추김치에서 돌연변이 유발을 억제(항발암)하는 물질을 검색하기 위해 15°C에서 4일 발효시킨 표준화된 김치를 동결건조한 후 methanol로 추출하였다. 회전식 진공농축기로 농축후 다시 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올 그리고 물분획물을 얻어 그 활성을 검토한 결과는 Table 2-7과 같다. 김치의 메탄올 추출물, 헥산추출물과 탈지한 메탄올 추출물 및 분획물의 *Salmonella typhimurium* TA100의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과, 김치의 추출물 중에서는 헥산추출물이 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 AFB₁의 항돌연변이 효과가 가장 높게 나타나 5.0% 농도에서 67%의 효과를 보였고, 분획물 중에서는 디클로로메탄층이 매우 높은 항돌연변이 효과를 보여 최저 농도인 1.25%에서도 45%, 최고 농도인 5.0%에서는 96%의 매우 높은 항돌연변이 효과를 보여 김치의 여러 추출물과 분획물 중 디클로로메탄 층이 가장 높은 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

Table 2-7. Effect of the fractionated samples from kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(0.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100

Treatment (mg/ml)	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous	95.3±16.4	
Control	915.3±21.1	
Methanol ext.		
1.25	692.0±26.2	27.2
2.5	685.7±24.2	28.0
5.0	630.0±12.2	34.8
Methanol soluble ext.		
1.25	768.7±47.6	17.8
2.5	823.7±44.3	11.2
5.0	738.3±47.7	21.6
Hexane ext.		
1.25	740.7±52.6	21.3
2.5	620.0±39.4	36.0
5.0	370.0±18.1	66.5
Dichloromethane fr.		
1.25	546.7±64.4	45.0
2.5	315.3±20.1	73.2
5.0	131.0±30.8	95.6
Ethyl acetate fr.		
1.25	620.7±47.3	3.6
2.5	669.7±18.0	30.0
5.0	991.3±33.3	-9.3
Butanol fr.		
1.25	696.0± 9.6	26.7
2.5	662.3±26.1	30.9
5.0	775.3±66.3	17.1
Aqueous fr.		
1.25	669.0±45.6	30.0
2.5	603.7±34.3	34.0
5.0	584.3±73.8	36.2

2) 배추김치 분획물의 C3H/10T1/2 cell에서 MCA 및 DMBA에 대한 cytotoxicity 억제 및 transformation 저해효과

배추김치(일반배추 100, 고춧가루 3.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 멸치액젓 2.2, 설탕 1.0, 무 13.0, 파 2.0, 소금농도 2.5%, 15°C, 4일 발효, pH 4.3의 김치) 분획물에 의한 발암과정의 저해기전을 검토하기 위하여 C3H/10T1/2 cell을 이용하여 MCA에 의한 세포독성 저해효과와 transformation 억제효과를 측정하였다. 김치의 7개의 분획물중 디클로메탄 분획물과 부탄올 분획물이 0.01mg/ml의 농도에서 MCA에 의한 세포독성을 각각 67%, 73%로 가장 크게 억제하였다(Table 2-8). MCA에 의한 transformation foci 생성 억제 효과를 검토하기 위해 Type I, Type II, Type III로 구분하여 foci를 계수한 결과는 Table 2-9에 나타내었다. Type I foci(0% 발암성)의 개수는 대조군에 비해 디클로메탄 분획물을 첨가한 경우가 더 증가하였으나, type II와 type III foci의 형성 개수는 크게 감소하였다. 대조군의 경우 type II(50% 발암성)와 type III(85% 발암성)를 합친 것이 22.2개인 것에 비해 배추김치의 디클로메탄 분획물을 처리한 경우는 0.005 mg/ml과 0.01mg/ml의 농도에서 각각 14.6개, 11.0개로 MCA에 의한 transformation foci의 형성을 저해시켜 이 김치분획물은 암발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 2-8. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene MCA, 10 μ g/ml) and fractionated samples(0.01mg/ml) from chinese cabbage kimchi

Treatment	Cell colony	Cytotoxicity
MCA(control)	24.3	1.00
MeOH ext.	32.0	1.32
MSF	30.0	1.23
Hex fr.	33.3	1.37
CH ₂ Cl ₂ fr.	40.5	1.67
EtoAC fr.	32.7	1.35
BuOH fr.	42.0	1.73
Aqueous fr.	29.5	1.21

Table 2-9. Inhibitory effect of dichloromethane fraction (CH₂Cl₂ Fr.) on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methylcholanthracene (MCA, 10 μ g/ml)

Treatment(mg/ml)	Total number			
	Type I foci	Type II foci	Type III foci	Type II + III foci
MCA (control)	4.6	9.6	12.6	22.2
MCA + CH ₂ Cl ₂ fr. 0.005	6.6	8.4	6.2	14.6
0.01	5.2	6.0	5.0	11.0

배추김치 분획물의 DMBA에 대한 세포 독성 저해효과를 C3H/10T1/2 cell을 이용하여 검토한 결과를 Table 2-10에 나타내었다. 김치의 추출물 및 분획물 중 0.01mg/ml의 처리 농도에서 dichloromethane fr.이 DMBA의 세포독성을 56% 저해하는 것으로 나타났다. 또 hexane fr.은 39%, MeOH ext.은 31%의 세포독성 저해효과를 보였으며, 이에 비해 methanol soluble fr.과 aqueous fr.은 다소 낮은 저해효과를 보였다. Table 2-11은 배추김치 7개의 분획물의 발암물질 DMBA에 의한 transformation foci 형성을 저해하는 정도를 살펴본 결과이다. DMBA만 처리한 경우 type II+III foci의 형성 개수가 26개로 나타났으나, dichloromethane fr.의 처리농도가 증가할수록 type II, III의 형성개수는 급격히 감소하여 type II+III foci의 개수가 0.005mg/ml과 0.01mg/ml의 처리농도에서 각각 13, 8로 나타났다. 이로써 김치의 추출물 및 분획물은 DMBA 발암물질에 의한 암발생도 크게 감소시킴을 알 수 있었다.

Table 2-10. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA, 1.5 μ g/ml) and fractionated samples(0.01mg/ml) from chinese cabbage kimchi

Treatment	Cell colony	Cytotoxicity
DMBA(control)	26.3	1.00
Methanol ext.	34.5	1.31
Hexane fr.	36.5	1.39
Methanol soluble fr.	29.0	1.10
Dichloromethane fr.	41.0	1.56
Ethyl acetate fr.	28.0	1.06
Butanol fr.	33.5	1.27
Aqueous fr.	29.0	1.10

Table 2-11. Inhibitory effect of dichloromethane fraction(CH₂Cl₂ fr.) on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA, 1.5 μ g/ml)

Treatment (mg/ml)	Total number			
	Type I foci	Type II foci	Type III foci	Type II+III foci
DMBA (control)	12	15	11	26
DMBA+CH ₂ Cl ₂ fr. 0.005	13	10	3	13
0.01	15	6	2	8

배추김치 분획물 중 dichloromethane fr.이 가장 활성이 컸기에 제 3장 3절에 소개되는 바와 같이 이 분획의 활성물질과 항암기작을 밝혔다.

3. 배추김치의 암예방효과 증진 연구

가. 배추김치재료와 비율조절에 의한 암예방증진 연구

1) 배추종류

가) 유기배추의 영양성분 및 기능성물질 함량 비교

(1) 배추의 외관과 색도 비교

유기농법배추와 일반배추의 외관을 비교한 결과는 Table 2-12와 같다. 즉, 크고 겉보기 좋아보이는 배추를 선호하는 소비자들의 성향에 맞추어 생산한 일반농법배추는 외관면에서는 나아 보인다. 배추 한 개당의 무게는 일반배추는 3.22g, 유기배추는 1.44g으로 거의 2배에 달했으며 길이도 일반배추 33.8cm, 유기배추 26cm로 일반배추가 더 길었다.

Table 2-12. Difference of appearance between Chinese cabbage and organic Chinese cabbage

	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
Weight of cabbage(g)	3.22±0.12	1.44±0.08
Number of leaf	34 ±1.87	27.4 ±1.14
Length of cabbage(cm)	33.8 ±1.64	26.0 ±1.26
Weight of leaf(g)	1.85±0.13	0.59±0.11
Weight of stem(g)	2.04±0.23	0.85±0.13

배추의 색도를 측정하여 본 결과 lightness는 일반배추가 유기배추보다 수치가 낮아 유기배추가 더 짙음을 알 수 있었으며 녹색을 나타내는 -a값의 수치도 유기배추(-6.190)가 일반배추(-.500)보다 더 짙어 chlorophylls로 사료되는 녹색의 색소성분이 현저히 많이 존재함을 알 수 있었으며 노란색을 나타내는 +b값에서도 유기배추가 일반배추의 약 2배정도가 많았다(Table 2-13).

Table 2-13. Coloriness of common Chinese cabbage and organic Chinese cabbage

	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
L	72.31 ±0.08	40.98 ±0.43
a	-0.500±0.02	-6.190±0.09
b	+14.060±0.12	+31.403±0.49

L : lightness

+a : red, -a : green

+b : yellow, -b : blue

(2) 일반성분 분석

동결 건조한 유기농법배추와 일반농법배추의 수분, 조단백, 조지방, 회분, 탄수화물 등의 일반성분을 분석한 결과는 Table 2-14와 같다. 먼저 수분함량을 살펴보면 일반배추는 9.5%, 유기농법배추는 6.8%로 일반배추가 유기농법배추보다 많고 조지방, 회분, 탄수화물은 유기농법 배추가 일반배추보다 많음을 알 수 있었다.

Table 2-14. General component of common Chinese cabbage and organic Chinese cabbage

General component	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
protein (%)	25.8±0.23	19.8±0.10
fat (%)	1.3±0.03	1.8±0.02
ash (%)	10.5±0.03	11.7±0.02
water (%)	9.4±0.02	6.7±0.03
carbohydrate (%)	52.9±0.04	60.0±0.02

(3) 식이섬유소 함량.

배추의 식이섬유소를 Prosky방법에 따라 측정한 결과는 Table 2-15에 나타낸 바와 같다. 건조물기준시 SDF는 CC(4.59%)에 비해 OC(5.15%)로 큰 차이는 없었으나 IDF는 OC가 18.18%로 CC(14.63%)에 비해 3%가량이 많았고 TDF에서 CC는 19.12%, OC는 23.34%였다. 수분함량이 CC가 96%, OC가 93.8%인 것으로 보아 환산했을 때 CC가 0.76% OC가 1.45%로 OC가 TDF에서 월등히 높았다. 이는 OC가 CC에 비해 견고도를 유지하는 lignin, 셀룰로오스, 일부의 hemiacetal과 pectin을 함유하는 IDF가 많았다고 하겠다.

Table 2-15. The contents of soluble dietary fiber(SDF), insoluble dietary fiber(IDF) and total dietary fiber(TDF) in common Chinese cabbage(CC) and organic cultivated Chinese cabbage(OC) (%)

Sample	Moisture content	Soluble dietary fiber(SDF)	Insoluble dietary fiber(IDF)	Total dietary fiber (TDF)
Common Chinese cabbage	96.0±0.25	0.18±0.02 (4.59±0.45) ¹	0.58±0.07 (14.63±1.53)	0.76±0.05 (19.12±1.68)
Organic cultivated Chinese cabbage	93.8±0.80	0.32±0.04 (5.15±0.73)	1.13±0.05** (18.18±0.80)	1.45±0.02** (23.34±0.39)

(4) Ascorbic acid 함량분석

Ascorbic acid의 환원형 함량을 보면 일반배추(6.0mg%)가 유기배추(5.8mg%)보다 약간 많은 듯 하나 총량을 살펴보면 유기배추가 일반배추보다 2배 가량이 많음을 알 수 있다(Table 2-16).

Table 2-16. Vitamin C content of Common Chinese cabbage and Organic Chinese cabbage

	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
Total vitamin C(mg%)	32.3±0.02	64.5±0.03
Dehydro ascorbic acid(mg%)	6.0±0.03	5.8±0.04

(5) Chlorophylls의 함량

Chlorophylls은 일반적으로 chlorophylls a,b의 존재비가 1:3정도이며 여기서도 유기배추와 일반배추 모두에서 이의 존재비가 약 1:3으로 일정하였다. Chlorophylls의 함량은 Chlorophylls a,b둘다 유기배추가 7배가량 많았으며 총chlorophylls의 함량에서도 유기배추가 일반배추보다 약 7배 가량이 많았다(Table 2-17).

Table 2-17. Chlorophylls in common Chinese cabbage and organic Chinese cabbage

	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
Total Chlorophyll($\mu\text{g}\%$)	15.5 \pm 0.03	104.6 \pm 0.05
Chlorophyll a($\mu\text{g}\%$)	11.4 \pm 0.05	77.5 \pm 0.06
Chlorophyll b($\mu\text{g}\%$)	4.1 \pm 0.03	27.1 \pm 0.05

(6) Carotenoids와 환원당 함량의 분석

항산화성, 항돌연변이성, 항암성이 있는 물질로 알려져 있는 carotenoids의 함량을 살펴보면 유기배추가 일반배추보다 약 2배정도 많으며 또한 환원당의 함량 또한 유기배추가 일반배추의 2배 정도로 나타났다(Table 2-18).

Table 2-18. Carotenoids and reducing sugar in common Chinese cabbage and organic Chinese cabbage

	Common Chinese cabbage	Organic Chinese cabbage
Carotenoids($\mu\text{g}\%$)	18.0 \pm 0.005	35.0 \pm 0.022
Reducing sugar(g%)	0.7 \pm 0.205	1.5 \pm 0.411

나) 유기배추를 이용하여 담근 배추김치의 특성

(1) 김치 발효중의 이화학적 변화

(가) pH 및 산도

김치를 15°C에서 발효하는 동안 pH변화는 담금초기에 CC김치는 5.35, OC김치는 5.36로 비슷하였으나 김치가 발효함에 따라 감소하여 발효 3일째 수분 함량이 많았던 CC김치는 pH가 4.75로 감소되었고 OC김치는 5.14를 나타내었다. CC김치가 초기에 pH가 빨리 감소했으나 OC김치는 서서히 떨어져 6일째 CC김치는 pH 4.23, OC김치가 pH 4.31을 나타내었고 9일째는 CC김치 pH 3.87, OC김치 pH3.91이었다. 15°C에서 발효 6일째가 pH4.3에 가까운 4.23~4.31을 나타내어 가장 맛있는 시기로 추정되었다.

김치 발효중 중요한 변화는 젖산 발효에 의한 각종 유기산의 생성으로 인한 산도의 증가이다. 산도의 경우는 pH의 변화만큼 두 시료들간에 차이가 크지는 않았으나 0.26%에서 계속 증가하여 발효 6일째에는 CC김치가 0.75%였고 OC김치의 경우 0.72%로 나타났다. 이는 젖산의 함량으로 환산했을 때 산도 0.6%~0.8%일 때 가장 잘 익었다

는 보고와 일치했다.

(나) 환원당 함량

초기 환원당의 경우 CC김치는 2.50g%, OC김치는 3.64g%로 OC김치의 환원당 함량이 높았다. 발효 3일째 CC김치의 경우 1.62g%로 급속하게 감소되었으나, OC김치의 경우 2.86g%를 나타내었고, 가장 적당히 익은 6일째에도 CC김치는 1.20g%, OC김치는 2.34g%로 함량의 차이가 있었다.

(2) 유기배추김치의 항돌연변이 효과

Salmonella typhimurium TA100을 이용한 Ames test에서 AFB₁에 대해 김치추출물의 저해효과는 1.25mg/assay의 메탄올추출물에서는 일반배추김치의 경우 0일째는 저해효과가 거의 없었으나 6일째에는 42%의 저해효과를 보였으며 유기김치의 경우는 첫날에 32%, 6일째에는 74%까지의 저해효과를 보였다(Table 2-19). 2.5mg/assay의 경우를 보면 일반배추김치는 0일째는 29%, 6일째는 54%의 저해효과가 유기배추김치의 경우는 0일째는 35%, 6일째는 80%까지의 저해효과를 보여 유기배추김치가 항돌연변이 효과가 컸었다.

Table 2-19. Antimutagenic effect of methanol extracts from common Chinese cabbage(CC) kimchi and organic Chinese cabbage(OC) kimchi¹ on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 1μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate		
	1.25mg/plate	2.5mg/plate	
Spontaneous	107 ± 10		
Control	1123 ± 43		
CC kimchi	0 days	1094 ± 47(3) ²	825 ± 4(29)
	3 days	896 ± 36(22)	711 ± 27(41)
	6 days	699 ± 26(42)	575 ± 44(54)
	9 days	782 ± 28(34)	656 ± 25(46)
OC kimchi	0 days	798 ± 32 [*] (32)	766 ± 31 [*] (35)
	3 days	685 ± 53 [*] (43)	505 ± 38 [*] (61)
	6 days	473 ± 26 [*] (74)	311 ± 28 [*] (80)
	9 days	510 ± 8 [*] (60)	301 ± 5 [*] (81)

¹Kimchi samples were fermented at 15°C

²The values in the paranthesis are inhibition rate(%)

^{*}Each same day's sample of OC kimchi was significantly different from CC kimchi at the p<0.05 level by Student's t-test

또한 Table 2-20에서 보는 바와 같이 SOS chromotest에서도 비슷하게 MNNG의 돌연변이 유발성을 감소시켰다(p<0.05). 적당히 익은 김치(6일)과 과숙한 김치(9일)가 덜 익은 김치보다 활성이 좋았다. 결국 김치재료의 종류에 의해 암예방 활성이 증가되는 것으로 나타났다.

Table 2-20. SOS response of methanol extract from common Chinese cabbage(CC) kimchi and organic Chinese cabbage(OC) kimchi fermented at 15°C(1.25 µg/assay) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 50ng/ assay) in *E. coli* PQ37

Sample	β-galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		(β)/(p) ¹	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD ₄₂₀	Unit ²	OD ₄₂₀	Unit			
Spon.	0.695±0.05	23.2	0.569 ± 0.02	18.7	1.2	1.0	
Control	1.796±0.07	59.0	0.553 ± 0.01	18.4	3.2	2.6	
CC Kimchi							
0 days	1.518±0.06	50.6	0.512 ± 0.03	17.1	3.0	2.4	12
3 days	1.598±0.12	53.3	0.539 ± 0.02	18.0	3.0	2.4	12
6 days	1.511±0.06	50.4	0.566 ± 0.02	18.9	2.7	2.2	27
9 days	1.560±0.01	52.0	0.587 ± 0.04	19.6	2.7	2.2	27
OC Kimchi							
0 days	1.350±0.07	45.0	0.521 ± 0.01	17.4	2.6*	2.1	31
3 days	1.137±0.02	37.9	0.485 ± 0.02	16.2	2.3*	1.9	43
6 days	0.982±0.02	32.7	0.478 ± 0.02	15.9	2.1*	1.7	58
9 days	1.001±0.03	33.4	0.472 ± 0.01	15.8	2.1*	1.7	55

¹ β-galactosidase/Alkaline phosphatase

$$^2 \text{Enzyme unit} = \frac{1000 \times A_{420}}{t}$$

*Each same day's sample of OC kimchi was significantly different from CC kimchi at the p<0.05 level by Student's t-test

(3) F344/NHSD랫드를 이용한 GST-P양성병소 발생에서 유기배추김치의 항발암효과

Table 2-21에서 보는 바와 같이 체중에서의 1군(대조군) 및 2군(유기농법김치 처리군) 사이의 유의성은 관찰되지 않았다. 또한 간중량에서도 1군 및 2군 사이의 유의성은 관찰되지 않았다 (Table 2-22). 한편 GST-P 양성병소의 수에 있어서 발암촉진물질로서 2-AAF를 투여한 1군은 13.8±6.4개/cm², 2-AAF와 함께 유기농법 배추김치의 메탄올추출물(15°C에서 6일 발효)을 투여한 2군은 8.8±4.3개/cm²로 관찰되었다. GST-P 양성병소의 면적에 있어서도 1군은 0.86±0.62mm²/cm², 2군은 0.30±0.16 mm²/cm²로 관찰되어 GST-P 양성병소의 수 및 면적 모두 통계학적 유의성은 없었지만 1군에 비하여 2군에서 수 및 면적의 평균치가 감소하였다 (Table 2-23).

Table 2-21. Body weight

(Unit: g)

Group	Treatment	No. of rats	week			
			0	2	5	8
1	2-AAF	5	95.6±4.9	148.8±10.7	225.9±21.1	265.5±29.1
2	2-AAF+Kimchi	5	96.3±3.2	149.2±7.7	215.7±18.0	259.6±18.4

Data are presented as mean±SD.

Table 2-22. Liver weight

Group	Treatment	No. of rats	Absolute liver weight (g)	Liver/body weight ratio(%)
1	2-AAF	5	9.97±1.19	3.76±0.18
2	2-AAF+Kimchi	5	9.81±1.07	3.77±0.20

Data are presented as mean±SD.

Table 2-23. Numbers and areas of GST-P positive liver cell foci

Group	Treatment	No. of rats	GST-P positive foci	
			No./cm ²	Area (mm ² /cm ²)
1	2-AAF	5	13.8±6.4	0.86±0.62
2	2-AAF+Kimchi	5	8.8±4.3	0.30±0.16

Data are presented as mean±SD.

이 연구에서 사용한 김치의 항암성 실험방법은 김 등이 개발한 비수술적 중기발암성 검색법으로서 그 검색능력이 여러 가지 화학물질에 대하여 밝혀졌다. 또한 이방법의 모체가된 DEN-PH Model은 250여가지의 화학물질에 대한 결과가 우수한 것으로 알려져 있다. 본 연구결과 중에서 가장 중요한 것은 간조직에서 관찰된 GST-P 양성병소이다. 간 전암병변의 지표효소로서 널리 사용되어 왔던 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)와 GST-P의 간 전암병변에 대한 지표능을 비교한 결과, GST-P는 γ -GTP로 검색할 수 없는 작은 전암병소의 구분이 가능하며, 전암병소에 대한 염색성이 더 확실하다고 하였다. 또한 GST-P는 발암물질을 포함한 여러 약물에 의하여, 전암병소의 출현전에 비특이적으로 유도되는 경우가 드물다고 하였다. GST-P는 간 전암병변의 지표효소로서 제안된 후 특성이 많이 밝혀졌으며, 발암과 관련하여 이효소의 유전자는 5'-upstream region에 TRE-like sequence를 가지며 oncogene인 c-jun 단백질인 AP-1이 이 TRE sequence에 결합하여 이 유전자의 발현을 자극한다고 알려져 있다.

본 연구결과, 발암촉진 물질인 2-AAF와 김치 추출물을 함께 투여한 군이 2-AAF만을 투여한 군에 비하여, 통계학적 유의성은 없었지만 GST-P 양성병소의 수 및 면적의 평균치가 감소하였다는 것은 2-AAF에 의하여 야기되는 전암병변을 억제할 수 있다는 가능성을 보여준다고 하겠다. 통계학적인 유의성이 관찰되지 않은 것은 사용한 동물수가 적은 것과 동물별 개체차가 심하다는 것이 원인으로 사료된다. 김치 추출물의 투여용량인 920 mg/kg/day는 성인의 김치 섭취량의 약 4배 정도의 용량이다. 군당 사용 동물수를 늘리고 개체차가 적은 동물을 선택하고 임상 용량도 추가하여 full scale의 연구를 진행하면 좋은 결과가 나오리라 생각된다.

(4) 유기배추김치의 소핵유발억제효과

일반배추김치보다 항돌연변이 활성이 좋았던 유기배추김치(적당히 익은 김치, pH

4.3)추출물을 이용해 *in vivo*에서도 암예방효과가 있는지를 소핵실험을 통해 연구하였다.

설치류의 적혈구를 target으로 한 소핵시험은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 cytogenic 시험법이다. 소핵은 유핵의 적혈구 모세포로부터 무핵의 성숙 적혈구가 분화되는 과정중에 자연발생적으로 또는 clastogen에 의해 염색체 절단이나 세포분열의 기작이상으로 형성된 염색체 조각이나 염색체가 세포분열의 telophase 시기에 양극으로 끌려가지 못함으로 인해 형성된다. Acridine orange 형광염색시 acridine orange는 DNA 성분인 소핵과 결합하여 황록색의 형광을 발하고, RNA와 결합하게 되면 적색 형광을 발하게 된다. 말초혈액을 이용한 소핵시험은 Type I, II, III의 망상적혈구를 계수하며, 이들 중 소핵을 함유하는 망상적혈구(micronucleated reticulocyte)의 빈도를 계수하여 Cochran Armitage 법에 의한 통계처리로 유의성을 평가하였다.

김치시료의 소핵유발 억제효과 연구에 대한 시험을 수행하기에 앞서 김치시료(메탄올추출물) 자체의 소핵시험을 수행하여 김치시료가 소핵을 유발하지 않음을 확인하였고, 소핵유발물질인 mitomycin C(MMC)를 주사하여 소핵을 유발시킨 mouse에게 각 김치시료를 MMC와 동시투여(co-treatment), 전투여(pre-treatment), 후투여(post-treatment)로 투여하여 각각의 경우 MMC에 의한 소핵 유발능의 억제효과를 관찰하였다.

(가)김치시료에 대한 소핵시험

유기배추김치를 최고용량인 1,000mg/kg으로 1회 경구투여하여 36, 48, 60시간후 마우스의 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취한 다음 소핵의 유발빈도를 계수한 결과 60시간을 소핵 유발 최적시간으로 결정하였다. 최고용량에 대한 공비 2로 설정된 500, 250mg/kg의 용량에 대해 최적시간에서의 혈액을 채취하여 유발된 소핵을 계수하였다. 그 결과는 Table 2-24와 같다. 각각의 결과에 대해 이항분포를 통한 검정(유의수준 0.05)을 수행하였고, 각 시험군은 음성대조군에 비해 통계학적 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 이에 따라 본 시험 조건하에서 유기배추김치시료는 소핵을 유발하지 않는 것으로 판정되었다.

(나) MMC로 유도된 마우스에서의 김치시료의 소핵형성억제효과

유기배추김치메탄올추출물 250, 500 그리고 1000mg/kg의 각 용량을 MMC 1mg/kg용량과 병행 투여하였다. 병행투여를 MMC투여의 3시간 전투여, 동시투여, 그리고 3시간 후 투여로 하였다. Fig. 2-3에서 볼 수 있듯이 유기배추김치의 경우는 MMC 투여후 3시간 경과시 경구투여한 post-treatment 군의 최고용량인 1000mg/kg 군에서 유의성 있는 소핵억제효과를 나타내었다.

Table 2-24. MNRET frequency in the mouse peripheral blood of mICR mouse by organic chinese cabbage kimchi

	Route	Dose (mg/kg)	Number of mouse	Sampling time(hr)	MNRET ¹ (% , mean±SD)
Negative control ²			6	48	0.22±0.06
Mitomycin C	IP ³	1	6	48	3.77±0.77
Organic Chinese cabbage kimchi	PO ⁴	1000	6	36	0.22±0.13
		1000	6	48	0.20±0.06
		500	6	60	0.29±0.14
		250	6	60	0.21±0.06

¹Micronucleated reticulocyte, 2000 reticulocytes per mouse were counted

²Peripheral blood was obtained from non-treated mice

³Intraperitoneal administration ⁴Oral administration

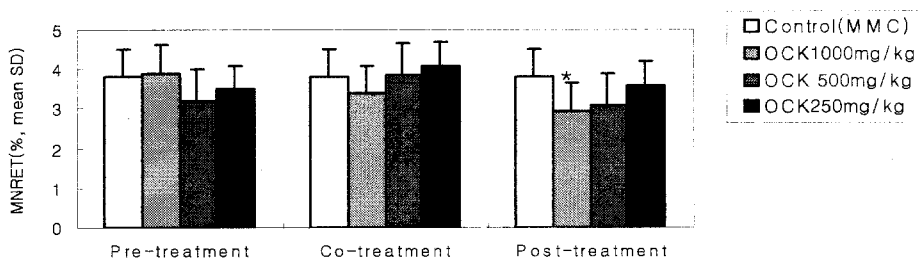


Fig. 2-3. Anticlastogenic effect of organic Chinese cabbage kimchi(OCK) in MMC-induced mice using *in vivo* supravital staining micronucleus assay

*p<0.05

2) 소금종류에 대한 암예방 기능성 증진

가) C3H/10T1/2 cell에서 다른 방법으로 제조된 김치의 항발암성

Table 2-25는 표준화된 배추김치와 소금의 종류를 달리한 김치 및 배추의 종류를 달리한 김치의 메탄올추출물이 MCA에 의한 세포독성을 저해하는 효과가 있는지를 측정하기 위해 cytotoxicity test를 행한 결과이다. Cytotoxicity는 colony형성의 저해 정도에 의해 결정되어질 수 있는데, 천일염과 신가락 1호 배추로 담근 표준화 배추김치는 0.5%와 1.0%농도에서 각각 27%와 55%의 cytotoxicity저해효과를 나타내었고, 천일염 대신 구운소금으로 담근 배추김치는 이 보다 높은 효과를 보여 1.0%농도에서 64%의 cytotoxicity저해효과를 나타내었으며 정제염인 한주소금으로 담근 김치는 MCA에 의한 cytotoxicity저해효과를 거의 나타내지 못했다. 또 유기배추로 담근 배추김치는 표준화된 배추김치(신가락 1호)에 비해 높은 cytotoxicity저해효과를 보여 1.0% 농도에서 64%의 저해효과를 보였다.

위의 결과로부터 정제염인 한주소금으로 담근 김치를 제외하고는 배추김치의 메탄올추출물은 1.0% 농도에서 발암물질인 MCA에 의한 cytotoxicity를 50%이상 저해함을 알 수 있었고, 특히 구운소금으로 담근 김치와 유기배추로 담근 김치가 높은 저해효과를 가짐을 관찰 할 수 있었다. 이로서 유기농법배추와 구운소금을 재료로 사용할 경우, 암예방효과를 증진시킬 수 있으리라 생각된다.

Table 2-25. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthrene(MCA, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and MCA plus methanol extracts from different kinds of kimchi

Carcinogen + Sample (%)		Cell colony	Cytotoxicity
MCA (control)		18.3±0.6	
MCA + Standardized kimchi	0.5	23.3±3.8	1.27
	1.0	28.3±5.5	1.55
MCA + Hanju salt kimchi	0.5	24.7±2.1	1.34
	1.0	20.7±2.1	1.10
MCA + Gueun salt kimchi	0.5	24.6±3.8	1.34
	1.0	30.0±6.2	1.64
MCA + KCl kimchi	0.5	25.7±6.0	1.40
	1.0	28.7±2.9	1.53
MCA + Organic cultivated baechu kimchi	0.5	23.3±1.5	1.27
	1.0	30.0±2.6	1.64

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

3) 고춧가루의 영양 및 부위별 항돌연변이 활성 연구

모든 김치에 주요 부재료로 사용되는 고춧가루는 영양성분이 많을 뿐 아니라 김치의 색깔을 내며, 생리기능성 면에서 중요하게 작용하였다. 본 연구에서는 고춧가루 종류에 따라 비타민 C와 carotenoids함량 검토와 안전성 측면에서 고추의 부위별로 (항)돌연변이 유발성을 검토하여 어느 부위 첨가로 고춧가루의 암예방 가능성이 유리할 지를 측정하였다.

가) 고춧가루 품종, 생산지 및 가공에 따른 vitamin C와 carotenoid함량 연구

고춧가루가 김치에서 차지하는 역할이 지대하므로 이에 대한 기초연구로 올바른 고춧가루 선택과 영양성을 품종, 산지 및 가공방법에 따라 비교하였다.

Table 2-26에서 보는 바와 같이 고춧가루에 따라서 비타민 C의 함량은 조홍이 가장 높고 고추의 산지 중에는 순창이 가장 좋았다. 한편 동결건조한 시료에서 비타민 C는 풋고추가 933mg%였는데 건조고추는 122였고 홍고추는 604로 말린 것 보다 냉동건조방법이 5배 정도 vitamin C함량이 높았다. 한편 총 carotenoid함량은 명품이 가장 많았고 조홍이 역시 carotenoid 함량도 높았다. 산지별로는 이천이 가장 높았다. 동

결건조시료에서도 홍고추가 건조고추보다 2배 정도가 많았다. 또한 안동고추의 과피와 씨를 비교해 본 결과 vitamin C는 과피는 $307 \pm 4 \text{mg\%}$ 였는데 씨는 $28 \pm 3 \text{mg\%}$ 으로 약 10배 정도 과피에 비타민 C가 많아 과피만으로 제조된 고춧가루가 비타민 C함량이 높다 하겠다. 그리고 carotenoid는 과피가 $2484 \pm 73 \mu\text{g/g}$ 인데 씨는 $21 \pm 1 \mu\text{g/g}$ 로 약 100배의 차이를 나타내어 고춧가루의 주요 비타민 함량은 과피만으로 조제된 것이 많다고 하겠다.

Table 2-26. Vitamin C and carotenoids contents of various kinds of red pepper powder

Variety	Total vitamin C (mg%)	Dehydroascorbic acid (mg%)	Carotenoid ($\mu\text{g/g}$)
Johong(조홍)	231 ± 6	125 ± 3.7	4620 ± 299
Deamyung(대명)	168 ± 3	82 ± 4.0	2860 ± 84
Myungpum(명품)	165 ± 5	93 ± 3.5	6276 ± 209
Chungyang(청양)	202 ± 4	136 ± 12	3550 ± 263
Producing district			
Changnyung(창녕)	156 ± 5	98 ± 4.0	2456 ± 67
Soonchang(순창)	253 ± 5	124 ± 4.1	2508 ± 5
Leechun(이천)	213 ± 4	97 ± 5.7	3988 ± 107
Andong(안동)	225 ± 4	124 ± 4.3	2916 ± 175
Var. Nogkwang(녹광, freeze dried)			
Green pepper	933 ± 4	274 ± 3.7	0233 ± 4
Red pepper	604 ± 5	209 ± 5.1	5876 ± 197
Dried red pepper	122 ± 6	78 ± 2.8	2504 ± 79

나) 고춧가루의 항돌연변이 효과

(1) 고춧가루 부위별 (항)돌연변이 차이

고춧가루 제조시 고추씨가 혼합되는 양이 중요하고 또 최종색깔에 영향을 줄 수 있으므로 부위별 기능성을 검토하였다. Table 2-27에서 보는 바와 같이 고추의 다른 부위와 고춧가루 자체는 AFB₁에 대해 항돌연변이 효과를 나타내었는데 과피는 돌연변이 유발억제효과가 없었다. MNNG발암원에 대해서는 고춧가루 자체와 각 부위들이 항돌연변이 활성이 없고 오히려 약간의 보돌연변이성이 있었다.

(2) 고춧가루 종류별 항돌연변이 효과

고춧가루의 재배방법, 품종, 재배지역 등의 종류에 따른 항돌연변이 활성을 검토한 결과 일반고춧가루보다 유기고춧가루(유기농법으로 재배)가 항돌연변이효과가 컸었고 (Table 2-28), 품종으로는 명품과 청양이 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과가 컸었고 MNNG에 대한 항돌연변이 효과는 청양이 첨가농도 2.5mg/plate에서 높게 나타났었다 (Table 2-29~31).

Table 2-27. Effect of the methanol extract from various parts of red pepper and red pepper powder on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 1.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of methanol extract, mg/plate)		
	0.63	1.25	2.5
Spontaneous	148 \pm 8		
AFB ₁ (Control)	1034 \pm 47		
AFB ₁ +pericarp	884 \pm 23(17) ¹	1055 \pm 27(-)	1227 \pm 23(-)
AFB ₁ +seed	438 \pm 8(67)	397 \pm 8(72)	343 \pm 24(78)
AFB ₁ +placenta	822 \pm 13(24)	601 \pm 27(49)	435 \pm 3(68)
AFB ₁ +red pepper powder	910 \pm 15(14)	784 \pm 20(28)	695 \pm 22(38)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 2-28. Effect of the methanol extract from various parts of red pepper and red pepper powder on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG, 0.3 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of methanol extract, mg/plate)		
	0.63	1.25	2.5
Spontaneous	105 \pm 18		
MNNG(Control)	1355 \pm 28		
MNNG+pericarp	1051 \pm 19(24) ¹	1258 \pm 26(8)	1428 \pm 27(-)
MNNG+seed	1300 \pm 18(4)	1123 \pm 21(19)	911 \pm 51(36)
MNNG+placenta	1571 \pm 18(-)	1492 \pm 10(-)	1424 \pm 8(-)
MNNG+red pepper powder	1648 \pm 27(-)	1532 \pm 9(-)	1469 \pm 12(-)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 2-29. Antimutagenic effect of organically and generally cultivated dried red pepper powder(producing district was Milyang) against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, mg/plate)	
	1.25	5.0
Spontaneous	115 \pm 10	
Control(AFB ₁)	1169 \pm 34	
Organically cultivated red pepper powder	552 \pm 20 (59)	791 \pm 23 (36)
Generally cultivated red pepper powder	797 \pm 31 (35)	904 \pm 40 (25)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 2-30. Antimutagenic effect of methanol extracts from various variety of dried red pepper against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	107 ± 6	
Control(AFB ₁)	1246 ± 28	
Daimyung	827 ± 28 (38)	983 ± 29 (23)
Myungpum	670 ± 24 (51)	966 ± 10 (25)
Johong	936 ± 14 (27)	977 ± 12 (22)
Chungyang	751 ± 30 (43)	942 ± 35 (27)

Table 2-31. Antimutagenic effect of methanol extracts from various dried red pepper against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 0.4µg/assay) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	116 ± 7	
Control(MNNG)	1243 ± 21	
Daimyung	1134 ± 29 (10)	926 ± 17 (28)
Myungpum	863 ± 52 (34)	1082 ± 30 (14)
Johong	1015 ± 15 (20)	916 ± 21 (29)
Chungyang	1067 ± 29 (16)	502 ± 6 (65)

재배 지역에서는 안동, 괴산, 이천의 고춧가루가 1.25mg/plate에서 항돌연변이 효과가 컸고 영광고춧가루가 다른 것에 비하여 낮은 결과를 보였다(Table 2-32). 일반적으로 고춧가루는 모두 항돌연변이 효과가 있었으며 산지별 또는 품종에 따라 그 활성 정도가 달랐다. 품종으로는 명품이, 산지별로는 안동, 괴산, 이천이 항돌연변이 효과가 좋았다. 재배방법으로는 유기농산물이 좋은 것으로 나타났다. 특징 중 하나는 농도가 증가함에 따라 항돌연변이성이 전반적으로 감소됨을 보여주고 있다.

(3) 과피와 종자 비율을 달리한 안동 고춧가루를 첨가한 김치의 기능성 연구

10% 구운 소금으로 10시간 절인 배추 100에 대해 고춧가루 7, 마늘 1.4, 생강 0.6, 멸치젓 2.2, 설탕 1, 무 13, 파 2, 갓 5, 초피 0.5를 첨가하고 최종염도는 KCl을 첨가하여 2.5%로 맞추었다. 여기에 부재료로 첨가하는 고춧가루를 과피와 종자로 나누어서 고춧가루 전체를 넣는 경우(A), 과피만을 넣는 경우(B), 과피와 종자의 비율을 1:1로 한 경우(C), 종자만을 넣은 경우(D)의 4가지로 분류하여 15°C에서 김치를 발효시키면서 적숙기때 각각 다르게 처리한 고춧가루를 첨가한 김치 추출물의 기능성을 SOS chromotest와 Ames test로 살펴보았다.

Table 2-32. Antimutagenic effect of methanol extracts from various producing district of dried red pepper against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	124 \pm 11	
Control(AFB ₁)	1207 \pm 31	
Youngyang	1053 \pm 26 (14)	887 \pm 53 (30)
Andong	796 \pm 20 (39)	935 \pm 32 (25)
Changnyoung	946 \pm 6 (24)	1044 \pm 19 (15)
Jungop	945 \pm 38 (24)	1071 \pm 59 (13)
Youngkwang	1008 \pm 9 (9)	1112 \pm 54 (14)
Soonchang	912 \pm 19 (27)	1179 \pm 55 (3)
Jechun	919 \pm 25 (27)	1032 \pm 44 (16)
Koisan	828 \pm 41 (35)	1079 \pm 23 (12)
Leechun	793 \pm 46 (38)	922 \pm 27 (26)

종자로 담은 김치(D)는 3일째 pH가 4.3이었고 과피와 종자의 비율을 1:1로 담은 김치(C)는 4일째 pH가 4.3이었고 과피로 담은 김치(B)와 고추전체로 담은 김치(A)는 6일째 pH가 4.2였다. 즉 종자만으로 또는 종자가 많이 첨가된 고춧가루로 담은 김치는 매우 빠르게 발효되는 특성을 나타내었다.

Table 2-33에서 보는 바와 같이 과피로 담은 김치는 SOS chromotest에서 SOS반응억제효과가 가장 낮았고 고추전체를 넣은 김치와 과피와 종자의 비율이 1:1인 김치는 각각 45, 50%의 SOS반응억제효과를 나타냈고 종자로 담은 김치는 61%의 SOS반응억제효과를 나타냈다. 종자의 불포화 지방산이 SOS 반응억제효과에 영향을 주는 것으로 생각되어진다.

Table 2-33. SOS response of various kinds of kimchi juice(10 μ l) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		SOS induction factor (β)/(ρ)	Inhibition rate(%)	
	OD420	Unit	OD420	Unit			
	Spontaneous	0.312	10.4	0.271			9.0
Control(MNNG)	0.689	23.0	0.262	8.7	2.64	2.29	
A	0.706	23.5	0.358	11.9	1.97	1.71	45
B	0.748	24.9	0.340	11.3	2.20	1.91	29
C	0.683	22.7	0.358	11.9	1.90	1.65	50
D	0.480	16.0	0.279	9.3	1.72	1.50	61

A: Whole red pepper powder added kimchi B: Pericarp powder only added kimchi
C: Pericarp : Seed(1:1) added kimchi D: Seed powder only added kimchi

간접돌연변이원 AFB₁을 발암원으로 사용한 Ames test(Table 2-34)에서 과피로 담은 김치는 48%의 저해효과를 나타냈고 과피와 종자를 1:1의 비율로 담은 김치와 종자로 담은 김치가 각각 62, 63%의 저해효과를 나타냈다. AFB₁에 대한 고추의 과피, 태좌, 종자의 antimutagenicity test에서도 종자는 78%의 저해효과가 있었다. 그러나 종자 김치는 과피로 담은 김치에 비하여 초피냄새가 거의 나지않는 점은 있었지만 pH가 빨리 떨어지고 색깔이 붉지 않아 식미가 적고 종자는 곱게 분말화하는 것이 어려워서 씹을 때 종자가 씹히는 느낌이 들었다. 그래서 종자김치는 암예방 기능성은 있었지만 상품화하기에는 문제가 있는 것으로 나타났다.

Table 2-34. Antimutagenic effect of various kinds of kimchi juice against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, μ l/plate)	
	100	200
Spontaneous	125 \pm 7	
Control(AFB ₁)	1305 \pm 19	
A	916 \pm 33(30) ¹⁾	685 \pm 21(53)
B	984 \pm 17(27)	738 \pm 13(48)
C	842 \pm 33(39)	842 \pm 9(62)
D	794 \pm 13(43)	794 \pm 13(63)

A: Whole red pepper powder added kimchi B: Pericarp powder added kimchi

C: Pericarp : Seed(1:1) added kimchi D: Seed powder added kimchi

¹⁾Inhibition rate

(4) 과피와 종자의 비율을 달리한 영양고춧가루 김치의 기능성 연구

10% 구운 소금으로 10시간 절인 배추 100에 대해 고춧가루 5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 멸치젓 2.2, 설탕 1, 무 13, 파 2, 갓 5, 초피 0.5를 첨가하고 최종염도는 KCl을 첨가하여 2.5%로 맞추었다. 여기에 시판용 영양고춧가루로 담은 김치(A), 영양건조고추를 구입하여 고추전체를 넣어 담은 김치(B), 과피와 종자의 비율을 1:1로 한 김치(C), 과피와 종자의 비율을 3:7로 하여 담은 김치(D)를 담아서 15 $^{\circ}$ C에서 발효시켰다. pH는 A와 B는 6일째 4.2였고 C는 4일째 4.3이었고 D는 4.5였다. 안동고춧가루로 과피와 종자의 비율을 달리하여 담은 김치와 pH에서 비슷한 결과를 얻었다.

시판용 영양농협 고춧가루는 종자가 제조과정에서 분실되어 제품에서는 10-20%정도 함유되어 있어서 종자의 양이 원래 고추에 있었던 양보다 적다. 그래서 고추 전체를 고춧가루로 만든 고춧가루와 시판용 고춧가루를 SOS chromotest로 SOS반응억제효과를 알아보았다. 시판용 영양농협 고춧가루로 담은 김치와 고추전체로 담은 김치의 SOS반응억제효과는 36%, 38%로 별 차이가 없었고 고추와 종자의 비율이 1:1인 김치가 83%로 가장 높았고 과피와 종자의 비율이 3:7인 김치가 78%로 높은 SOS억제효과를 나타냈다(Table 2-35).

Table 2-35. SOS response of various kinds of kimchi juice(10 μ l) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		$(\beta)/(\rho)$	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD420	Unit	OD420	Unit			
Spontaneous	0.355	11.8	0.347	11.6	1.02	1.00	
Control(MNNG)	0.692	23.0	0.340	11.3	2.04	2.00	
A	0.620	20.6	0.370	12.3	1.67	1.64	36
B	0.624	20.8	0.380	12.6	1.65	1.62	38
C	0.450	15.0	0.377	12.6	1.19	1.17	83
D	0.472	15.7	0.382	12.7	1.24	1.22	78

A: Youngyang nonghyup red pepper added kimchi B: Youngyang red pepper added kimchi

C: Pericarp: Seed(1:1) added kimchi D: Pericarp: Seed(3:7) added kimchi

한편 Ames test(Table 2-36)에서는 시판용 영양농협 고춧가루로 담은 김치가 200 μ l/assay 첨가농도에서 61%의 돌연변이 억제효과를 나타냈고 고추와 종자의 비율이 1:1인 김치가 77%로 가장 높았고 과피와 종자의 비율이 3:7인 김치도 76%로 높은 돌연변이 억제효과를 나타냈다. 그렇지만 앞에서도 지적되었듯이 종자를 많이 넣은 김치가 기능성면에서는 좋았지만 종자의 완전한 분말화가 어려워져서 입에 씹히는 느낌이 있었고 pH가 빨리 떨어지는 면이 있었고 붉은 색이 적어서 식미가 나지 않는 문제점이 있기에 종자를 적당량(시판) 넣는 것이 필요하다.

Table 2-36. Antimutagenic effect of various kinds of kimchi juice against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of sample, μ l/plate)	
	100	200
Spontaneous	114 \pm 6	
Control(AFB ₁)	1011 \pm 33	
Youngyang nonghyup red pepper added kimchi	745 \pm 36(30) ¹⁾	468 \pm 12(61)
Youngyang red pepper added kimchi	536 \pm 7(53)	421 \pm 15(66)
Pericarp: Seed(1:1) added kimchi	427 \pm 20(65)	318 \pm 9(77)
Pericarp: Seed(3:7) added kimchi	438 \pm 14(64)	326 \pm 18(76)

¹⁾Inhibition rate

(5) 고춧가루 첨가량을 달리한 김치의 기능성 연구

고춧가루 7%를 첨가하는 것이 암예방 및 항암 김치를 만드는데 너무 많은 양인 것 같아 고춧가루의 기능성이 떨어지지 않는 범위내에서 고춧가루 양을 조절하려고 영양태양초 고춧가루양을 3.5, 5, 7%로 달리하여 김치를 담구어서 15 $^{\circ}$ C에서 발효시켰다. pH는 5일째 7%고춧가루를 넣은 김치가 4.5, 5%고춧가루를 넣은 김치가 4.3, 3.5%고춧

가루를 넣은 김치가 4.2였다. 고춧가루양이 증가함에 따라 pH가 서서히 감소하는 경향이였다. 고춧가루 첨가농도 3.5% 또는 5% 김치의 SOS반응억제효과는 35, 36%였고 7%는 42%였으며 세종류 김치는 고춧가루 양에 따른 SOS반응억제효과는 차이가 거의 없었다(Table 2-37).

Table 2-37. SOS response of various kinds of kimchi juice(10 μ l) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		$(\beta)/(\rho)$	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD420	Unit	OD420	Unit			
Spontaneous	0.355	11.8	0.347	11.6	1.02	1.00	
Control(MNNG)	0.692	23.0	0.340	11.3	2.04	2.00	
A	0.631	21.0	0.375	12.5	1.68	1.65	35
B	0.620	20.6	0.370	12.3	1.67	1.64	36
C	0.608	20.3	0.378	12.6	1.61	1.58	42

A: 3.5% red pepper added kimchi B: 5% red pepper added kimchi C: 7% red pepper added kimchi

한편 Ames test에서는 3.5% 고춧가루를 넣은 김치는 55%의 돌연변이 저해효과를 나타냈고 5%와 7%를 첨가한 김치는 61%와 63%의 돌연변이 억제효과를 나타내었다(Table 2-38). 3.5%보다는 5%나 7%고춧가루를 넣은 김치가 돌연변이 억제효과가 높았다.

Table 2-38. Antimutagenic effect of various kinds of kimchi juice against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, μ l/plate)	
	100	200
Spontaneous	114 \pm 6	
Control(AFB ₁)	1011 \pm 33	
3.5% red pepper added <i>kimchi</i>	814 \pm 14(22) ¹⁾	522 \pm 18(55%)
5% red pepper added <i>kimchi</i>	745 \pm 36(30)	468 \pm 12(61%)
7% red pepper added <i>kimchi</i>	762 \pm 20(28)	444 \pm 8(63%)

¹⁾Inhibition rate

관능면(기호도 조사)에서 보면 7%고춧가루를 넣은 김치는 초피냄새는 거의 나지 않았지만 고춧가루가 많아 텁텁한 느낌을 주었고 5%고춧가루를 넣은 김치는 초피냄새도 거의 나지않고 텁텁한 느낌도 없었고 색도 식미가 날 정도의 붉은 색이었고 맛도 가장 좋았다. 3.5%고춧가루를 넣은 김치는 암예방 기능성 김치에 첨가하는 초피냄새가 많이 낮기에 초피를 싫어하는 사람에게는 거부감을 주었다. 이런 실험결과로 부터 초피냄새는 적게 나고 맛도 좋고 SOSchromotest와 Ames test에 의한 돌연변이 유발억제 기능성면에서도 결과가 좋은 5%고춧가루를 넣은 김치가 가장 적당한 것으로 나타났

다.

4) 양념류 첨가에 의한 암예방 증진 연구(초피, 갓 등)

가) 부재료를 첨가한 배추김치의 항돌연변이 증진효과

암예방 효과를 증진시키기 위해 일반 표준화된 김치를 기준으로 해서 암예방 활성이 있는 부재료, 주재료 등을 이용하여 암예방 김치제조를 시도하였다.

(1) Ames 실험계

부재료의 양을 달리하거나 암예방 가능성이 있는 재료를 첨가하여 담근 13종류의 배추김치메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-39에 나타내었다. 표준화된 배추김치의 경우, AFB₁에 대한 돌연변이 유발을 66%억제하였으며, 이에 비해 마늘을 고농도(5.2%)로 첨가한 김치와 마늘과 고춧가루를 각각 2.8%, 7% 첨가한 김치가 75%이상의 더 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 또 갓을 5% 첨가한 김치와 인삼가루를 1% 첨가한 김치도 돌연변이 유발을 크게 억제하였으며, 특히 갓 첨가김치의 경우 86%의 저해효과를 보였다. 유기배추로 담근 배추김치도 표준화 김치에 비해 더 높은 항돌연변이 효과를 보여 AFB₁에 대한 돌연변이 유발을 80% 억제하였다. 따라서 마늘을 고농도로 첨가한 김치, 갓과 인삼가루를 첨가한 김치와 유기배추김치가 표준화 배추김치에 비해 항돌연변이 효과가 증진되었으므로 이들 부재료 첨가를 이용한 암예방김치 제조를 시도하였다.

Table 2-39. Effect of the methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment(2.5mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous	118±14	
AFB ₁ (Control)	1099±77 ^a	
Standardized kimchi	456±29 ^{de}	66
10.5% red pepper powder(RPP) added kimchi	449±38 ^{de}	66
5.2% garlic added kimchi	360±50 ^{fg}	76
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	357±49 ^{fg}	76
5% leaf mustard added kimchi	261±5 ^h	86
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	438±16 ^{de}	68
1% chinese pepper powder added kimchi	436±17 ^{ef}	68
1% cinnamon powder added kimchi	496±73 ^d	62
1% ginseng powder added kimchi	401±16 ^{ef}	71
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	601±16 ^c	51
1% sodium alginate added kimchi	672±60 ^{bc}	41
1% sweet tea extract added kimchi	677±28 ^b	43
Organic chinese cabbage kimchi	314±47 ^{gh}	80

^{a-f}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

(2) SOS chromotest

MNNG를 이용한 SOS chromotest에서도 Ames 실험계에서의 결과와 비슷한 효과가 나타났는데(Table 2-40) 고춧가루, 마늘, 초피, 유기배추김치가 암예방효과가 높아 유기배추를 주재료로 하고 고춧가루와 마늘의 함량을 높이고 초피첨가도 항돌연변이 효과를 올릴수 있다고 사료되어 이들 부재료의 첨가량을 달리한 김치제조시 맛, 보존성, 암예방효과 등을 측정하였다.

Table 2-40. SOS response of methanol extract from various kinds of ingredient added Chinese cabbage kimchi against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample concentration(100μg/assay)	β-Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		(β)/(p)	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit			
Spontaneous	0.669±0.00	22.3	0.439±0.01	14.6	1.52	1	
Control(MNNG)	2.667±0.01 ^a	88.9	0.416±0.02	13.9	6.41	4.22	
Standardized kimchi(SK)	2.216±0.01 ⁱ	73.9	0.463±0.02	15.4	4.79	3.15	33.2
10.5% RPP ¹ added SK	1.974±0.07 ⁿ	65.8	0.464±0.01	15.5	4.25	2.80	44.1
5.2% garlic added SK	1.966±0.01 ^h	65.5	0.469±0.01	15.6	4.19	2.76	45.3
7% RPP1+2.8% garlic added SK	1.899±0.01 ⁱ	63.3	0.451±0.01	15.0	4.22	2.78	44.7
5% leaf mustard added SK	2.182±0.03 ^g	72.7	0.448±0.01	14.9	4.87	3.20	31.7
5% codium fragile added SK	2.444±0.01 ^c	81.5	0.448±0.01	16.3	5.01	3.30	28.6
1% chinese pepper powder added SK	1.940±0.03 ^h	64.7	0.453±0.01	15.1	4.28	2.82	43.5
1% cinnamon powder added SK	2.373±0.00 ^d	79.1	0.479±0.02	16.0	4.95	3.26	29.8
1% ginseng powder added SK	2.618±0.01 ^b	87.3	0.506±0.01	16.9	5.17	3.40	25.5
1% chitosan oligosaccharide added SK	2.305±0.01 ^e	76.8	0.484±0.00	16.1	4.76	3.13	33.9
1% sodium alginate added SK	2.149±0.00 ^g	71.6	0.486±0.00	16.2	4.42	2.91	40.7
1% sweet tea extract added SK	1.815±0.03 ^g	70.5	0.476±0.01	15.9	4.44	2.92	40.4
Organic chinese cabbage SK	1.785±0.01 ^j	59.5	0.477±0.00	15.9	3.74	2.46	54.7

¹Red pepper powder

^{a-j}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

나) 부재료 종류와 첨가량을 달리하여 개발한 암예방 김치의 이화학적 특성

표준화 김치를 기본으로 부재료의 종류와 양을 달리하여 7종류의 김치를 담귀 15℃에서 발효시켜 가장 적숙기인 pH4.3일 때 즙액을 만들어 이화학적 실험을 하였다.

환원당 함량의 경우 표준화 김치에 비해 고춧가루와 마늘을 고농도로 첨가한 배추김치가 높게 나타났고, 특히 유기배추에 고춧가루, 마늘, 초피를 각각 7%, 2.8%, 0.1% 첨가한 김치가 가장 높은 환원당 함량(2.94g%)를 나타내었다(Table 2-41).

산도는 각 시료마다 큰 차이없이 유사하게 나타났으나, 고춧가루를 10.5% 첨가한 김치의 경우 산도가 다소 낮아 발효가 더디게 일어남을 알 수 있었다(Table 2-41).

젖산균은 고춧가루를 3배(10.5%) 첨가한 김치의 경우에 산패에 관여하는 *Lactobacillus* sp.는 표준화 김치보다 낮고 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.는 표준화 김치보다 높았다. 고춧가루와 마늘을 고농도로 첨가한 김치 또한 표준화 김치보다 *Lactobacillus* sp.는 낮고 *Leuconostoc* sp.는 높게 나타났다. 유기배추에 고춧가루, 마늘, 초피를 각각 7%, 2.8%, 0.1%첨가한 김치는 *Leuconostoc* sp.가 표준화 김치보다 높게 나타남을 알 수 있었다(Table 2-41). 관능검사 결과를 보면 부재료의 양이 많을수록 텁텁한 맛을 주어 종합적인 평가에 있어서 좋지 못했지만 고춧가루와 마늘을 고농도로 첨가한 김치, 유기 표준화김치, 고춧가루, 마늘, 초피를 각각 7%, 2.8%, 0.1% 첨가한 유기배추김치는 표준화 김치와 유사한 관능적 특성을 보였다(Fig. 2-4).

Table 2-41. Reducing sugar(RS), acidity, *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. of various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi fermented at 15°C up to pH4.3(4~5days)

Kimchi smple	RS (g%)	Acidity (%)	<i>Lactobacillus</i> sp. ($\times 10^5$ CFU/ml)	<i>Leuconostoc</i> sp. ($\times 10^8$ CFU/ml)
Standarzied kimchi	1.70	0.59	11.0	1.1
10.5% red pepper powder(RPP) added kimchi	2.33	0.55	9.1	14.0
5.2% garlic added kimchi	1.85	0.60	9.6	1.9
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	1.97	0.63	13.0	3.4
0.1% chinese pepper powder(CPP) added kimchi	1.71	0.59	11.0	5.3
1% CPP added kimchi	1.61	0.60	12.0	4.6
Organic cultivated chinese cabbage(OC) kimchi	1.90	0.57	9.7	2.2
7% RPP+2.8% garlic+ 0.1% CPP added OC kimchi	2.94	0.61	14.0	1.3

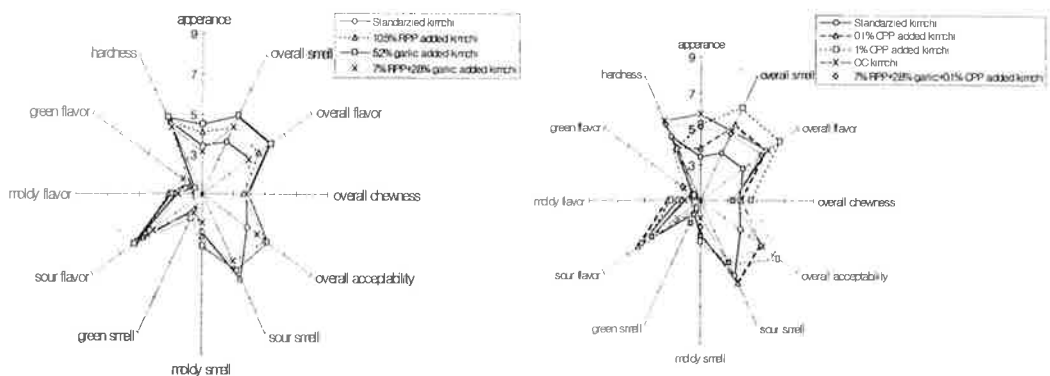


Fig 2-4. QDA profile of various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi that fermented at 15°C up to pH4.3

결론적으로 고춧가루와 마늘을 고농도로 첨가한 김치가 *Lactobacillus* sp.는 낮아 발효가 더디게 일어나면서, 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.은 높았고 관능검사에서도 종합적인 평가에서 좋았다. 또한 유기배추에 고춧가루, 마늘, 초피를 각각 7%, 2.8%, 0.1% 첨가한 김치가 환원당이 가장 높게 나타났고 *Leuconostoc* sp.도 표준화 김치보다 높게 나타났다. 그리고 초피만 첨가한 김치가 관능적 평가에서 좋지 못했던 반면 다른 양념과 섞임으로서 표준화 김치와 비슷한 관능적 평가가 나타났다.

발효가 더디게 진행되면서 환원당과 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.이 높고 관능상 표준화 김치에 가까운 김치시료를 취하고, 관능적 효과와 항암성을 높이기 위하여 갓을 첨가한 김치를 담아 15°C에서 하루 저장하고 5°C에서 pH4.3이 될 때까지 발효시켰다. 환원당 함량은 유기배추에 고춧가루와 마늘을 고농도로 첨가한 김치(2.69g%)와 유기배추에 고춧가루, 마늘, 초피, 갓을 각각 7%, 2.8%, 0.1%, 5% 첨가한 김치(2.43g%)가 높게 나타났다(Table 2-42). 산도는 거의 비슷하나 유기배추에 고춧가루, 마늘, 초피, 갓을 첨가한 김치가 표준화 김치에 비해 다소 낮아 발효가 더디게 일어남을 알 수 있었다.

Table 2-42. Reducing sugar(RS), acidity, *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. of various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi that fermented 1 day at 15°C and then fermented at 5°C up to pH4.3

Kimchi	RS (g%)	Acidity (%)	<i>Lactobacillus</i> sp. ($\times 10^7$ CFU/ml)	<i>Leuconostoc</i> sp. ($\times 10^7$ CFU/ml)
Standardized kimchi	1.72	0.52	1.4	5.3
7% RPP+2.8% garlic added OC kimchi	2.69	0.65	1.3	1.3
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP added OC kimchi	2.11	0.61	3.1	2.6
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+ 5% leaf mustard added OC kimchi	2.43	0.54	3.7	2.9

관능검사에서 양념비를 달리한 김치간의 차이는 고춧가루와 마늘을 고농도로 넣었을 때 조금 텁텁한 맛을 주어 관능적으로 다소 좋지 못했고 여기에 초피를 첨가하면 그 냄새로 개인적 취향에 따라 관능적 특성에 차이를 보였다. 그러나 고춧가루와 마늘을 고농도로 넣고 초피에 갓을 첨가하면 초피의 향이 감소되어 표준화 김치와 관능적으로 비슷한 경향을 보였다(Fig 2-5).

선정된 암예방 활성증진 김치에 대한 항돌연변이성을 보기 위해 Ames test를 하였다(Table 2-43). 1.25mg/plate 처리농도에서는 표준화김치에 비해 유기배추에 고춧가루와 마늘을 2배씩 첨가하고 초피와 갓을 넣은 김치가 65%로 훨씬 높은 처해효과를 보였고, 2.5mg/plate 처리농도에서는 표준화 김치의 45% 항돌연변이 효과에 비해 모든 활성증진 김치가 AFB₁에 대해 더 높은(70% 이상) 항돌연변이 효과를 보였다.

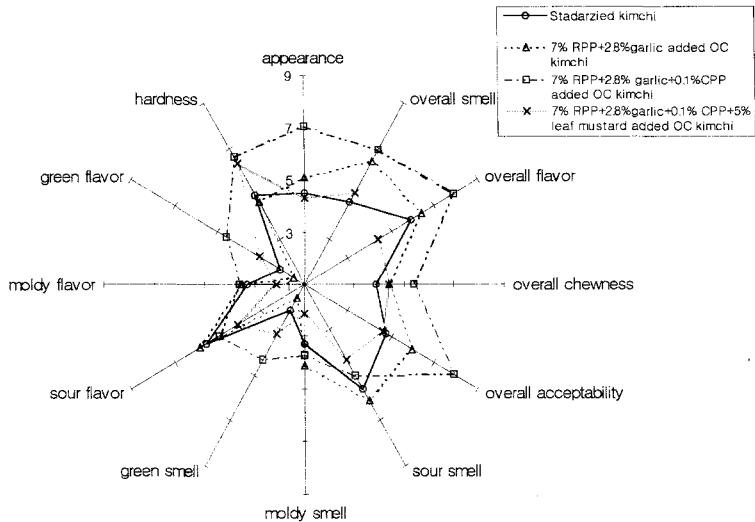


Fig. 2-5. QDA profile of various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi that fermented 1day at 15°C and then fermented at 5°C up to pH4.3

Table 2-43. Antimutagenic effect of methanol extracts from different kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μ g /plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Kimchi samples	Revertants/plate(mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	105	
AFB ₁ (Control)	706	
AFB ₁ +Standardized kimchi	422 \pm 2.8(47) ¹	436 \pm 44.6(45)
7% RPP+2.8% garlic added OC kimchi	670 \pm 33.1(19)	286 \pm 36.1(70)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP added OC kimchi	458 \pm 144.2(41)	232 \pm 53.3(79)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+ 5% leaf mustard added OC kimchi	317 \pm 83.4(65)	271 \pm 4.2(73)

¹⁾ inhibition rate

이상의 결과로부터 유기농법 재배 배추김치에 고춧가루와 마늘의 배합비를 증진시키고, 초피와 갖을 첨가함으로써 맛, 저장성 및 암예방 효과를 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또 암예방 김치의 발효방법 개선 중 유기배추의 조직이 단단하므로 소금절임방법을 개선하여 염수법과 건염법의 혼합으로 10%염도의 소금 양을 측정하고 그 중 30%와 50%를 건염법으로 하여 배추를 절였다. 그 결과 30%를 쪼개 넣어 절였을 때 잎과 줄기가 비슷하게 절여져 고르고 빠른 절임방법을 연구하였다.

나. 배추김치 발효방법에 의한 암예방 증진 연구

1) 발효기간을 달리하여 발효한 배추김치의 암예방 효과

일반적으로 김치의 암예방효과는 적숙기(pH 4.3)에 가장 높았다(Park, K. Y., Baek, K. A., Rhee, S. H. and Cheigh, H. S. : Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotechnology*, 4(3), 141(1995)). 암예방 기능성김치 I의 암예방 효과가 발효기간을 달리했을 때, 적숙기가 가장 효과가 큰지 연구해 보았다. 7%고춧가루+2.8%마늘+0.1%초피+5%갯 첨가 김치(functional kimchi)를 담그어 15°C에서 발효시키고 첫날(fresh), 적숙기(pH4.3), 과숙기(pH3.8)에 도달하였을 때의 이화학적 실험(Fig. 2-6) 및 항돌연변이, 항암실험을 행하였다. Ames test에서는 기능성김치는 fresh, 적숙기, 과숙기시 42%, 50%, 43%의 항돌연변이 효과를 각각 보여 적숙기에 활성이 가장 높았고 fresh한 상태보다는 과숙시가 더 높은 항돌연변이효과를 나타냈다(Table 2-44). 이 결과는 5°C에서 3주 발효시킨 적당히 익은 김치가 생김치보다 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity를 억제효과가 더 크게 나타났다는 결과와 일치하였다. 따라서 김치를 생으로 먹는 것보다는 잘 발효시킨 것이 암예방 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

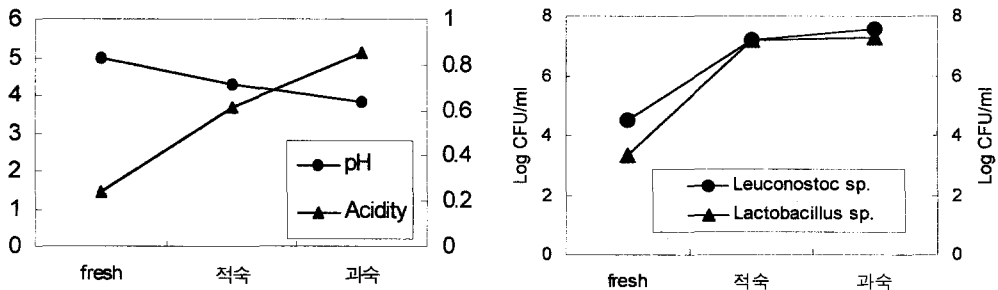


Fig 2-6. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. in kimchi that fermented with different levels of fermented at 15°C

Table 2-44. Effect of the juice from kimchi that fermented with different levels of fermented at 15°C on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0μg /plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Kimchi sample	Concentration(μl/plate)	Revertants/plate
		200
AFB ₁ (Control)		798±13.7
Spontaneous		109±10.6
AFB ₁ +Functional kimchi(fresh)		504±12.2(43) ¹⁾
Functional kimchi(optimal ripened)		456±3.6(50)
Functional kimchi(over ripened)		511±43.1(42)

¹⁾ Inhibition rate(%)

2) 온도를 달리하여 발효한 배추김치의 암예방 효과

김치의 암예방 효과를 가장 높일 수 있는 발효온도를 찾기 위하여 표준화김치에 7%고춧가루+2.8%마늘+0.1%초피+5%갓 첨가 김치를 담그고 각각 25℃, 15℃, 15℃에서 하루 방치후 5℃(15℃→5℃)에서 pH4.3에 이를 때까지 발효시키며 이화학적 실험 및 항돌연변이 실험(Ames test)을 하였다. 암예방 김치 I 은 25℃와 15℃에서 발효시킨 경우, 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.가 비슷하였고 15℃에서 하루 방치하고 5℃에서 발효시킨 경우가 가장 많이 자랐다(Fig. 2-7). *Lactobacillus* sp.역시 저온에서 발효시킨 경우에 더 증가하는 것으로 나타났다.

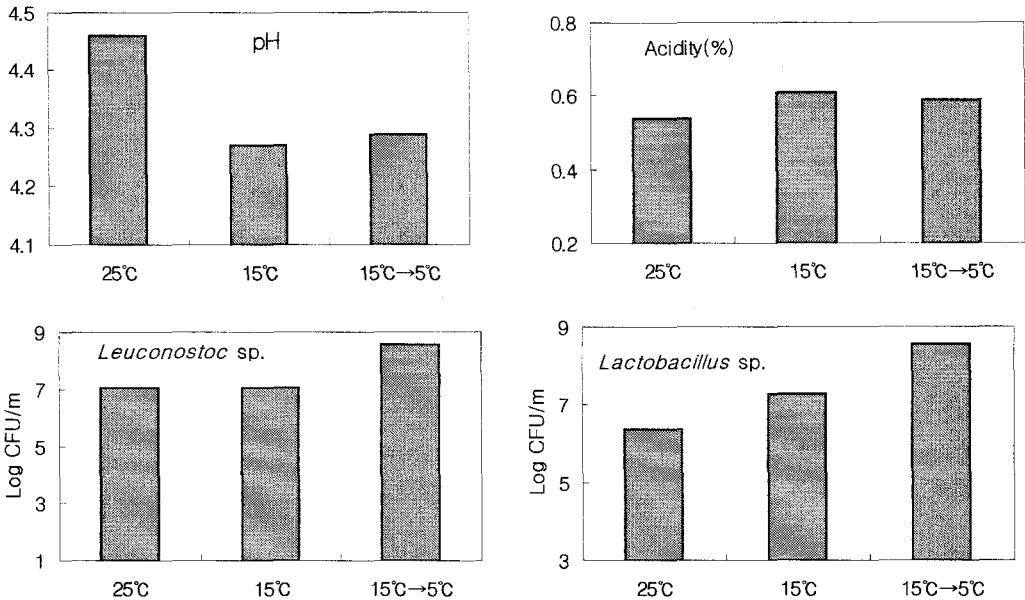


Fig. 2-7. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. in kimchi that fermented with different levels of fermented at 25℃, 15℃ and 15℃→5℃

Ames test에서 암예방 기능성김치 I 은 25℃, 15℃, 15℃→5℃에서 각각 34%, 50%, 58%의 항돌연변이 효과를 보여 저온에서 발효시킨 경우가 더 높은 항돌연변이 효과를 보임을 확인할 수 있었다(Table 2-45). 또한 부재료의 양과 종류를 달리하여 담근 배추김치는 15℃에서 하루 방치후 5℃에서 발효시킨 김치가 가장 암세포증식억제효과를 보임을 확인하였다(Table 2-46). 이상의 결과로 15℃에서 하루 방치후 5℃에서 적숙기가 될 때 까지 즉, 저온발효가 될 때 가장 암예방 효과를 증진시킬 수 있는 것으로 보인다.

Table 2-45. Effect of the juices from kimchi that fermented at 25°C, 15°C and 15°C→5°C on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Kimchi sample	Concentration(µl/plate)	Revertants/plate
		200
AFB ₁ (Control)		798±147
Spontaneous		109±11
AFB ₁ +Functional kimchi(25°C)		562±38(34) ¹⁾
Functional kimchi(15°C)		456±4(50)
Functional kimchi(15°C→5°C)		398±11(58)

Table 2-46. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of juices(10µl/assay) from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi fermented at different temperature up to pH4.3 in AGS human gastric adenocarcinoma cells

Kimchi sample	Fermentation temperature(°C)		
	15→5 ¹⁾	15	25
Control	0.618±0.032	0.795±0.037	0.672±0.07
Standarized kimchi(SK)	0.190±0.012(69) ²⁾	0.323±0.011(59)	0.542±0.086(29)
7%RPP+2.8% garlic added SK	0.150±0.021(76)	0.257±0.028(68)	0.287±0.001(62)
5% leaf mustard added SK	0.077±0.088(88)	0.362±0.023(55)	0.320±0.075(58)
1% chinese pepper powder added SK	0.402±0.012(35)	0.298±0.020(63)	0.449±0.001(41)
OC ³⁾ added SK	0.125±0.123(80)	0.330±0.017(59)	0.390±0.071(49)

¹⁾ fermented at 15°C for 1day and then 5°C

²⁾ Inhibition rate (%) ³⁾Organically cultivated chinese cabbage

이 실험의 결과로부터 암예방 기능성김치 I 은 유기농법 재배 배추김치에 고춧가루와 마늘의 배합비를 증진시키고 초피와 갖을 첨가한 김치로 저온(15°C→5°C)으로 발효시켜 pH4.3의 적숙기인 김치로 결정하였다.

3) 김치 저장 용기에 따른 김치 발효의 이화학적 변화와 암예방 효과

김치는 제조, 포장하여 유통하는 동안 포장용기 안에서 발효가 된 다음 소비자가 식용하기에 포장용기 내에서의 발효상태가 암예방 기능 증진에 영향을 줄 수 있다. 저장용기 기초연구에서는 김치 저장용 전통 항아리에 생리활성이 알려진 Ge용기, 일반용기, 황토용기 그리고 대조군으로 유리병을 사용하여 발효의 차이 또는 암예방 가능성을 검토하였다. 다음은 항아리의 장단점을 보완하고, 깨어지지 않고 항아리 처럼 공기가 통하는 김치 플라스틱 포장용기(pat 65727, 33008, USA pat 09084433, Mirafresh[®])을 이용하여 보존력(항균효과), 맛, 가스생성을 검토하여 항아리 대응으로 유통이 가능한지 검토하였다.

가) 김치 저장용기에 따른 김치의 이화학적 변화 연구

김치발효는 이상 젖산균에 의한 혐기적 발효로서 생성되는 탄산가스가 탄산으로 되어 국물과 조직내로 스며들어 발효과정 중에 생성되는 각종 저분자물질들과 함께 시원한 맛을 주는 근원을 이룬다. 즉, 발효 중에 생성되는 탄산가스는 그 대부분이 용기 밖으로 유출되거나 일부는 조직내부 또는 국물에 녹아 탄산이 되어 시원하고 상쾌한 탄산미를 부여하게 된다. 생성되는 탄산의 양은 관여 미생물의 성질, 숙성온도 및 식염의 농도, 담금온도, 첨가 부재료의 종류 및 양에 상당한 영향을 받는다.

김치 젖산균이 생성하는 이산화탄소의 휘산을 막아 탄산의 생성을 높임으로서 시원한 탄산미를 증대시킬 목적으로 일반유리 용기, 황토용기, 일반옹기 및 게르마늄 용기를 이용하여 5℃ 및 15℃에서 각각 30일 및 10일간 저장하면서 김치 숙성 중 품질 변화를 관찰하고(Fig. 2-8, 2-9) 이렇게 발효된 김치의 항암효과를 측정해 보았다. 5℃에서 각 용기별 pH, 산도, *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp.는 게르마늄용기와 일반옹기가 발효속도 면에서 다른 용기들보다 우수한 결과를 나타내었고, 15℃에서 김치가 발효되었을 경우 게르마늄 용기가 가장 우수한 결과를 나타내었다. 황토용기 및 유리용기는 보존력이 떨어졌는데 이는 통기성이 일반옹기와 게르마늄용기에 비해 떨어지는데 기인하는 것으로 생각되며, 황토용기의 경우 다른 용기들에 비하여 발효속도가 조금 더 빠른 양상을 나타내었다. 발효에서 게르마늄 용기와 일반 옹기가 좋았을 뿐 아니라 기호적인 면도 우수하였다.

나) 김치 저장용기에 따른 발효김치의 암예방 효과

일반 유리용기, 일반옹기, 황토용기, 게르마늄 용기를 이용하여 15℃에서 4일간(적속기) 발효시킨 김치 juice를 이용하여 MTT assay를 하였다. 10 μ l/assay 첨가농도에서 일반옹기와 황토용기는 각각 61%와 75%의 AGS 인체 위암세포 증식억제효과를 나타낸 반면, 게르마늄용기는 95%의 암세포 증식억제효과를 보여 게르마늄용기에서 김치를 발효시킬 경우 김치의 암예방/항암 효과를 더 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다(Table 2-47).

4) 김치발효 중 게르마늄석, 맥반석 및 숯을 첨가하여 제조된 김치의 기호성 및 암예방효과

앞의 연구에서 게르마늄 향아리가 보존력, 맛, 항암기능성도 높았으므로 게르마늄석 등을 발효김치에 직접 넣어 보기로 했다. 이 실험에서는 항암기능성 및 유해물질 흡착력을 가지는 것으로 알려진 게르마늄석, 맥반석, 숯을 김치발효 중 김치에 첨가하여 발효시키고 기호성 및 암예방효과를 측정하였다.

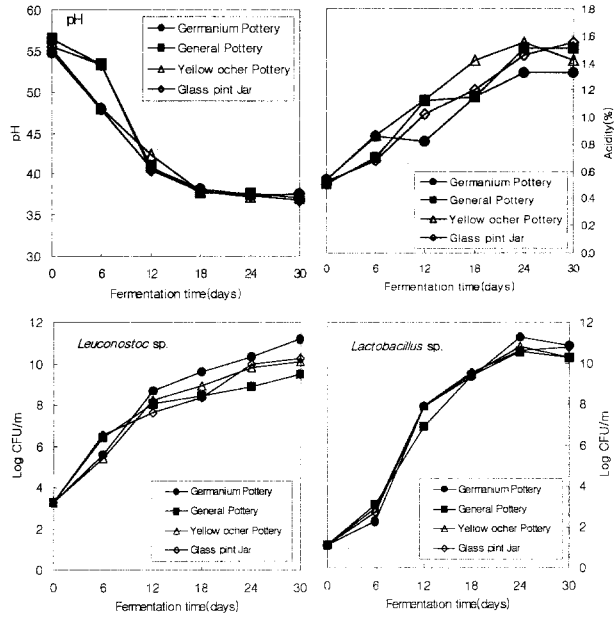


Fig. 2-8. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. during chinese cabbage kimchi fermentation in various kinds of vessel at 5°C

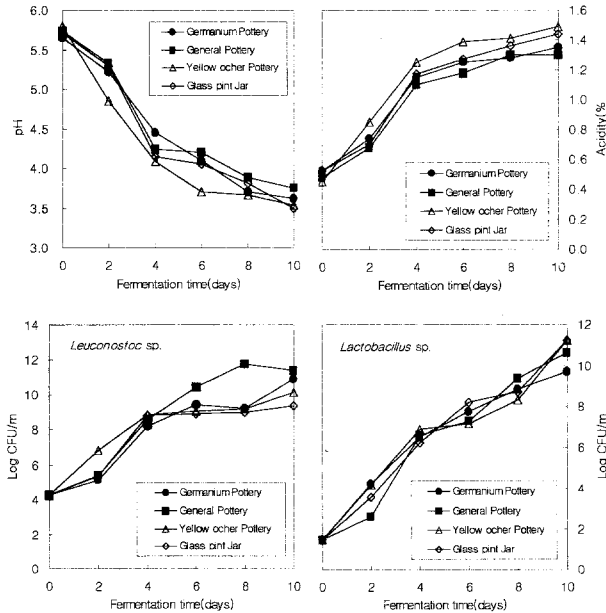


Fig. 2-9. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. during chinese cabbage kimchi fermentation in various kinds of vessel at 15°C

Table 2-47. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay of juice from chinese cabbage kimchi fermented in various kinds of vessel in AGS human gastric adenocarcinoma cells(fermentation, 15°C, 4 days)

Treatment($\mu\text{l}/\text{assay}$)	OD ₅₄₀	
	10	20
Control	0.710 \pm 0.012	
Glass pint jar	0.132 \pm 0.003(81) ¹⁾	0.065 \pm 0.006(91)
General pottery	0.274 \pm 0.010(61)	0.224 \pm 0.006(68)
Yellow ocher pottery	0.178 \pm 0.003(75)	0.135 \pm 0.005(81)
Germanium pottery	0.032 \pm 0.009(95)	0.004 \pm 0.003(99)

¹⁾ Inhibition rate (%)

먼저 3mm정도의 크기의 돌(물의 무게 5%)을 물에 24시간 침지시킨 뒤 그 물에 소금을 녹여 배추를 절였다. 직경 3~5cm 정도의 크기의 돌 2개(절인배추 100g을 기준)를 배추에 양념을 버무리고 pint jar에 담을 때 넣었다. 김치레시피는 표준화 배추김치 레시피로 하였고 발효온도는 15°C에서 발효하였고, 이렇게 담은 김치를 0일, 2일, 4일, 6일에 걸쳐 이화학적 실험을 행하였다. Fig. 2-10에서 보는 바와 같이 게르마늄석을 첨가한 김치는 pH가 떨어짐에 따라 산도가 유사하게 증가하였고, 또한 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.이 표준화김치보다 많이 자라면서 산패에 관여하는 *Lactobacillus* sp.는 적게 자랐다.

맥반석을 첨가한 김치도 게르마늄석 첨가 김치와 같이 표준화김치에 비해 *Leuconostoc* sp.이 많이 자라고 *Lactobacillus* sp.는 적게 자라는 특성을 나타냈다. 숯을 첨가한 김치에서는 표준화김치에 비해 pH가 서서히 떨어졌으며 산도 역시 조금 낮게 나타나 보존성을 증진시키는 것으로 여겨진다. *Leuconostoc* sp.는 표준화김치와 유사하게 자랐고, *Lactobacillus* sp.는 초기에 조금 적게 자랐으나 발효가 진행되면서 오히려 조금 증가되는 경향을 보였다. 본 실험실에서 훈련된 관능요원들과 함께 시식회를 가져본 결과 수돗물에 절인 배추로 담은 표준화김치에 비하여 게르마늄석과 맥반석을 넣은 물에 발효시키고 또한 돌을 첨가하여 발효시킨 김치에서는 시원한 맛이 증진되어 종합적인 평가에서 매우 우수한 것으로 나타났다. 반면 숯을 첨가한 김치에서는 그다지 큰 변화는 보이지 않았다. 게르마늄석, 맥반석, 숯을 첨가한 김치에서 각각 이화학적 특성이 우수하였던 돌 2개씩을 각각 첨가한 김치시료들로부터 juice 낸 다음 항돌연변이 및 항암실험을 하였다. Ames test에서는 표준화김치가 50%의 저해율을 보였으나 게르마늄석, 맥반석, 숯을 첨가한 김치의 경우 각각 65%, 62%, 57%의 높은 항돌연변이효과를 나타냈다(Table 2-48). MTT assay는 5 $\mu\text{l}/\text{assay}$ 의 농도에서 표준화김치, 게르마늄석을 첨가한 김치, 맥반석을 첨가한 김치, 숯을 첨가한 김치가 각각 67%, 78%, 73%, 71%이며, 10 $\mu\text{l}/\text{assay}$ 에서는 각각 72%, 74%, 76%, 75%의 암세포성장 저해율을 보였다(Table 2-49).

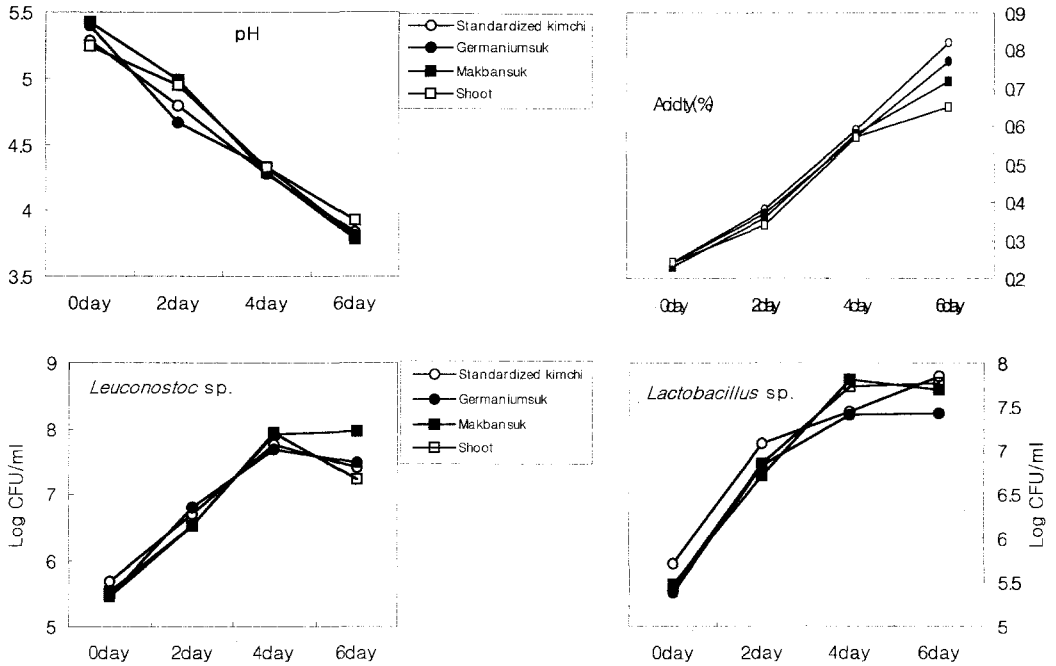


Fig. 2-10. Changes of pH, acidity, *leuconostoc* sp. and *lactobacillus* sp. from germaniumsuk, makbansuk, charcoal added kimchi at 15°C

Table 2-48. Effect of the juices from kimchi that fermented at 15°C on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Kimchi sample	Concentration(µl/plate)	Revertants/plate
		200
AFB ₁ (Control)		798 ± 14
Spontaneous		109 ± 11
AFB ₁ +Standardized kimchi		452 ± 49(50) ¹⁾
Germaniumsuk added kimchi		353 ± 14(65)
Makbansuk added kimchi		368 ± 26(62)
Charcoal added kimchi		405 ± 57(57)

¹⁾ Inhibition rate(%)

이로써 게르마늄, 맥반석, 숯을 담은 물에 배추를 절이고 또는 김치를 담을 때 첨가함으로써 암예방 기능성과 관능성을 증진시키는 것으로 나타났다.

Table 2-49. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of juices from kimchi that fermented at 15°C in AGS human gastric adenocarcinoma cell

Treatment(μl /assay)	OD ₅₄₀	
	5	10
Control	0.873 \pm 0.034	0.873 \pm 0.034
Standardized kimchi	0.488 \pm 0.007(67) ¹⁾	0.460 \pm 0.007(72)
Germaniumsuk added kimchi	0.436 \pm 0.011(78)	0.416 \pm 0.012(74)
Makbansuk added kimchi	0.437 \pm 0.011(73)	0.415 \pm 0.011(76)
Charcoal added kimchi	0.448 \pm 0.010(71)	0.429 \pm 0.006(75)

¹⁾ Inhibition rate(%)

다. 암예방 배추김치의 개발

1) 암예방 기능성김치 I의 개발

가) 부재료 종류와 첨가량을 달리하여 개발한 김치의 암예방 증진효과

부재료의 양을 달리하거나 암예방 기능이 있는 재료를 첨가하여 담근 배추김치 메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과 유기배추김치와 고춧가루, 마늘을 2배로 첨가하고, 초피와 갖을 첨가한 김치가 표준화 김치보다 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다(Table 2-50). 또한 SRB assay에서 고춧가루를 10.5% 첨가한 김치, 마늘을 5.2% 첨가한 김치, 고춧가루와 마늘을 각각 7%, 2.8% 첨가한 김치가 표준화 김치에 비해 AGS 암세포 생존억제 효과가 크게 나타났다(Table 2-51).

Table 2-50. Effect of the methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0 μg /plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment(2.5mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous	118 \pm 14	
AFB ₁ (Control)	1099 \pm 77 ^a	
Standardized kimchi	456 \pm 29 ^{de}	66
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	357 \pm 49 ^{fg}	76
5% leaf mustard added kimchi	261 \pm 5 ^h	86
1% chinese pepper powder added kimchi	436 \pm 17 ^{ef}	68
Organic chinese cabbage kimchi	314 \pm 47 ^{gh}	80

^{a~f}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 2-51. Sulforhodamine B assay (SRB) of methanol extracts(0.01mg/ml) from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₁₀
	0.1
Control	0.757±0.036
Standarzied kimchi	0.472±0.006 ^b (38)
10.5% RPP added kimchi	0.328±0.068 ^{cde} (57)
5.2% garlic added kimchi	0.308±0.017 ^{de} (59)
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	0.251±0.013 ^e (67)
5% leaf mustard added kimchi	0.399±0.093 ^{bcd} (47)
1% chinese pepper powder added kimchi	0.200±0.005 ^e (74)
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	0.294±0.003 ^{de} (61)

¹⁾Inhibition rate(%)

^{a-e}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

또 산초가루와 첨차분말을 첨가한 김치도 표준화 김치에 비해 활성이 뛰어났으며, 유기배추를 이용하여 담근 김치가 표준화 배추 김치에 비해 암세포 생존저해가 더 크게 나타났다. 따라서 이들 부재료 첨가를 이용한 4종류의 김치를 제조하여 Ames test 와 MTT assay로 암예방 효과를 비교하였다(Table 2-52, 2-53). Ames test에서 1.25mg /plate 처리농도에서 표준화김치(47%)에 비해 유기배추에 고춧가루와 마늘을 2배씩 첨가하고 초피와 갖을 넣은 김치가 65%로 훨씬 높은 저해효과를 보였고, MTT assay에서도 유기배추에 고춧가루와 마늘을 2배씩 첨가하고 초피와 갖을 넣은 김치(63%)가 표준화김치(36%)보다 AGS 암세포 생존억제 효과가 크게 나타났다. 이상의 결과로부터 유기농법 재배 배추김치에 고춧가루와 마늘의 배합비를 증진시키고, 초피와 갖을 첨가한 김치를 암예방 기능성김치 I 으로서 개발하였다.

Table 2-52. Antimutagenic effect of methanol extracts from different kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against aflatoxin B₁(AFB₁, 2.0μg /plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Kimchi samples(1.25mg/plate)	Revertants/plate Inhibition rate(%)	
	1.25	
Spontaneous	105	
AFB ₁ (Control)	706	
AFB ₁ +Standarzied kimchi	422±2.8	47
7% RPP+2.8% garlic added OC kimchi	670±33.1	19
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP added OC kimchi	458±144.2	41
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added OC kimchi	317±83.4	65

Table 2-53. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay of juice from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi in AGS human gastric adenocarcinoma cells(fermentation,15°C for 1 day and then 5°C up to pH 4.3)

Treatment(2.5 μ l/assay)	OD ₅₄₀
control	0.714
Standardized kimchi	0.574(36)
7% RPP+2.8% garlic added OC kimchi	0.445(67)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP added OC kimchi	0.496(61)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added OC kimchi	0.449(63)

¹⁾ Inhibition rate(%) (%)

나) 암예방 기능성김치 I의 소핵유발억제효과

앞에서 결정한 레시피와 발효방법을 이용해서 제조된 암예방 기능성김치 I의 암예방효과를 *in vivo*에서 확인하기 위해 마우스의 말초혈을 이용한 supravital staining micronucleus assay를 하였다. 배추김치는 MMC 투여 후 6시간 경과 후 1회 경구투여하였을 때 소핵유발억제효과가 높았다. 따라서 암예방 기능성김치 I의 암예방 증진효과를 확인하기 위하여 표준화 김치와 암예방 기능성김치 I 500mg/kg과 1000mg/kg을 MMC 투여 후 6시간(+6hr) 경과 후 1회 경구투여하여 소핵억제효과를 관찰하였다(Fig. 2-11, 2-12).

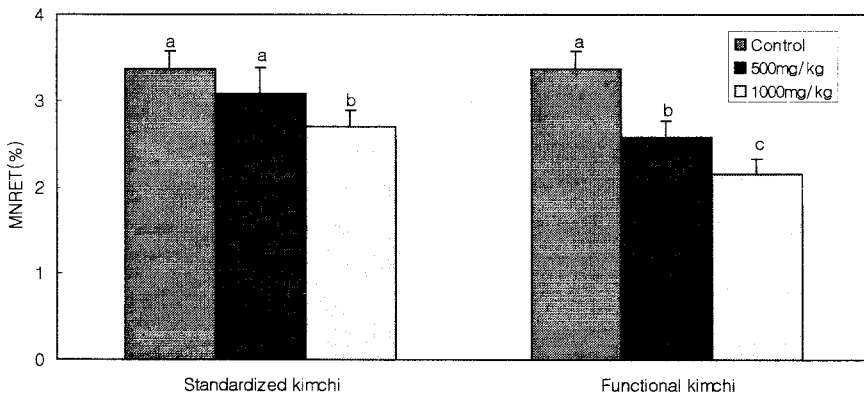
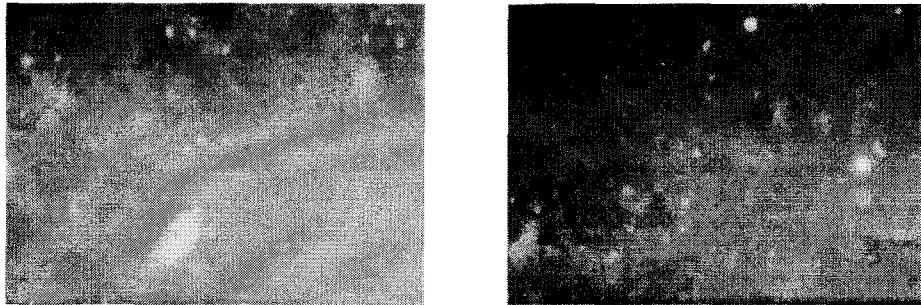


Fig. 2-11. Anticlastogenic effect of standardized kimchi and cancer preventive functional kimchi I in MMC-induced mice using *in vivo* supravital staining micronucleus assay

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

500mg/kg을 경구 투여하였을 때 표준화김치의 경우는 소핵유발억제능을 보이지 않았으나 암예방 기능성 김치는 유의성($p < 0.05$) 있게 소핵유발억제효과를 나타내었다. 또한 1000mg/kg의 용량으로 경구 투여한 군에서 암예방 기능성 김치는 표준화 김치보

다 소핵유발을 억제하는 효과가 유의적($p < 0.05$)으로 높아 *in vivo*에서 암예방 기능성 김치의 암예방증진효과가 확인되었다(특허출원: 출원번호 제 99-44936).



Control

Functional kimchi I treated

Fig. 2-12. Photomicrographs of micronucleated reticulocyte in peripheral blood of mouse treated mitomycin(MMC, 1mg/kg) and methanol extract(1000mg/kg) from functional kimchi

2) 암예방 기능성김치 II(KCl 대체 기능성 배추김치)의 암예방 증진효과

가) 암예방 기능성김치 II의 항돌연변이 증진효과

표준 레시피와 암예방기능성 증진 레시피에 소금의 종류 또는 총 NaCl양의 30%를 KCl로 대체하여 담근 6종류의 배추김치 메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-54에 나타내었다. 1.25mg/plate첨가농도에서 표준화김치 I(2.5%천일염)은 AFB₁에 대한 돌연변이 유발을 53%억제한 반면 표준레시피에 KCl을 대체한 표준화김치 II(1.7%천일염 + 0.8%KCl), 표준화김치 III(1.7%구운소금 + 0.8%KCl)와 표준화김치 IV(1.7%한주소금 + 0.8%KCl)는 69%의 항돌연변이 효과를 나타내었고 암예방 기능성 김치 II(KCl 기능성 증진 김치)는 74%의 항돌연변이 효과를 나타내어 표준화김치 I(2.5%천일염)보다 20%이상 항돌연변이 효과가 증진되었다. 그러나 이 실험 결과에서는 KCl을 30% 대체했을 때 절임에 사용된 소금의 종류에 따른 항돌연변이 활성 차이는 없었다.

나) 암예방 기능성김치 II의 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제효과

Table 2-55는 암예방 기능성김치 II가 C3H/10T1/2 cell에서 MCA에 의한 세포독성을 저해하는 효과가 있는지를 살펴보기 위해 cytotoxicity test를 행한 결과이다. Cytotoxicity는 colony형성의 저해정도에 의해 결정되어질 수 있는데, 50 μ g/ml첨가농도에서 표준화김치 I(2.5%천일염)은 23%의 cytotoxicity저해효과를 나타내었고 표준화김치 II(1.7%천일염+ 0.8%KCl), 표준화김치 III(1.7%구운소금+0.8%KCl)와 표준화김치 IV(1.7%한주소금+0.8%KCl)는 41-44%의 cytotoxicity저해효과를 나타내어 KCl을 대체

한 김치가 MCA에 의한 cytotoxicity저해효과가 컸으며 암예방 기능성김치 II는 59%의 높은 세포독성의 저해효과를 보여 암예방 기능성김치 I에 KCl을 대체하면 암예방 기능을 더 높일 수 있음이 확인되었다.

Table 2-54. Effect of the methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment(mg/plate)	Revertants/plate	
	0.625	1.25
Spontaneous	89 ± 9	
AFB ₁ (Control)	1043 ± 34 ^a	
Standardized kimchi ¹⁾ I (Chunil salt)	687 ± 23 ^b (37) ³⁾	540 ± 33 ^b (53)
Standardized kimchi II (Chunil salt+KCl)	545 ± 39 ^d (52)	388 ± 11 ^d (69)
Standardized kimchi III (Gueun salt+KCl)	506 ± 24 ^d (56)	380 ± 14 ^d (69)
Standardized kimchi IV (Hanju salt)	620 ± 24 ^c (44)	386 ± 6 ^d (69)
CP* functional kimchi ²⁾ I (Gueun salt)	512 ± 13 ^d (56)	438 ± 23 ^c (63)
CP functional kimchi II (Gueun salt+KCl)	421 ± 14 ^e (65)	330 ± 10 ^e (74)

¹⁾ The ratios of ingredient in standardized kimchi are 13.0 radish, 2.0 green onion, 3.5 red pepper powder, 1.4 garlic, 0.6 ginger, 2.2 anchovy juice, 1.0 sugar and 2.5 final salt concentration in the proportion of 100 salted chinese cabbage.

²⁾ The ratios of ingredient in functional kimchi are 13.0 radish, 2.0 green onion, 5.0 leaf mustard, 7.0 red pepper powder, 2.8 garlic, 0.1 chinese pepper powder, 0.6 ginger, 2.2 anchovy juice, 1.0 sugar and 2.5 final salt concentration in the proportion of 100 salted organic chinese cabbage.

³⁾ The values in parentheses are the inhibition rate(%)

^{a-d} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

*Cancer preventive

Table 2-55. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene(MCA, 10 µg/ml) and the methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi

Treatment(50 µg/ml)	Cell colony	Cytotoxicity
MCA(Control)	98 ± 7 ^a	1.00
Standardized kimchi ¹⁾ I (Chunil salt)	121 ± 3 ^b	1.23
Standardized kimchi II (Chunil salt+KCl)	139 ± 2 ^c	1.41
Standardized kimchi III (Gueun salt+KCl)	142 ± 2 ^c	1.44
Standardized kimchi IV (Hanju salt)	139 ± 2 ^c	1.41
CP* functional kimchi ²⁾ I (Gueun salt)	141 ± 3 ^c	1.44
CP functional kimchi II (Gueun salt+KCl)	156 ± 2 ^d	1.59

¹⁻²⁾ See the footnote of Table 2-54

^{a-d} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

*Cancer preventive

다) 암예방 기능성김치II의 종양전이 억제효과

Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용한 종양전이의 예방적 효과에 대한 실험결과에서 표준화김치 I (2.5%천일염)의 투여군은 1.25mg/mouse를 피하주사했을 때 14%의 낮은 종양전이억제효과를 보였다. 암예방 기능성김치 I은 0.05mg의 낮은농도에서도 표준화 김치 I 투여군과 비슷한 12%의 전이억제효과를 나타내었고, 1.25mg/mouse를 피하주사 했을 때는 폐로 전이된 Colon 26-M3.1 종양의 성장을 35%정도로 유의성있게 억제하여 암예방 기능성 김치 I가 암전이의 예방효과도 가지고 있음이 확인되었다(Table 2-56). 또한 암예방 기능성김치II(암예방 기능성김치 I+Gueun salt+KCl)는 0.05~ 1.25mg/mouse의 모든 첨가농도에서 유의성 있는 종양전이억제효과를 보였으며 1.25mg/mouse를 투여했을 때 49%의 높은 전이억제효과를 나타내어 암예방 기능성김치 레시피에 KCl을 대체하면 암전이의 예방효과를 더 높일 수 있음이 확인되었다. Fig. 2-13은 암예방 기능성김치II를 처리했을 때와 대조군의 폐로 전이된 종양의 colony 수를 보여주는 그림이다.

암예방 기능성김치II는 1999년 10월 16일 “KCl을 함유하는 항암성 배추김치 및 그 제조방법”이란 명칭으로 특허출원(출원번호 제 99-44937)하였다.

Table 2-56. Inhibitory effect of kimchi on tumor metastasis produced by colon 26-M3.1 cells

Treatment	Dose (mg/mouse)	Route	No. of lung metastasis (Inhibition, %)	
			Mean±SD	Range
Control		sc	162± 7 ^a	153~172
Standardized kimchi ¹⁾ I (Chunil salt)	0.05	sc	157±13 ^a (3) ³⁾	142~172
	0.25	sc	147± 8 ^{ab} (9)	138~157
	1.25	sc	139± 5 ^{bc} (14)	131~144
CP* functional kimchi ²⁾ I (Gueun salt)	0.05	sc	143±12 ^{ab} (12)	124~156
	0.25	sc	125±15 ^{cd} (23)	109~146
	1.25	sc	103± 5 ^e (36)	96~108
CP functional kimchi II (Gueun salt+KCl)	0.05	sc	119± 4 ^d (27)	114~123
	0.25	sc	99± 8 ^e (39)	89~110
	1.25	sc	83± 6 ^f (49)	73~ 91

¹⁻³⁾ See the footnote of Table 2-54

^{a-d} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

*Cancer preventive

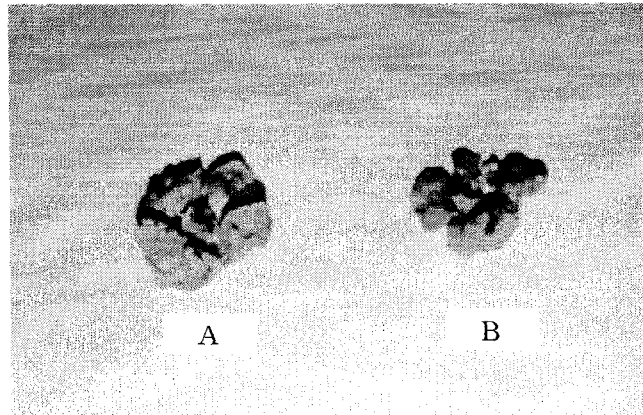


Fig. 2-13. Photographs of lung tumor colonies on lung metastasis produced by i.v. inoculation of colon 26-M3.1 carcinoma cells
 A : Control
 B : Functional kimchi II(Gueun salt+KCl) 1.25mg/mouse treated

라. 맛을 증진시킨 암예방 배추김치의 제조 및 유통 연구

1) 소비자 기호도 조사

가) 암예방 기능성김치II의 제조

15℃에서 발효시켜 pH가 4.3일 때 발효시킨 암예방 기능성 김치II와 시판(종가집) 배추김치를 비교하여 김치별 소비자 기호도(약 200명) 조사를 하였다.

나) 개인별 성향, 기호도 및 설문 조사 결과

관능검사는 부산시 동래에 위치한 국제요리학원 수강생 약 200명을 대상(1999. 10. 8)으로 실시하였다. 개인별 성향을 조사하고, 암예방 김치와 시판 종가집 배추(포기) 김치와 비교하여 김치별 선호도를 조사하였으며, 앞으로 암예방 김치 개발을 위한 방향 제시를 위해 몇 가지 사항에 대하여 설문조사를 실시하였다.

(1) 개인별 성향조사결과

응답자의 연령비는 20대가 60%로 가장 많았고 그 외에도 30, 40대가 각각 22%, 16%를 차지했다. 남녀 비율은 여자가 80%, 남자가 20%로 여자가 대부분을 차지하였으며, 출신지별 분포는 부산이 73%로 대부분을 차지하였다. 매끼 김치 섭취량은 30g이 99명으로 응답자의 53%로 가장 높게 나타났으며 이것으로 보아 대부분의 사람들이 1일 100g전후로 김치를 섭취함을 알 수 있었다. 김치숙성 선호도조사는 적당히 익은 김치(pH 4.3)를 가장 선호하였고 그 외에도 갓 담은 김치와 푹 익은 김치에도 각각 26, 12%의 약간의 선호도를 나타내었다. 매운맛 선호도는 조금 매운것과 보통 매운것에 대한 선호도가 가장 높았고 아주 매운것과 맵지 않은 것에는 선호도가 낮게 나타났

다.

(2) 김치별 선호도 조사 결과

암예방 기능성 김치Ⅱ와 시판 종가집 배추(포기)김치에 대한 맛에 관련한 선호도를 9점 평점법(1점: 대단히 싫음, 5점: 싫지도 좋지도 않음, 9점: 대단히 좋음)으로 비교하였다. 색상에서 암예방 기능성 김치는 7.08점으로 비교적 높은 선호도를 보여 시판김치와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다. 매운맛은 시판(종가집)김치가 6.28점으로 암예방 기능성 김치(4.84점)보다 높게 나타나 시판김치가 기본양념 및 고춧가루를 많이 쓰는 것으로 판단되었고, 짠맛은 모두 5점에 가까운 점수로 강하지도 약하지도 않음을 나타내어 적당하다고 생각되었다. 쓴맛에서는 암예방 김치에 소금의 일부를 KCl로 대체하였기 때문에 쓴맛이 감지될까 우려하였으나 암예방 김치는 3.78점으로 시판 김치와 비슷한 점수(3.46)를 얻어 KCl에 의한 쓴맛은 크게 감지하지 못하는 것 같았다. 아삭한 정도는 강하지도 약하지도 않다고 나타난 것으로 보아 아삭한 정도는 적당하다고 생각되었다. 종합적 평가에서 시판(종가집) 김치가 6.90점, 암예방 김치는 5.66점으로(Fig. 2-14) 시판 김치를 더 선호하는 것으로 나타났는데 이는 시판 김치에 적당량의 조미료를 첨가하여 조미료에 어느 정도 길들여진 사람들의 입맛에 부합한 것으로 생각되었다. 암예방 기능성 김치는 기능성 뿐 아니라 맛으로도 일반인에게 선호되도록 개발할 목표를 가지고 있다.

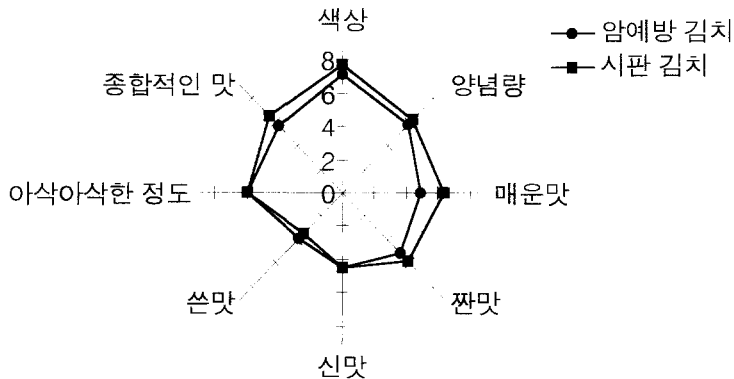


Fig. 2-14. 김치별 선호도 조사 결과

(3) 설문조사 결과

암예방 김치개발을 위한 방향을 잡기 위해 일반인에게 설문조사를 하였다. 암예방 기능성 김치에 대한 설문조사에서 암예방 기능성 김치에 대한 생각은 과학적 근거가 있다면 믿을 수 있다가 63%로 가장 높았고, 믿을 수도 있다가 35%로 일반인들이 기능성 김치에 대해 많은 관심이 높다고 생각되어진다. 암예방 기능성 김치 판매에 대해 71%가 암예방 김치를 구입하겠다고 응답한 것으로 보아 암예방 김치의 연구 개발은 반드시 필요하다고 생각된다. 암예방 김치가 맛이 떨어져도 구입하겠냐는 질문에 대

해서는 57%는 구입하겠다고 하였고 43%는 맛이 떨어지면 구입하지 않겠다고 한 것으로 보아 기능성과 더불어 맛에 대해서도 대부분의 사람들이 민감하게 반응하는 것 같았다. 어느 정도 맛이 떨어져도 구입하겠냐는 질문에 대해서는 20%정도 맛이 떨어져도 구입하겠다고 47%로 가장 높았다.

가격면에서는 일반김치와 같은 수준의 가격에 대한 응답이 56%로 가장 높았고 일반김치보다 30%고가라도 구입하겠다는 응답자가 40%로 가격도 일반김치 수준을 선호하지만 많은 사람들이 30% 고가라도 사 먹겠다는 건강 지향적인 생각을 가지고 있었다. 김치 포장재질면에서는 내용물을 볼 수 있는 유리병을 가장 선호하였고 시판 김치의 구입장소로는 대형할인매장을 가장 선호하는 것으로 나타났으며 그 외에도 슈퍼마켓이나 주문판매에 대해서도 선호도가 있는 것으로 보였다. 포장지의 라벨링에 대해서는 건강김치로 라벨링을 하는 것이 가장 많은 의견이었다.

이상의 설문조사결과를 토대로 하여 일반인이 선호할 수 있는 암예방김치의 개발 범위를 설정하면 먼저 맛은 일반 김치와 비슷한 맛을 낼 수 있어야 하며 만약 맛이 떨어진다면 하여도 20%이하의 범위 내에서 개발해야겠고, 유리병 등 내부가 투명하게 보이는 용기에 담아서 대형할인매장을 이용하여 판매하는 것이 바람직한 것으로 여겨진다.

2) 맛중진 연구

암예방 김치 레시피 중 고춧가루 7%를 첨가하는 것은 암환자기호도 조사 등에 비추어 암예방 및 항암 김치를 만드는데 다소 과량으로 추정되어 고춧가루로 인한 기능성이 떨어지지 않는 범위내에서 고춧가루 양을 조절하였다. 영양 태양초 고춧가루양을 3.5, 5, 7%로 달린 김치를 담가 이화학적 특성 및 암예방효과를 살펴본 결과 고춧가루 첨가량이 5%인 김치는 7%의 고춧가루가 첨가된 김치에 비해 저장성은 차이가 없었고 오히려 초피냄새가 적게 나고 맛이 좋았다. 또한 SOS chromotest와 Ames test에 의한 돌연변이 유발억제 기능성 면에서도 5%고춧가루를 넣은 김치의 결과가 좋았으므로 고춧가루를 5% 첨가한 기능성김치 III을 개발하였다. 또한 이 기능성 김치 레시피를 바탕으로 다른 부재료를 첨가하여 맛을 증진시키기 위한 연구를 하였다.

가) 암예방김치와 암예방김치에 배와 미나리를 첨가한 김치와 통고추를 첨가한 김치의 비교

기능성 김치III(A)의 맛을 증진시키기 위해 김치에 시원한 맛을 주는 부재료인 배와 미나리를 첨가한 김치(B)와 배와 미나리를 첨가하고 고춧가루의 1/2을 통고추로 첨가한 김치(C)를 제조(Table 2-57)하여 관능검사를 하였다. 배와 미나리를 첨가한 김치(B)가 배에 의한 시원한 맛 등에 의하여 종합적 평가에서 기능성 김치III(A)보다 높은 점수를 받았고 배와 미나리를 첨가하고 고춧가루와 통고추를 반반 첨가한 김치(C)가 고춧가루만을 넣은 김치(A)보다 색이 선명하여 가장 높은 점수를 받았다(Table

2-58).

Table 2-57. The ingredients ratio of various Korean cabbage *kimchi*(g)

Ingredient	A <i>kimchi</i>	B <i>kimchi</i>	C <i>kimchi</i>
Korean cabbage	1000	1000	1000
Red pepper powder	50	50	25
Red pepper			25
Crushed garlic	28	28	28
Crushed ginger	6.0	6.0	6.0
Anchovy juice	22	22	22
Sugar	10	10	10
Radish	130	110	110
Green onion	20	20	20
Mustard leaf	50	50	50
Chinese pepper	1.0	1.0	1.0
Water dropwort		14	14
Pear		28	28
Final salt concentration	2.5	2.5	2.5

Table 2-58. QDA profile¹⁾ of various Korean cabbage *kimchi* fermented at 10°C after 10days

	Apperance	Sour smell	Moldy smell	Green smell	Sour flavor	Moldy flavor	Green flavor	Hardness	Overall acceptability
A <i>Kimchi</i>	6.1	5.5	1.5	2.3	5.3	1.6	1.8	6.1	6.5
B <i>Kimchi</i>	6.3	5.7	1.6	2.2	4.9	1.8	1.6	5.5	6.9
C <i>Kimchi</i>	7.6	5.8	1.8	1.3	5.5	1.9	1.2	5.7	8.1

¹⁾Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely bad, 9-extremely good in subjective evaluation(apperance, overall acceptability), and and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, moldy smell, Green mell, sour flavor, moldy flavor, Green flavor and hardness)

A *Kimchi* : 암예방김치, B *Kimchi* : 암예방김치에 배와 미나리를 첨가한 것, C *Kimchi* : 암예방김치의 고춧가루중 반은 시판용영양고춧가루를 그리고 반은 통고추를 믹서에 갈은 것

나) 암예방김치와 버섯다시마물을 첨가한 김치와 새우물을 첨가한 김치의 비교

기능성 김치Ⅲ(A *kimchi*)의 맛을 증진시키기 위해 김치에 시원한 맛을 주는 방법으로 버섯과 다시마를 우려내어 끓인 물을 첨가한 김치(D *kimchi*)와 새우 삶은 물을 첨가한 김치(E *kimchi*)를 제조하여(Table 2-59) 관능검사를 하였다. 새우 삶은 물을 첨가한 김치(E *kimchi*)가 버섯다시마물을 첨가한 김치(D *kimchi*)보다 신맛이 더 낮으며, 버섯다시마물을 첨가한 김치(D *kimchi*)가 외관과 종합적 평가에서 좋은 점수를 받았다(Table 2-60).

Table 2-59. The ingredients ratio of various Korean cabbage *kimchi*(g)

Ingredient	A <i>kimchi</i>	D <i>kimchi</i>	E <i>kimchi</i>
Korean cabbage	1000	1000	1000
Red pepper powder	50	50	50
Red pepper			
Crushed garlic	28	28	28
Crushed ginger	6.0	6.0	6.0
Anchovy juice	22	22	22
Sugar	10	10	10
Radish	130	110	110
Green onion	20	20	20
Mustard leaf	50	50	50
Chinese pepper	1.0	1.0	1.0
Water dropwort		14	14
Pear		28	28
Mushroom & sea tangle soup		100	
Shrimp juice			100
Finalsalt concentration	2.5	2.5	2.5

Table 2-60. QDA profile¹⁾ of various Korean cabbage *kimchi* fermented at 10°C after 10days

	Apperance	Sour smell	Moldy smell	Green smell	Sour flavor	Moldy flavor	Green flavor	Hardness	Overall acceptability
A <i>Kimchi</i>	6.2	5.6	1.5	2.1	5.3	1.7	1.8	6.1	6.5
D <i>Kimchi</i>	6.4	5.5	1.5	2.2	4.9	1.8	1.6	5.4	7.0
E <i>Kimchi</i>	6.4	5.7	1.7	1.5	5.2	2.2	1.1	5.3	6.6

¹⁾Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely bad, 9-extremely good in subjective evaluation(apperance, overall acceptability), and and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, moldy smell, Green mell, sour flavor, moldy flavor, Green flavor and hardness)

다) 암예방김치에서 통고추와 건조고추의 비교 및 버섯다시마물과 새우물의 비교 앞의 결과에서 배, 미나리, 2.5% 통고추와 버섯다시마물을 첨가하는 것이 김치의 색이 예쁘고, 맛이 더 좋았으므로 이들을 모두 첨가한 김치(F *kimchi*)를 제조하였다 (Table 2-61). 배, 미나리와 버섯다시마물을 첨가한 김치(D *kimchi*)는 기능성 김치Ⅲ (A *kimchi*)에 비하여 발효가 빨리 진행되었지만(Table 2-62) 외관상 색이 선명하여 전체적인 평가에서 높은 점수를 받았고 배, 미나리와 새우물을 첨가한 김치(E *kimchi*)가 버섯과 다시마물을 첨가한 김치(D *kimchi*)보다 발효가 빨리 진행되어 관능에서도 신맛을 맛이 느낀다고 하였다. 배, 미나리를 첨가하고 통고추(2.5%)를 버섯다시마물로 갈아서 첨가한 김치(F *kimchi*)가 외관과 종합적인 평가에서 좋은 점수를 얻

었다(Table 2-63).

Table 2-61. The ingredients ratio of various Korean cabbage *kimchi*(g)

Ingredient	A <i>kimchi</i>	D <i>kimchi</i>	E <i>kimchi</i>	F <i>kimchi</i>	G <i>kimchi</i>
Korean cabbage	1000	1000	1000	1000	1000
Red pepper powder	50	50	50	25	25
Red pepper				25	25
Crushed garlic	28	28	28	28	28
Crushed ginger	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Anchovy juice	22	22	22	22	22
Sugar	10	10	10	10	10
Radish	130	110	110	110	110
Green onion	20	20	20	20	20
Mustard leaf	50	50	50	50	50
Chinese pepper	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Water dropwort		14	14	14	14
Pear		28	28	28	28
Mushroom & sea tangle soup		100		100	
Shrimp juice			100		100
Finalsalt concentration	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Table 2-62. pH of various *kimchi* fermented at 10°C for 10days

	A <i>Kimchi</i>	D <i>Kimchi</i>	E <i>Kimchi</i>	F <i>Kimchi</i>	G <i>Kimchi</i>
pH	4.6	4.4	4.2	4.2	4.1

Table 2-63. QDA profile¹⁾ of various Korean cabbage *kimchi* fermented at 10°C after 10days

	Apperance	Sour smell	Moldy smell	Green smell	Sour flavor	Moldy flavor	Green flavor	Hardness	Overall acceptability
A <i>Kimchi</i>	6.1	5.6	1.5	2.1	5.3	1.7	1.8	6.1	6.5
D <i>Kimchi</i>	6.4	5.5	1.5	2.2	4.9	1.8	1.6	5.4	6.9
E <i>Kimchi</i>	6.2	5.9	1.7	1.5	5.1	2.0	1.4	5.3	6.6
F <i>Kimchi</i>	7.6	5.8	1.8	1.3	5.5	1.9	1.2	5.7	8.1
G <i>Kimchi</i>	7.2	6.3	2.1	1.5	5.9	2.2	1.6	5.1	7.1

¹⁾Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely bad, 9-extremely good in subjective evaluation(apperance, overall acceptability), and and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, moldy smell, Green mell, sour flavor, moldy flavor, Green flavor and hardness)

A *Kimchi* : 암예방김치, D *Kimchi* : 암예방김치에 버섯·다시마물을 넣은 것, E *Kimchi* : 암예방김치에 새우물을 넣은 것, F *Kimchi* : 암예방김치의 고춧가루중 반은 시판용영양고춧가루를 그리고 반은 통고추를 버섯·다시마물로 킷서에 같은 것, G *Kimchi* : 암예방김치의 고춧가루중 반은 시판용영양고춧가루를 그리고 반은 통고추를 새우물로 킷서에 같은 것.

라) 암예방 김치에서 통고추와 고춧가루의 비교와 명태를 넣고 넣지 않았을 때의 비교

기능성 김치Ⅲ(A *kimchi*)와 배, 미나리를 첨가하고 통고추(2.5%)를 버섯다시마물로 갈아서 첨가한 김치(F *kimchi*)에 명태를 첨가한 김치를 제조하여(Table 2-64) 관능검사를 실시한 결과 명태를 넣은 것보다는 명태를 넣지 않은 것을 선호하였고 배, 미나리를 첨가하고 통고추(2.5%)를 버섯다시마물로 갈아서 첨가한 김치(F *kimchi*)에 명태를 넣은 것이 더 비린내가 많이 나서 가장 낮은 선호도를 보였다. 따라서 맛을 증진시키기 위해 기능성 김치Ⅲ(A *kimchi*) 레시피에 배와 미나리를 첨가하고, 버섯다시마 우려낸 물에 통고추를 갈아 첨가하는 것(F, I *kimchi*)이 가장 맛을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다(Table 2-65).

Table 2-64. The ingredients ratio of various Korean cabbage *kimchi*(g)

Ingredient	A <i>kimchi</i>	H <i>kimchi</i>	I <i>kimchi</i>	J <i>kimchi</i>
Korean cabbage	1000	1000	1000	1000
Red pepper powder	50	50	25	25
Red pepper			25	25
Crushed garlic	28	28	28	28
Crushed ginger	6.0	6.0	6.0	6.0
Anchovy juice	22	22	22	22
Sugar	10	10	10	10
Radish	130	130	130	130
Green onion	20	20	20	20
Mustard leaf	50	50	50	50
Chinese pepper	1.0	1.0	1.0	1.0
Water dropwort			14	14
Pear			28	28
Mushroom & sea tangle soup			100	100
Pollack		50		50
Final salt concentration	2.5	2.5	2.5	2.5

Table 2-65. QDA profile¹⁾ of various Korean cabbage *kimchi* fermented at 10°C after 10 days

	Apperance	Sour smell	Moldy smell	Green smell	Sour flavor	Moldy flavor	Green flavor	Hardness	Overall acceptability
A <i>Kimchi</i>	6.6	5.4	1.4	1.8	5.6	1.1	2.1	5.8	6.8
H <i>Kimchi</i>	7.0	5.2	1.2	1.6	5.0	1.4	1.8	5.2	6.2
I <i>Kimchi</i>	7.3	5.6	1.2	1.2	5.7	1.2	1.4	5.6	7.9
J <i>Kimchi</i>	5.8	5.4	1.4	2.0	5.2	1.8	1.8	5.8	5.8

¹⁾Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely bad, 9-extremely good in subjective evaluation(apperance, overall acceptability), and and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, moldy smell, green smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor and hardness)

A *Kimchi* : 암예방김치, H *Kimchi* : 암예방김치에 명태를 넣은 것, I *Kimchi* : 암예방김치의 고춧가루중 반은 시판용영양고춧가루를 그리고 반은 통고추를 버섯·다시마물로 믹서에 갈은 것, J *Kimchi* : 암예방김치의 고춧가루중 반은 시판용영양고춧가루를 그리고 반은 통고추를 버섯·다시마물로 믹서에 갈은 것과 부재료로 명태를 첨가한 것.

마) 맛을 증진시킨 암예방 김치의 암예방효과

암예방김치는 일반인이 김치의 맛을 즐기면서 기능성을 나타내도록 맛과 기능이 이 증진된 김치를 제조하는데 목표가 있다. 그래서 맛 증진 때문에 암예방 효과가 감소 되는가를 계속 추적 측정하였다. 앞의 실험에서 배, 미나리를 첨가하고 통고추(2.5%)를 버섯다시마물로 갈아서 첨가한 김치(기능성김치Ⅳ)와 기능성 김치Ⅲ의 메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-66에 나타내었다. 맛을 증진시킨 기능성김치Ⅳ는 기능성 김치Ⅲ에 비해 항돌연변이 효과가 10%정도 낮았다.

Table 2-66. Effect of the methanol extracts from functional kimchi(FK) on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1.25mg/plate	2.5mg/plate
Spontaneous	94 ± 8	94 ± 8
Control	1077 ± 23 ^a	1077 ± 23 ^a
FKⅢ(A kimchi)	672 ± 8 ^c (41)*	510 ± 11 ^c (58)
FKⅣ(F kimchi)	763 ± 17 ^b (32)	633 ± 15 ^b (45)

*Inhibition rate(%)

배, 미나리를 첨가하고 통고추(2.5%)를 버섯다시마물로 갈아서 첨가한 김치(기능성 김치Ⅳ)와 기능성 김치Ⅲ 메탄올추출물을 이용하여 MTT assay를 하였다(Table 2-67). 기능성김치Ⅳ는 기능성 김치Ⅲ 보다 암세포증식억제효과도 10%정도 감소하였다.

Table 2-67. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from functional kimchi(FK) against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Sample	OD	
	100μg/assay	200μg/assay
Control	0.520 ± 0.01 ^a	0.520 ± 0.01 ^a
FKⅢ(A kimchi)	0.244 ± 0.01 ^c (53)*	0.179 ± 0.01 ^d (66)
FKⅣ(F kimchi)	0.304 ± 0.01 ^b (42)	0.229 ± 0.01 ^c (56)

*Inhibition rate(%)

3) KCl 대체숙염을 이용한 암예방효과 증진 연구

가) 소금재료를 달리하여 제조한 암예방 배추김치의 암예방 기능성 증진 연구 (I)

고춧가루 함량을 5%로 낮춘 기능성 김치Ⅲ에 배, 미나리와 버섯·다시마물을 첨가한 기능성김치Ⅳ는 맛은 증진되었으나 기능성이 다소 감소되어 기능성을 증진시키기

위해 제 4장에서 연구된 소금인 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)을 첨가한 암예방 기능성 김치 V를 제조하여 10℃에서 10일간 발효하여 이화학적 특성 및 관능성을 비교하고, 동결건조한 후 메탄올추출물을 제조하여 암예방 기능성을 검토하였다.

(1) 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)를 첨가한 암예방 김치의 이화학적 특성 및 관능성

배, 미나리와 버섯·다시마물을 첨가한 기능성김치 IV는 pH가 가장 낮아 저장성이 없었으나 1회 구운 죽염 B를 첨가한 기능성 김치 V는 기능성 김치 III과 비슷한 pH 4.28을 나타내었다. 산도 역시 배, 미나리와 버섯·다시마물을 첨가한 기능성김치 IV가 가장 높았으며, 1회 구운 죽염 B를 첨가한 기능성 김치 V의 산도는 기능성 김치 III과 비슷한 0.78%였다(Fig. 2-15). *Leuconostoc* sp. 젖산균과 *Lactobacillus* sp. 젖산균의 수는 기능성 김치 V가 기능성김치 IV보다 많았다(Fig. 2-16). 관능검사 결과에서도 1회 구운 죽염 B를 첨가한 기능성 김치 V가 외관이나 종합적인 맛에서 기능성김치 IV보다 좋은 점수를 얻었다(Fig. 2-17).

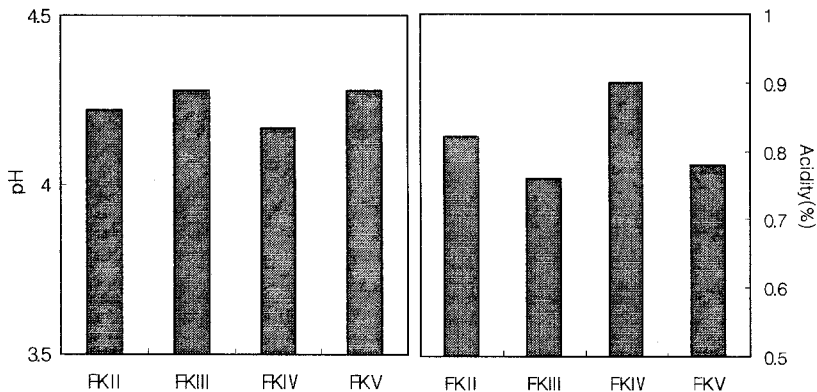


Fig. 2-15. pH and acidity in various kinds of functional kimchi(FK) fermented at 10°C for 10days

FKII(Gueun salt+KCl): The ratios of ingredient in functional *kimchi* are 13.0 radish, 2.0 green onion, 5.0 leaf mustard, 7.0 red pepper powder, 2.8 garlic, 0.1 chinese pepper powder, 0.6 ginger, 2.2 anchovy juice, 1.0 sugar and 2.5 final salt concentration in the proportion of 100 salted organic Korean cabbage.

FKIII: 5% red pepper powder added FKII

FKIV: 5% red pepper powder+ 2.8% Pear+10% Mushroom & sea tangle soup added FKIII

FKV: 5% red pepper powder + 2.8% Pear + 10% Mushroom & sea tangle soup + 1×heat treated bamboo salt B(NaCl:KCl=5:5) added FKIII

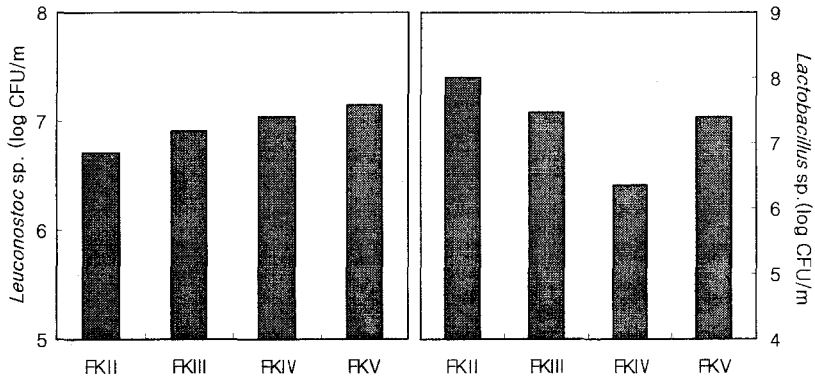


Fig. 2-16. *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. counts of various kinds of functional kimchi(FK) fermented at 10°C for 10days

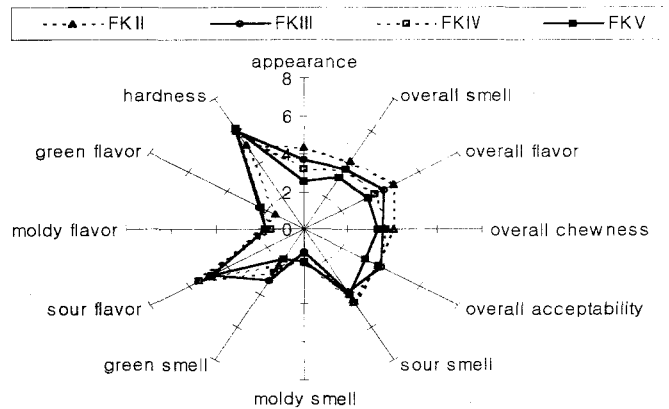


Fig. 2-17. QDA profile¹⁾ of various kinds of functional kimchi(FK) fermented at 10°C for 10 days ¹⁾ Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely good, 9-extremely bad in subjective evaluations(appearance, overall smell, overall flavor, overall chewiness and overall acceptability), and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluations(sour smell, moldy smell, green smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor and hardness)

(2) 1회 구운 죽염 B를 첨가한 암예방 김치의 항돌연변이 증진효과

1회 구운 죽염 B를 첨가한 기능성 김치V 메탄올추출물 이용하여 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과(Table 2-68) 고춧가루 함량을 5%로 낮춘 기능성 김치III에 비해 배, 미나리와 버섯·다시마물을 첨가한 기능성김치IV는 10%이상 항돌연변이효과가 감소되었으나 1회 구운 죽염 B(NaCl:KCl=5:5)을 첨가한 기능성 김치V는 기능성 김치III보다 10%정도 높은 돌연변이유발 억제효과를 보였다.

Table 2-68. Effect of the methanol extracts from functional *kimchi*(FK) on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1.25mg/plate	2.5mg/plate
Spontaneous	94 ± 8	94 ± 8
Control	1077 ± 23 ^a	1077 ± 23 ^a
FK II (cancer preventive kimchi)	767 ± 26 ^b (32)*	632 ± 11 ^b (45)
FK III (A <i>kimchi</i>)	672 ± 8 ^c (41)	510 ± 11 ^c (58)
FK IV (F <i>kimchi</i>)	763 ± 17 ^b (32)	633 ± 15 ^b (45)
FK V	524 ± 11 ^d (56)	397 ± 14 ^d (69)

*Inhibition rate(%)

(3) 1회 구운 죽염 B를 첨가한 암예방 김치의 암세포증식억제효과

1회 구운 죽염 B를 첨가한 기능성 김치 V 메탄올추출물 이용하여 MTT assay를 하였다(Table 2-69). 고춧가루 함량을 5%로 낮춘 기능성 김치 III에 비해 배, 미나리와 버섯·다시마물을 첨가한 기능성 김치 IV는 10%정도 암세포 증식억제효과가 감소되었으나 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)을 첨가한 기능성 김치 V는 기능성 김치 III과 비슷한 저해효과를 보였다. 따라서 배, 미나리, 버섯·다시마물과 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)을 첨가하면 맛과 암예방/항암 효과를 함께 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이 연구에서 결국 소금을 이용하여 맛과 암예방의 기능을 갖춘 김치를 제조하게 되었다.

Table 2-69. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from functional kimchi(FK) against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Sample	OD	
	100µg/assay	200µg/assay
Control	0.520 ± 0.01 ^a	0.520 ± 0.01 ^a
FK II (Cancer preventive <i>kimchi</i>)	0.338 ± 0.01 ^b (35)*	0.248 ± 0.01 ^b (52)
FK III (A <i>kimchi</i>)	0.244 ± 0.01 ^c (53)	0.179 ± 0.01 ^d (66)
FK IV (F <i>kimchi</i>)	0.304 ± 0.01 ^b (42)	0.229 ± 0.01 ^c (56)
FK V	0.260 ± 0.01 ^c (50)	0.182 ± 0.01 ^d (65)

*Inhibition rate(%)

나) 소금재료를 달리하여 제조한 암예방 배추김치의 암예방 기능성 증진 연구 (II)

표준화김치와 암예방기능성을 증진시킨 기능성 김치 II와 맛과 기능성을 증진시킨 기능성 김치 III~VII를 제조하여 10℃에서 10일간 발효한후 이화학적 특성을 비교하고 이 김치를 동결건조 후 메탄올로 추출하여 기능성을 검토하였다.

(1) 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)를 첨가한 암예방 김치의 이화학적 특성
표준화김치에 비해서 기능성 김치II~VII은 pH는 높고 산도가 낮아 저장성이 있었다. 맛을 증진시키기 위하여 배와 버섯·다시마 삶은 물을 첨가한 기능성 김치 IV는 다른 기능성 김치에 비해 다소 발효가 빨리 진행되었으나 1회구운죽염 B(NaCl:KCl=5:5)의 첨가(기능성 김치V)로 다시 저장성이 높아졌다(Fig. 2-18).

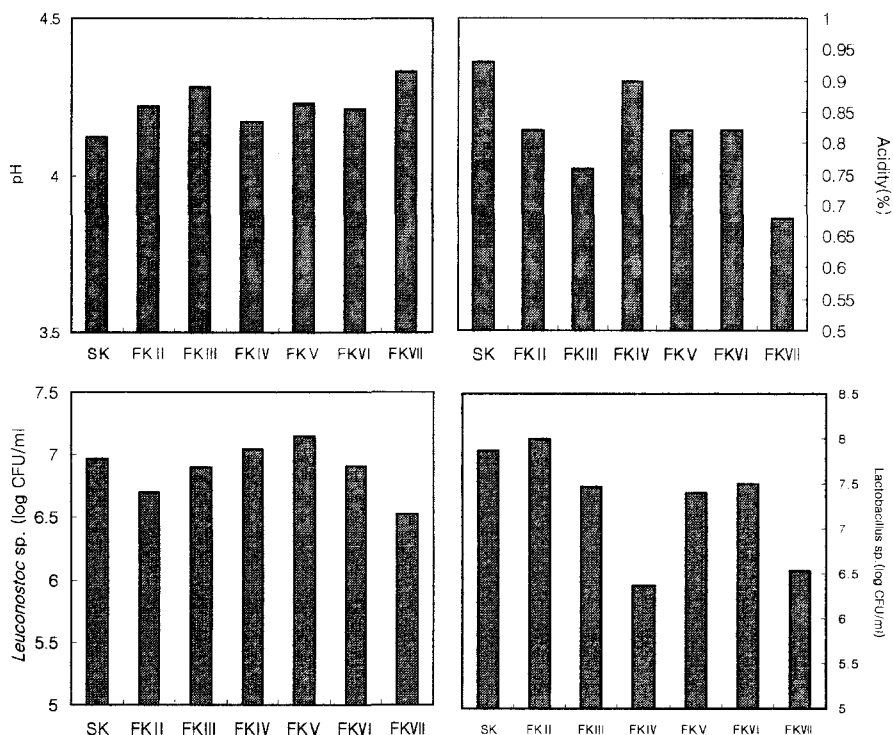


Fig. 2-18. pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. counts of various kinds of functional kimchi(FK) fermented at 10°C for 10days

(SK ; The ratios of ingredient in standardized *kimchi* are 13.0 radish, 2.0 green onion, 3.5 red pepper powder, 1.4 garlic, 0.6 ginger, 2.2 anchovy juice, 1.0 sugar and 2.5 final salt concentration(chunil salt) in the proportion of 100 salted common Korean cabbage.

FKII(Gueun salt+KCl): The ratios of ingredient in functional *kimchi* are 13.0 radish, 2.0 green onion, 5.0 leaf mustard, 7.0 red pepper powder, 2.8 garlic, 0.1 chinese pepper powder, 0.6 ginger, 2.2 anchovy juice, 1.0 sugar and 2.5 final salt concentration in the proportion of 100 salted organic Korean cabbage.

FKIII: 5% red pepper powder added FKII

FKIV: 5% red pepper powder+ 2.8% Pear+10% Mushroom & sea tangle soup added FKIII

FKV: 5% red pepper powder+ 2.8% Pear + 10% Mushroom & sea tangle soup + 1×heat treated bamboo salt B(NaCl:KCl=5:5) added FKIII

FKVI: common Korean cabbage + 5% red pepper powder+ 2.8% Pear + 10% Mushroom & sea tangle soup + 1×heat treated bamboo salt B(NaCl:KCl=5:5) added FKIII

FKVII: 5% red pepper powder+ 2.8% Pear + 1×heat treated bamboo salt A(NaCl:KCl=3:7) added FKIII

이 실험에서는 같은 레시피를 사용하면서 각각 유기 배추와 일반배추로 담근 기능성 김치 V와 VI가 pH와 산도에서 비슷한 값을 나타내었는데 이는 6개월 정도 저장했던 유기배추를 사용했기 때문으로 보인다.

배와 버섯·다시마 삶은 물을 첨가한 기능성 김치 IV와 여기에 1회구운죽염 B(NaCl:KCl=5:5)를 첨가한 기능성 김치 V는 다른 기능성 김치에 비해 맛에 관여하는 *Leuconostoc*속 젖산균의 수가 많아 배와 버섯·다시마 삶은 물의 첨가로 맛이 증진되었음을 확인할 수 있었다. 또한 기능성김치 III~VII은 모두 신맛을 내는데 관여하는 *Lactobacillus*속 젖산균 수가 표준화김치나 기능성김치 II보다 적었다.

(2) 1회 구운 죽염 B를 첨가한 암예방 김치의 항돌연변이 증진효과

Salmonella typhimurium TA100 균주의 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-70에 나타내었다. 고춧가루의 첨가량을 5%로 낮춘 기능성 김치 III은 기능성 김치 II와 비슷한 항돌연변이 효과를 보였으며 배와 버섯·다시마 삶은 물의 첨가(기능성 김치 IV)로 맛은 증진되었으나 항돌연변이 효과는 기능성 김치 III보다 10%정도 감소하였으며 1회구운 죽염 B(NaCl:KCl=5:5)를 첨가한 기능성 김치 V는 기능성 김치 II와 비슷한 돌연변이 억제 효과를 보였다. 이 실험에서 같은 레시피를 사용하면서 각각 유기 배추와 일반배추로 담근 기능성 김치 V와 VI의 항돌연변이 효과를 비교했을 때 오히려 일반배추로 담근 기능성 김치 VI가 MNNG에 의한 돌연변이 유발을 억제하는 효과가 높아 생산량이 적은 유기배추를 저장하여 사용하기 보다는 좋은 일반 배추를 즉시 구입하여 사용할 경우 항돌연변이 효과가 더 높을 수 있음을 보여주었다.

Table 2-70. Effect of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.4µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1.25mg/plate	2.5mg/plate
Spontaneous	87 ± 6	87 ± 6
Control	1089 ± 38 ^a	1089 ± 38 ^a
Standardized kimchi	863 ± 20 ^b (23)*	692 ± 35 ^b (40)
Functional kimchi II	678 ± 14 ^d (41)	542 ± 7 ^c (55)
Functional kimchi III	658 ± 19 ^d (43)	591 ± 10 ^c (50)
Functional kimchi IV	746 ± 7 ^c (34)	732 ± 14 ^b (36)
Functional kimchi V	565 ± 18 ^e (52)	543 ± 32 ^c (54)
Functional kimchi VI	470 ± 20 ^f (62)	411 ± 9 ^d (68)
Functional kimchi VII	476 ± 12 ^f (61)	414 ± 14 ^d (67)

*Inhibition rate(%)

^{a-f} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Salmonella typhimurium TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-71에 나타내었다. 1.25mg/plate의 농도에서 고춧가루의 첨가량을 5%로 낮춘 기능성 김치Ⅲ은 기능성 김치Ⅱ보다 다소 낮은 항돌연변이 효과를 보였으며 배와 버섯·다시마 삶은 물의 첨가(기능성 김치Ⅳ)로 맛은 증진되었으나 항돌연변이효과는 감소되었다. 그러나 1회구운죽염 B(NaCl:KCl=5:5)를 첨가한 기능성김치Ⅴ는 기능성김치Ⅱ보다 높은 돌연변이억제효과를 보였다. 이 실험에서 같은 레시피를 사용하면서 각각 유기 배추와 일반배추로 담근 기능성 김치Ⅴ와 Ⅵ의 항돌연변이 효과를 비교했을 때 오히려 일반배추로 담근 기능성김치 Ⅵ가 AFB₁에 의한 돌연변이 유발을 억제하는 효과가 높았으며 배와 버섯·다시마 삶은 물을 첨가하지 않고 1회구운죽염 A(NaCl:KCl=3:7)를 첨가한 기능성김치Ⅶ가 유기배추를 사용한 기능성 김치 중에서는 가장 높은 항돌연변이효과를 보였다.

Table 2-71. Effect of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1. 25mg/plate	2. 5mg/plate
Spontaneous	84 \pm 1	84 \pm 1
Control	1160 \pm 27 ^a	1160 \pm 27 ^a
Standardized kimchi	638 \pm 18 ^c (49) [*]	535 \pm 16 ^c (58)
Functional kimchi II	542 \pm 26 ^d (57)	467 \pm 14 ^{cd} (64)
Functional kimchi III	651 \pm 13 ^{cd} (47)	500 \pm 23 ^{cd} (61)
Functional kimchi IV	718 \pm 7 ^b (41)	622 \pm 18 ^b (50)
Functional kimchi V	506 \pm 16 ^d (61)	442 \pm 26 ^e (67)
Functional kimchi VI	371 \pm 8 ^f (73)	270 \pm 29 ^f (83)
Functional kimchi VII	397 \pm 11 ^e (71)	304 \pm 7 ^f (80)

*Inhibition rate(%)

^{a-f} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

다) 1회 구운 죽염 B를 첨가한 암예방 김치의 소핵유발억제효과

배, 미나리, 버섯·다시마물과 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)을 첨가한 기능성김치Ⅴ(FKⅤ)의 *in vivo* 암예방효과를 검토하기 위하여 마우스의 말초혈을 이용한 micronucleus assay를 하였다. MMC 1mg/kg을 복강투여하기 6시간 전에 표준화김치, 암예방 기능성김치Ⅱ, 암예방 기능성김치Ⅴ 각각 250mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg씩 경구로 투여하여 소핵유발빈도를 측정하였다(Fig. 2-19). 250mg/kg 투여농도에서 표준화김치는 대조군과 비슷한 소핵유발빈도를 나타내었으나 암예방 기능성김치Ⅱ와 암예방 기능성김치Ⅴ는 소핵유발억제효과를 보였다. 250mg/kg과 500mg/kg의 투여농도에서 모두 암예방 기능성김치Ⅴ가 암예방 기능성김치Ⅱ보다 (p<0.05)으로 낮은 소핵유

발빈도를 보여 맛과 기능성 증진을 위해 배, 미나리, 버섯·다시마물과 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)을 첨가한 암예방 기능성김치V가 *in vivo*에서도 암예방 기능성을 증진시키는 것으로 나타났다.

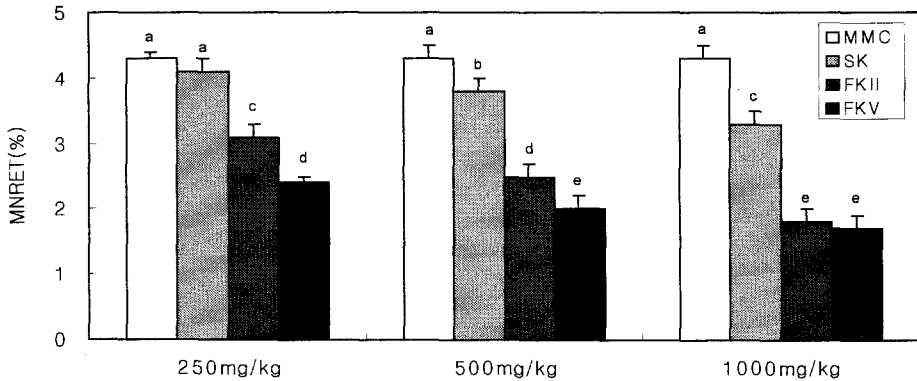


Fig. 2-19. Frequencies of micronucleated reticulocyte(MNRET) in the mice peripheral blood after administration of methanol extracts from standardized kimchi(SK) and functional kimchi(FK) followed by mitomycin C(MMC, 1mg/kg) treatment

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

마. 녹차 첨가 배추김치의 개발

암예방 증진을 위해 그리고 상품의 차별화를 위해 녹차를 이용하여 기능성을 증진한 암예방 김치(암예방 기능성 김치VI)를 제조하였다. 녹차의 약리적 효능은 현대에 들어서 과학적으로 많이 입증되었는데 특히 녹차는 flavonols, flavonoid, phenol acid를 포함한 polyphenol류를 함유하고 있어 이들에 의한 항산화 효과, 항노화 및 항돌연변이 작용 및, 이의 caffeine성분으로 인한 중추신경 흥분작용으로 정신을 맑게 하고 기억력, 판단력, 지구력을 증진시키고 두통의 억제 및 상심, 이뇨 등의 약용 효과가 있고 또한 녹차의 피부 미용 효과이외도 칼륨, 마그네슘, 망간 등의 풍부한 무기질로 인한 알칼리성 체질개선에 매우 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이렇게 다양한 효능의 녹차를 김치에 첨가하여 고기능, 특히 암예방기능을 보강시키는 암예방 배추김치를 제조하였다. 녹차김치 레시피는 본 연구팀에서 개발한 표준화 배추김치 레시피(배추 100, 고춧가루 3.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 멸치액젓 2.2, 설탕 1.0, 무 13.0, 파 2.0, 최종소금농도 2.5%)에 녹차 2%를 첨가하였다.

1) 녹차의 첨가형태를 달리하여 제조한 배추김치의 이화학적특성 및 관능성

기본 recipe에 다양한 형태(잔사, 물추출물, 녹차잎)의 녹차를 첨가하여 김치를 담그어 본 결과 관능검사에서 녹차잎의 형태로 첨가한 것이 종합적인 값에서 높은 점수

를 얻었고 김치의 저장성을 볼 수 있는 pH의 변화를 살펴보았을 때 모든 녹차를 첨가한 군이 control김치에 비해 발효가 더디게 진행되는 것을 관찰할 수 있었으며 특히 녹차잎의 형태로 첨가한 군이 조금 더 느린 것을 알 수 있었다. 또한 발효전기간 동안 산도 역시 녹차 첨가군의 김치들이 낮았으며 녹차잎 첨가군의 산도가 가장 낮았다(Fig. 2-20). 이 결과는 녹차가 나타내는 항균성으로 인한 것으로 생각되어진다. 젖산균의 변화는 녹차 첨가 김치군에서 발효 진행이 더디게 진행되므로 *Lactobacillus* sp. 젖산균수는 발효기간 내내 control김치에 비해 적은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 김치의 맛성분에 관여하는 *Leuconostoc* sp 수의 경우도 다소 적었다. 이 때 녹차잎의 형태로 첨가한 김치군의 *Lactobacillus* sp. 젖산균수가 다른 형태의 녹차 첨가군보다 다소 적었다(Fig. 2-20). 그러나 관능검사에서는 녹차잎 첨가 김치의 종합적 평가가 가장 높았다(Fig. 2-21).

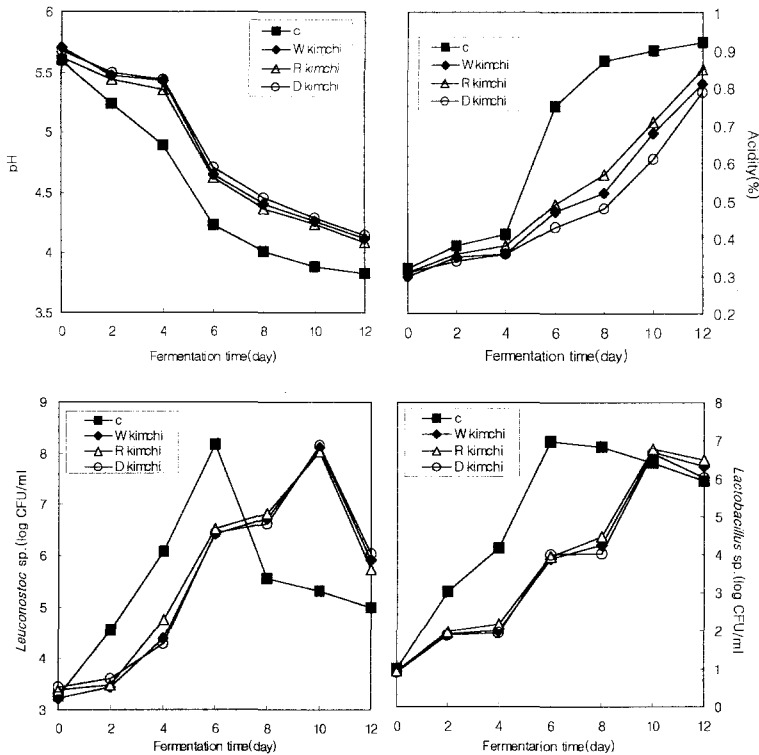


Fig. 2-20. The changes of pH, total acidity, *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. counts in various kinds of green tea added Korean cabbage kimchi during fermentation at 10°C

Control(C) : Control kimchi (common Korean cabbage kimchi)
W kimchi : C kimchi with 2% addition of water extract of green tea leaf
R kimchi : C kimchi with 2% addition of remnant of green tea leaf after water extracting
D kimchi : C kimchi with 2% addition of dried green tea leaf.

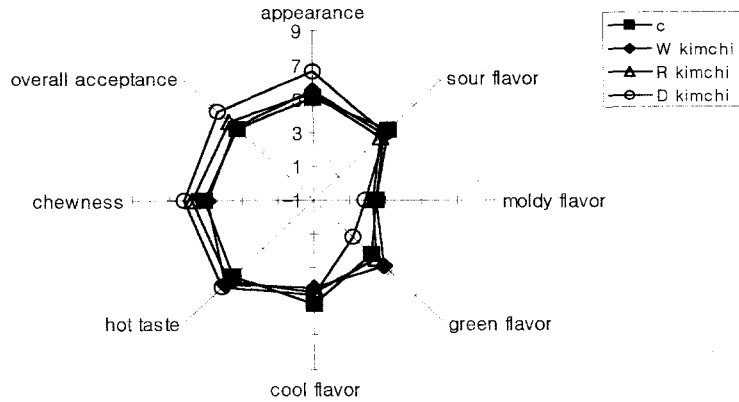


Fig. 2-21. QDA profile of various kinds of green tea added Korean Cabbage kimchi during fermentation at 10°C

2) 녹차의 첨가량을 달리하여 제조한 배추김치의 이화학적특성 및 관능성

앞에서 행한 실험에서 녹차 첨가형태를 결정하고 나서 식미를 거스르지 않고 김치의 저장효과를 높일수 있는 녹차 첨가농도를 결정하기 위해 녹차잎 1, 2, 3, 4%를 첨가하여 김치를 제조하였다. 이들의 이화학적실험을 행한 결과 녹차잎의 첨가량이 많을수록 pH가 높았고 또한 산도는 낮았다(Fig. 2-22). 즉, 녹차의 첨가량이 많으면 많을수록 그 저장성이 높아지는 것을 알수 있었으나 이것이 상품화되었을 때 소비자들의 거부감을 느끼지 않는 농도를 결정하기 위해 관능검사를 실시하였다. 녹차잎 2%첨가군까지는 종합적 평가가 control군에 비하여 오히려 높았으나 그 이상의 첨가군에서는 종합적평가가 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 2-23). 전체적으로 녹차첨가군의 *Lactobacillus* sp. 젖산균수가 적은 것(Fig. 2-22)은 녹차의 항균성때문으로 사료되며 이는 지금까지의 연구인 녹차 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성과 젖산균의 생육저해인자 검색, *Vibrio metschnikovii* 및 *Alcaligenes faecalis*등에 대한 항균활성 및 catechin과 caffeine과의 상승효과에 대한 보고 등과도 일치하는 것으로 생각된다. 즉, 김치에 녹차를 부재료로 첨가함으로써 김치의 저장기간이 연장되었으며 품질면에서도 적정량의 녹차첨가에 의해 김치의 종합적 향미가 증진되는 것을 알수 있었다.

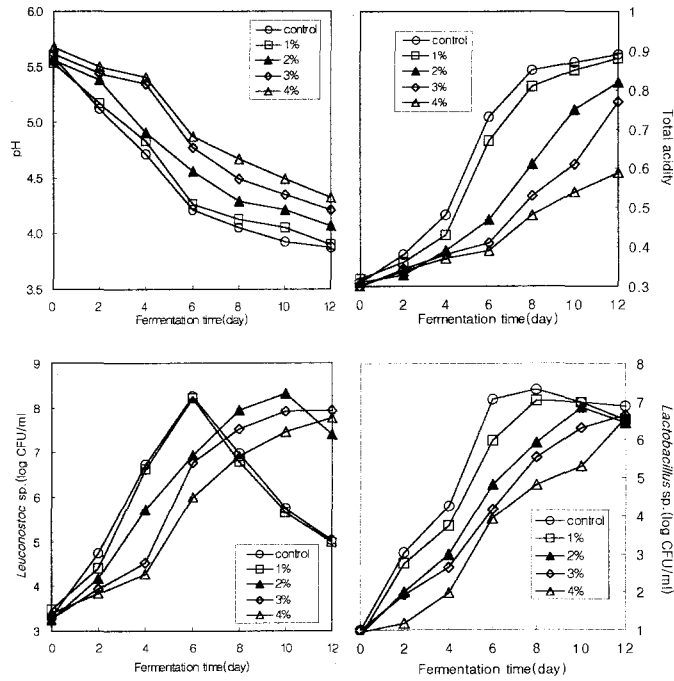


Fig. 2-22. The changes of pH, total acidity, *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. bacterial counts in various amounts of green tea added Korean cabbage kimchi during fermentation at 10°C

Control :Control kimchi(common Korean cabbage kimchi) 1% : C kimchi with 1% addition of dried green tea leaf, 2% : C kimchi with 2% addition of dried green tea leaf, 3% : C kimchi with 3% addition of dried green tea leaf, 4% : C kimchi with 4% addition of dried green tea leaf.

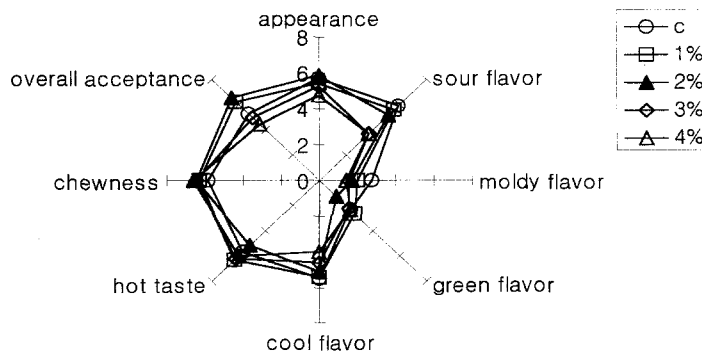


Fig. 2-23. QDA profile of various amounts of green tea added Korean cabbage kimchi during fermentation at 10°C

3) 녹차첨가 배추김치의 항돌연변이성 증진효과

앞의 실험에서 김치에 첨가할 녹차의 형태와 양은 녹차잎을 2%첨가하는 것으로 결정하였기에 녹차를 첨가한 배추김치의 기능성을 살펴보기 위한 실험을 행하였다. 먼저 김치의 레시피는 앞에서 소개한 표준레시피(CKI)와 본 실험실에서 개발한 고춧가루와 마늘의 양을 늘리고 항암활성이 높다고 알려진 초피와 갖을 첨가한 기능성 배추김치레시피(CKII, 고춧가루 5%), 2가지를 이용하였고 이에 사용하는 배추는 일반배추와, 식이섬유소, 비타민 C, 카로티노이드등의 함량과 기능성이 높은 유기배추를 이용하였으며 녹차는 그 양에 따른 활성도의 차이를 보기위하여 관능검사결과시 가장 좋은 농도였던 2%첨가 김치와 그 2배에 해당하는 4%첨가 김치를 담그었다.

그 결과 유기배추를 이용하고 녹차의 함유량이 높을수록 항돌연변이 및 항암효과가 증진되는 것을 알 수 있었다. 즉 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이효과를 살펴본 결과 200 μ l/plate 첨가농도에서 CK kimchi(I)이 41%의 저해효과를 나타낸 반면 4%의 녹차를 첨가한 OK kimchi(II)가 74%의 항돌연변이효과를 4%의 녹차를 첨가한 CK kimchi(II)가 66%의 저해율을 나타내었다. 또한 식미에 의해 거부감이 없는 농도인 2%첨가군에서도 OK kimchi(II), CK kimchi(II) 각각 62%와 57%의 저해율을 나타내었다(Table 2-72). 결국 암예방 김치에 녹차를 첨가하여 보존성과 기능성이 증진되는 것으로 나타났다.

Table 2-72. Antimutagenic effect of juices from control kimchi and various amounts and types of green tea added kimchi¹ on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.45 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	100 μ l/plate	200 μ l/plate
Spontaneous	117 \pm 3	117 \pm 3
Control	1346 \pm 22	1346 \pm 22
C kimchi(I)	873 \pm 15(38)	873 \pm 15(41)
CK kimchi(I) with green tea	2%	767 \pm 22(47)
	4%	687 \pm 11(54)
OK kimchi(I) with green tea	2%	705 \pm 9(52)
	4%	576 \pm 13(63)
CK kimchi(II) with green tea	2%	707 \pm 12(52)
	4%	615 \pm 15(60)
OK kimchi(II) with green tea	2%	617 \pm 16(60)
	4%	552 \pm 15(65)

¹Kimchi samples were fermented at 10 $^{\circ}$ C

4) 녹차첨가김치의 소핵유발억제효과

이들의 *in vivo*에서의 암예방 활성을 보기 위해 소핵 실험을 하였다. ICR 마우스

에 MMC 1mg/kg을 복강투여하기 6시간 전에 시료 500mg/kg을 경구투여 하였을 경우 일반배추김치는 소핵 유도를 억제하지 못하였으나 녹차가 들어간 김치군들에서는 유의성있게 소핵유도를 억제하였고 이때 녹차의 양이 많을수록 그리고 유기배추를 사용할수록 효과가 좋았고 1000mg/kg을 경구투여한 군에서도 같은 경향으로 소핵유발억제 효과가 있는 것으로 보아 녹차를 부재료로 첨가한 배추김치가 *in vivo* 암예방 활성이 증진되는 기능성 김치로서의 가능성을 보여주었다(Fig. 2-24).

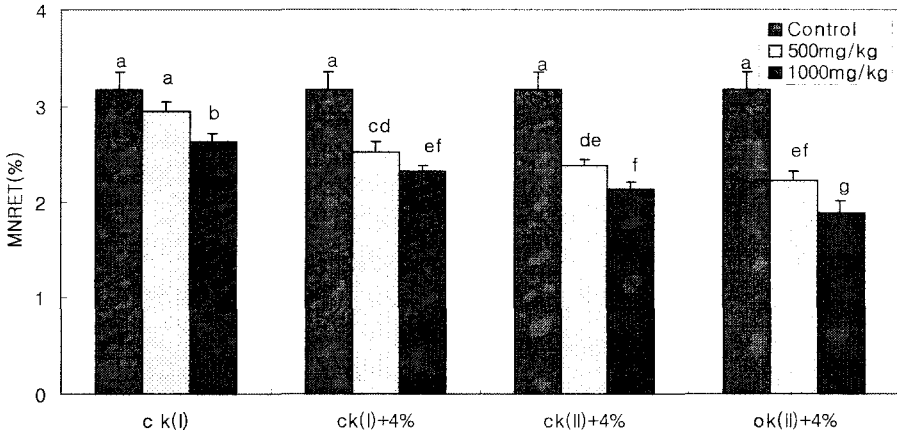


Fig. 2-24. Anticlastogenic effect of methanol extract of kimchi in MMC induced mice using *in vivo* supravital staining micronucleus assay.

4. 암예방 부추김치의 개발

배추김치외에 여러 김치무리 중 암예방효과가 큰 김치를 선택하여 암예방 기능성 김치로 개발하기 위해 김치의 주 원료가 되는 주요 채소류들의 항돌연변이 활성을 실험한 결과는 Table 2-73과 같다. *Salmonella typhimurium* TA100 균주에서 MNNG와 AFB₁의 돌연변이유발성을 가장 많이 억제한 채소는 부추와 썸바귀였다. 이 중에서 부추는 경남지역이 주산지이며 또한 부추김치는 이 지역의 중요한 별미김치이기에 부추김치를 암예방효과가 많은 기능성 김치로 개발하기로 하였다. 이 연구에서는 부추김치의 재료배합비 및 발효방법의 표준화를 먼저 연구한 후 그에 대한 기능성연구를 강화하기로 하여 부추김치의 표준화를 먼저 실시하였다.

가. 부추김치의 표준화 연구

1) 문헌에 의한 배합비 표준화

경상도에서 부추김치의 담금솥씨가 뛰어나다고 추천된 가정 5곳을 탐방하여 재료의 분량 및 담금방법을 전수받은 것과 각종 문헌 및 조리서에 명시된 부추김치의 재료의

Table 2-73. The effect of the juices from various green-yellow vegetables on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine(MNNG, 0.3 μ g/plate) and aflatoxin B₁(0.3 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

시료(Sample)	MNNG		Aflatoxin B ₁	
	Revertants /plate	Inhibition (%)	Revertants /plate	Inhibition (%)
Spontaneous Control	91 \pm 2		140 \pm 1	
배추(Chinese cabbage)	1533 \pm 12	-	563 \pm 23	39
파(Green onion)	1758 \pm 21	-	301 \pm 16	77
오이(Cucumber)	1256 \pm 31	9	658 \pm 20	25
부추(Leek)	658 \pm 36	56	254 \pm 8	84
미나리(Water dropwort)	1227 \pm 27	12	351 \pm 27	70
고들빼기	1408 \pm 14	-	235 \pm 10	86
갯(Mustard leaf)	1349 \pm 12	3	664 \pm 7	27
우엉(Burdock)	1372 \pm 27	1	335 \pm 10	72
갯잎(Perilla leaf)	1009 \pm 26	29	209 \pm 12	90
고추잎(Red pepper leaves)	1302 \pm 14	6	232 \pm 11	87
고추(Red pepper)	1878 \pm 21	-	618 \pm 27	31
씀바귀	483 \pm 32	70	214 \pm 6	89
총각	1831 \pm 10	-	677 \pm 11	23
무(Radish root)	1405 \pm 13	-	420 \pm 7	60
열무	1243 \pm 9	11	490 \pm 22	50

분량과 담금법 등을 체계적으로 정리 및 환산하여 원료의 배합비를 표준화한 결과는 Table 2-74과 같다. 즉 부추김치에 사용한 양념의 배합비는 부추 100에 대한 상대비로서 멸치젓국 10.8 \pm 8.6, 고추가루 6.7 \pm 2.2, 마늘 4.7 \pm 1.7, 생강 2.1 \pm 0.7, 찹쌀풀 13.0 \pm 1.7, 설탕 1.7 \pm 1.3이였으며, 이들을 목측량으로 나타내면 부추 1kg에 대하여 멸치젓국 0.51컵, 고추가루 0.64컵, 마늘 1.57통, 생강 0.70톨, 찹쌀풀 0.54컵, 설탕 1.13TS이었다. 젓국은 주로 멸치젓이었으나 때로는 조리서에서 새우젓으로 담는 것도 볼 수 있었으며 찹쌀풀을 이용하였으며 멸치젓국의 양과 고추가루의 양은 조리서에 비해 많이 넣음으로서 경상도 특유의 걸쭉한 양념을 만들어 맵고 진한 맛을 내는 김치를 담고 있음을 알 수 있었다. 부재료로 실파와 무우를 넣는 경우와 마늘과 생강은 첨가하지 않는 경우도 있었으나, 이러한 빈도는 낮아서 표준화 과정에서 무시할 수 있었다.

절이는 방법으로는 젓갈에 절이거나 소금을 뿌려 절이는 2가지 방법이 있는데 소금에 절일 경우 수분이 빠져나가 질겨지므로 젓국만으로 국물없이 담그는 방법이 권장되기도 하였다. 절인 부추는 고추가루, 찹쌀풀, 젓국, 마늘, 생강, 설탕, 통깨를 넣고 혼합하여 만들어진 양념으로 버무리 용기에 담는 것으로 이들의 담금 방법은 거의 유사하였다. 그러나 부추를 절이지 않고 양념을 만들어 씻은 부추에 바로 버무리

거나 부추에 고추가루와 젓갈을 뿌리는 방법으로 담기도 하는데 대부분의 가정에서는 찹쌀풀을 이용하여 경상도 지방 특유의 곁쪽한 양념장을 만들어 부추김치를 담그는 경향이였다.

Table 2-74. Standardized ingredients ratio of buchu kimchi preparation from literatures

Ingredients	Weight(g)	Percentage(%)
Buchu	1000	100
Red pepper powder	70	6.7±2.2
Fermented anchovy juice	110	10.8±8.6
Crushed garlic	50	4.7±1.7
Crushed ginger	20	2.1±0.7
Glutinous rice paste	130	13.0±1.7
Sugar	20	1.7±1.3

2) 실험에 의한 배합비 표준화

이화학적 실험과 관능검사를 실시하여 각각 찹쌀풀 농도, 고춧가루 농도, 마늘농도, 생강농도 등을 표준화하였다. 결국 각각의 재료의 농도를 달리한 부추김치에서 젓갈 11%, 고춧가루 7%, 마늘 3%, 생강 2%를 첨가하는 것이 맛과 저장성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 한 가지 부재료의 농도만을 달리하여 비교하였기 때문에 각각의 부재료가 서로 다르게 혼합되었을 때 발효양상을 살펴 볼 수는 없었다. 특히 부추김치를 담글 때 가장 많이 첨가되는 부재료가 젓갈과 고춧가루이고 젓갈은 발효를 촉진시키며 고춧가루는 발효를 지연시키는 점을 고려할 때 이들의 혼합비율이 맛을 가장 크게 좌우하리라 생각되었다. 따라서 부추와 가장 잘 어울릴 수 있는 재료 배합비를 찾아 독특하고 개성있는 맛을 가진 부추김치로 표준화하기 위해서 재료배합비를 달리하였을 때의 발효양상을 살펴보았다.

젓갈, 고춧가루, 마늘 및 생강의 배합비를 다르게 하여 4가지 부추김치를 담근 후 발효과정을 실험을 통해 살펴보았다. 시료 1은 젓갈 11%, 고춧가루 7%, 마늘 3%, 생강 2%, 시료 2는 젓갈 9%, 고춧가루 5%, 마늘 3%, 생강 2%, 시료 3은 젓갈 13%, 고춧가루 9%, 마늘 5%, 생강 2%, 시료 4는 젓갈 11%, 고춧가루 7%, 마늘 0%, 생강 0%를 첨가하였다.

담금 초기의 pH 값은 재료배합에 따라 달라지는데 젓갈 함량이 적은 시료 2에서 초기 pH값이 가장 낮게 나타났으나 초기 발효가 빠르게 진행되어 6일째 pH값이 4.20으로 떨어졌으며 9일째 4.10으로 발효 후기 pH값의 변화는 적게 나타났다. 산도는 담금 직후 다른 시료에 비해 낮은 값이었으나 발효가 진행되면서 초기 6일까지 증가 속도가 빨랐으며 그후 9일째 1.09%를 나타내어 pH와 마찬가지로 산도의 변화에서도 젓갈 함량이 낮은 시료가 초기 발효는 빠르나 후기 발효가 억제되는 결과를 나타내었

다. 이 결과는 앞서 젓갈 종류를 달리한 실험에서 젓갈 무침가군에서 나타난 data와 일치하였다. 젓갈, 고추가루, 마늘 함량이 높은 시료 3은 초기 pH가 낮은 반면 6일째 4.30, 9일째 4.13을 나타내어 다른 시료에 비해 pH가 높았기 때문에 발효가 비교적 느리게 진행됨을 알 수 있었다. 산도에서도 비슷한 결과로 초기 산도가 타 시료에 비해 낮지 않았으나 저장 6일과 9일의 값이 0.75%와 1.06%를 보여 증가율이 낮게 나타났다. 환원당의 함량은 젓갈함량이 높은 시료 3에서 가장 높은 값이었으며 젓갈함량이 9%인 시료 2에서 가장 낮게 나타났다. 젓갈 11%와 고추가루를 7%로 동일한 함량으로 첨가하고 마늘과 생강을 첨가한 시료 1과 첨가하지 않은 시료 4에서는 초기 환원당량이 시료 1에서 높게 나타났고 저장 6일째 비슷한 값을 나타내었으나 9일째 오히려 시료 1에 낮은 값을 나타내어 마늘과 생강 첨가군이 발효가 빨리 진행됨을 알 수 있으며 이러한 현상은 pH, 산도 및 젖산균수의 측정에서도 같은 결과를 얻었다. 젖산균수의 측정실험에서 저장 6일까지 젖산균수가 크게 증가하였으며 그 이후 젓갈함량이 낮은 시료 2와 마늘과 생강 무침가군에서 발효 9일까지 약간의 증가를 보였으나 시료 1에서는 젖산균수의 감소를 나타내었다.

관능검사 결과 양념양이 적었던 시료 2는 담금 초기 풋내가 많이 느껴졌으나 대신 부추향미는 좋았으며 발효 후반부인 9일째 이취가 적었고 종합적인 맛이 좋은 것으로 나타났다. 젓갈 함량이 13%로 높았던 시료 3에서 외관이 좋았으며, 신맛이 비교적 적었고 대신 매운맛은 강하게 느껴졌으며 종합적인 맛은 담금 초기부터 6일까지 가장 좋게 나타났다.

위 결과에서 고추가루, 마늘, 생강등의 한가지 부재료를 다르게 첨가한 부추김치의 발효양상을 비교했을 때 가장 맛과 저장성이 있었던 시료 1에 비해 시료 3이 조금 더 맛과 저장성이 있는 것으로 나타났다. 이와같이 시료 3이 초기 젖산균수가 많아 발효작용은 촉진되면서 산도와 pH에서 숙성지연효과가 나타나는 것은 부재료가 가지는 buffer작용을 비롯하여 부재료의 양적증가로 인하여 이들이 가지는 맛의 혼합효과 등 다양한 작용에 의한 것으로 보인다. 따라서 재료배합비를 달리한 부추김치를 담취이화학 실험 및 관능검사를 하여 얻어진 결과에서 표준화된 재료배합비는 Table 2-75와 같으며 부추100에 대한 상대비로 멸치젓국 13.0, 고추가루 9.0, 마늘 5.0, 생강 2.0, 찹쌀풀 13.0, 설탕 17.0으로 결정하였다. 이러한 결과는 문헌에 의한 표준화에서의 재료배합비와 비교할 때 비슷한 결과인데, 단 고추가루가 6.7 ± 2.2 에서 9.0으로 멸치젓갈이 10.8 ± 8.6 에서 13.0으로 증가되었다.

3) 절임 방법의 차이에 의한 부추김치의 발효양상

부추김치를 담글 때 부추가 물러지는 것을 방지하기 위하여 가능한 부추를 많이 치대지 않고 절인다. 소금물, 소금 혹은 젓갈 절임 중 좀더 나은 방법을 과학적으로 증명해 보고자 행한 실험 결과, 소금물에 살짝 절이거나 젓갈로 버무려 절이는 방법

Table 2-75. Standardized ingredients ratio of buchu kimchi preparation from physico-chemical and microbial changes, and sensory evaluation

Ingredients	Weight(g)	Percentage(%)
Buchu	1000	100
Red pepper powder	90	9.0
Fermented anchovy juice	130	13.0
Crushed garlic	50	5.0
Crushed ginger	20	2.0
Glutinous rice paste	130	13.0
Sugar	20	2.0

이 소금을 뿌려 놓는 경우와 비교해 볼 때 외관과 부추향에서 큰 차이가 없었다. 젓갈 절임의 경우 젓갈내와 이취가 많이 났으며 종합적인 맛은 소금물로 절인 부추김치에서 가장 높게 나타났다. 젖산균의 함량은 저장 6일째 가장 높았으며 절임 방법에서는 젓갈 절임한 부추김치 시료가 5.8×10^7 CFU/ml로 가장 낮게 나타났고, 소금을 뿌리는 경우와 소금물에 담근 경우 각각 3.5×10^8 CFU/ml, 5.1×10^8 CFU/ml로 비슷하게 높은 수치를 나타내었다.

소금물로 절이는 방법이 소금을 뿌려 절이는 방법과 저장성에서 별 차이를 보이지 않았고 관능검사에서는 오히려 더 좋은 점수를 얻었기 때문에 부추김치를 담글 때 부추를 절이는 방법은 20% 소금물에 20분간 절이는 것으로 결정하였다.

나. 부추김치의 암예방 효과

1) 부추김치의 소핵유발억제효과

부추김치(적당히 익은 김치, pH 4.3)추출물을 이용해 *in vivo*에서도 암예방효과가 있는지를 소핵실험을 통해 연구하였다.

김치시료의 소핵유발 억제효과 연구에 대한 시험을 수행하기에 앞서 김치시료(메탄올추출물) 자체의 소핵시험을 수행하여 김치시료가 소핵을 유발하지 않음을 확인하였고, 소핵유발물질인 mitomycin C(MMC)를 주사하여 소핵을 유발시킨 mouse에게 각 김치시료를 MMC와 동시투여(co-treatment), 전투여(pre-treatment), 후투여(post-treatment)로 투여하여 각각의 경우 MMC에 의한 소핵 유발능의 억제효과를 관찰하였다.

가) 김치시료에 대한 소핵시험

부추김치를 최고용량인 1,000mg/kg으로 1회 경구투여하여 36, 48, 60시간 후 마우스의 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취한 다음 소핵의 유발빈도를 계수한 결과 부추김치는 48시간을 소핵 유발 최적시간으로 결정하였다. 최고용량에 대한 공비 2로 설정된 500, 250mg/kg의 용량에 대해 최적시간에서의 혈액을 채취하여 유발된 소핵을 계수하

였다. 각각의 결과에 대해 이항분포를 통한 검정(유의수준 0.05)을 수행하였고, 각 시험군은 음성대조군에 비해 통계학적 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 이에 따라 본 시험 조건하에서 부추김치시료는 소핵을 유발하지 않는 것으로 판정되었다(Table 2-76).

Table 2-76. MNRET frequency in the mouse peripheral blood of mICR mouse by buchu kimchi

Route	Dose (mg/kg)	Number of mouse	Sampling time(hr)	MNRET ¹ (% , mean±SD)	
Negative control ²		6	48	0.22±0.06	
Mitomycin C	IP ³	6	48	4.04±0.98	
buchu kimchi	PO ⁴	1000	6	36	0.24±0.07
		1000	6	48	0.28±0.11
		1000	6	60	0.21±0.12
		500	6	60	0.28±0.08
		250	6	60	0.24±0.07

¹Micronucleated reticulocyte, 2000 reticulocytes per mouse were counted

²Peripheral blood was obtained from non-treated mice

³Intraperitoneal administration ⁴Oral administration

나) MMC로 유도된 마우스에서의 김치시료의 소핵형성억제효과

부추김치의 250, 500 그리고 1000mg/kg의 각 용량을 MMC 1mg/kg용량과 병행 투여하였다. 병행투여를 MMC투여의 3시간 전투여, 동시투여, 그리고 3시간 후 투여로 하였다. 부추김치의 경우는 3시간 전처리군(pre-treatment)의 1000mg/kg과 500mg/kg의 경구투여시 유의성 있는 MMC의 소핵유도를 억제하는 것으로 나타났으며, 500mg/kg의 투여군이 현저한 소핵억제 유발능을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 2-25)

부추김치의 경우는 MMC의 복강투여의 3시간과 6시간 전에 경구투여시 유의성 있는 소핵유발능의 감소효과를 나타내었다(결과 생략). 마우스의 말초혈을 이용한 *in vivo* supravital staining micronucleus assay를 이용한 위의 결과를 통해 부추김치시료의 소핵유발억제능을 확인할 수 있었으며, 이는 *in vivo*에서 부추김치의 항돌연변이 및 암예방효과를 예측할 수 있는 자료로 제시될 수 있으리라 사료된다.

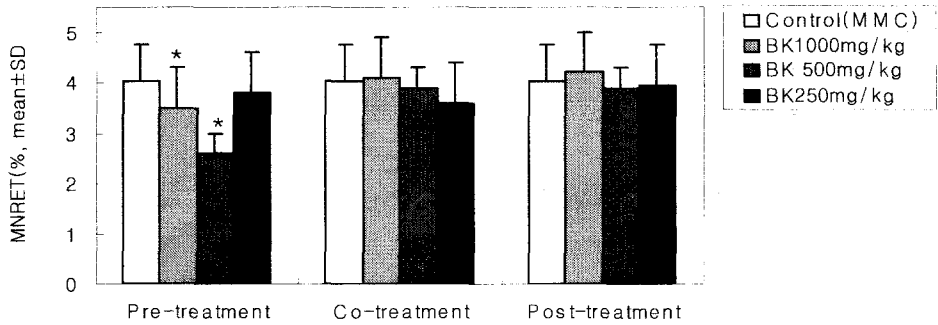


Fig. 2-25. Anticlastogenic effect of buchu kimchi(BK) in MMC-induced mice using *in vivo* supravital staining micronucleus assay
*p<0.05

다. 부추김치에서 항돌연변이 활성물질 동정

1) 부추김치의 항돌연변이 효과

표준화된 부추김치의 항돌연변이성을 살펴보기 위하여 15℃에서 0일, 6일, 9일간 발효시킨 부추김치의 메탄올추출물과 15℃에서 4일간 발효(가장 항돌연변이 활성이 높음)시킨 배추김치의 메탄올추출물을 비교하여 Ames test를 하였다(Table 2-77). AFB₁의 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과 0.63mg/plate 첨가농도에서 부추김치메탄올추출물은 65-67%의 저해효과를 보였고, 4일째 배추김치 메탄올추출물은 53%의 저해효과를 나타내었다. 또한 2.5mg/plate첨가농도에서도 부추김치메탄올추출물은 78-81%, 배추김치메탄올추출물은 74%의 돌연변이 억제효과를 보여 부추김치가 배추김치보다 더 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다(p < 0.05). 특이한 결과는 배추김치는 잘익은 김치가 가장 활성이 높으나 부추김치는 생김치(0일), 적당히 익은 김치(6일), 푹익은 김치(9일) 간의 활성차이가 거의 없었다.

부추김치에서 돌연변이 유발을 억제(항발암)하는 물질을 검색하기 위해 15℃에서 6일 발효시킨 부추김치를 동결건조한 후 methanol로 추출하였다. 회전식 진공농축기로 농축후 다시 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올 그리고 물분획물을 얻어 그 활성을 검토한 결과는 Table 2-78과 같다. 김치의 메탄올추출물, 헥산추출물과 탈지한 메탄올추출물 및 분획물의 *Salmonella typhimurium* TA100의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과에서 디클로로메탄층이 매우 높은 저해효과를 보였는데 0.5mg/plate에서 88%, 1.0mg/plate에서는 95%의 매우 높은 돌연변이 억제효과를 보여 부추김치의 여러 추출물과 분획물 중 디클로로메탄 층이 가장 높은 항돌연변이 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

Table 2-77. Effect of methanol extract from buchur kimchi and chinese cabbage kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.2 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of methanol extract, mg/plate)		
	0.63	1.25	2.5
Spontaneous	135 \pm 4		
AFB ₁ (Control)	999 \pm 51 ^a		
AFB ₁ +0 day buchur kimchi	438 \pm 36 ^c (65) ¹	404 \pm 7 ^b (69)	323 \pm 31 ^{cd} (78)
AFB ₁ +6 day buchur kimchi	420 \pm 23 ^c (67)	374 \pm 20 ^b (72)	297 \pm 11 ^c (81)
AFB ₁ +9 day buchur kimchi	427 \pm 17 ^c (66)	383 \pm 14 ^b (71)	297 \pm 13 ^c (81)
AFB ₁ +Chinese cabbage kimchi	541 \pm 33 ^b (53)	421 \pm 13 ^b (67)	358 \pm 22 ^b (74)

¹The values in parentheses are the inhibition rate(%)

^{a-c}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 2-78. Effect of the fractionated samples from buchur kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(1.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, mg/plate)	
	0.5	1.0
Spontaneous	148 \pm 8	
Control	1034 \pm 47	
Methanol ext.	377 \pm 19(74)	275 \pm 20(86)
Methanol soluble ext.	361 \pm 29(76)	266 \pm 20(87)
Hexane ext.	943 \pm 31(10)	755 \pm 29(31)
Dichloromethane fr.	257 \pm 1(88)	194 \pm 15(95)
Ethyl acetate fr.	538 \pm 28(56)	456 \pm 32(65)
Butanol fr.	1051 \pm 22(-)	937 \pm 18(11)
Aqueous fr.	605 \pm 24(48)	483 \pm 21(62)

¹The values in parentheses are the inhibition rate(%)

2) 부추김치의 항발암효과

표준화된 부추김치의 항발암효과를 살펴보기 위하여 15 $^{\circ}$ C에서 0일, 6일, 9일간 발효시킨 부추김치의 메탄올추출물과 15 $^{\circ}$ C에서 4일간 발효(가장 항발암 활성이 높음)시킨 배추김치의 메탄올추출물을 비교하여 C3H/10T1/2 cell에서 MCA에 의한 세포독성저해효과를 살펴보았다(Table 2-79). 100 μ g/assay의 농도에서 4일간 발효시킨 배추김치는 MCA에 의한 세포독성을 35% 억제한 반면 6일간 발효시킨 부추김치는 46%의 세포독성 억제효과를 보여 부추김치가 배추김치보다 MCA에 대한 cytotoxicity억제효과가 큰 것으로 나타났다. MCA에 의한 transformation foci 생성 억제 효과를 검토하기 위해 Type I, Type II, Type III로 구분하여 foci를 계수한 결과(Table 2-80) 대조군의 경우

type II (50% 발암성)와 type III (85% 발암성)를 합친 것이 20.0개인 것에 비해 배추김치와 부추김치를 100 µg/assay 첨가한 것은 각각 11.3개와 7.4개로 부추김치가 배추김치보다 MCA에 의한 transformation foci의 형성 저해효과가 높았다.

Table 2-79. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 µg/ml) and methanol extracts from buchu kimchi and chinese cabbage kimchi

Treatment (µg/assay)		Cell colony	Cytotoxicity
MCA (control)		104 ± 5 ^a	1.00
0 day buchu kimchi	50	134 ± 2 ^c	1.29
	100	146 ± 2 ^{de}	1.40
6 day buchu kimchi	50	136 ± 2 ^c	1.29
	100	151 ± 2 ^e	1.46
9 day buchu kimchi	50	131 ± 1 ^c	1.26
	100	144 ± 3 ^d	1.38
4 day Chinese cabbage kimchi	50	123 ± 3 ^b	1.18
	100	140 ± 2 ^d	1.35

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

^{a-c} Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2-80. Inhibitory effect of methanol extracts from buchu kimchi and chinese cabbage kimchi on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 µg/ml)

Treatment (µg/assay)		Total number			
		Type I foci	Type II foci	Type III foci	Type II + III foci
MCA (control)		11.7	11.3	9.7	20.0
MCA + 6 day buchu kimchi	50	8.3	7.0	4.7	11.7
	100	4.7	4.7	2.7	7.4
MCA + 4 day chinese cabbage kimchi	50	8.3	8.7	8.0	16.7
	100	7.7	6.3	5.0	11.3

Table 2-81은 부추김치의 분획물이 C3H/10T1/2 cell에서 MCA에 의한 세포독성을 저해하는 효과가 있는지를 살펴보기 위해 cytotoxicity test를 행한 결과이다. 메탄올 추출물과 탈지한 메탄올추출물은 각각 44%와 52%의 cytotoxicity저해효과를 나타내었고, 헥산추출물은 15%의 낮은 cytotoxicity저해효과를 나타내었다. 분획물 중에서는 디클로메탄층이 MCA에 의한 C3H/10T1/2 cell에 대한 cytotoxicity를 억제하는 효과가 가장 커 77%의 높은 저해효과를 보였다. MCA에 의한 transformation foci 생성 억제효과를 검토한 결과 (Table 2-82) 대조군의 경우 type II와 type III를 합친 것이 25.0개

인 것에 비해 부추김치의 디클로메탄 분획물을 처리한 경우는 25 μ g과 50 μ g의 농도에서 각각 8.0개, 5.0개로 MCA에 의한 transformation foci의 형성을 저해시켜 부추김치의 디클로로메탄 분획물은 메탄올 추출물보다 암발생 억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

Table 2-81. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 μ g/ml) and fractionated samples from buchu kimchi

Treatment (μ g/assay)		Cell colony	Cytotoxicity
MCA(control)		108 \pm 4	1.00
MeOH ext.	50	156 \pm 3	1.44
MSF	50	164 \pm 4	1.52
Hex. fr.	50	124 \pm 1	1.15
CH ₂ Cl ₂ fr.	50	191 \pm 4	1.77
EtoAC fr.	50	154 \pm 2	1.43
BuOH fr.	50	129 \pm 5	1.19
Aqueous fr.	50	118 \pm 7	1.09

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

Table 2-82. Inhibitory effect of methanol extract and dichloromethane fraction (CH₂Cl₂ Fr.) from buchu kimchi on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 μ g/ml)

Treatment (μ g/assay)	Total number				
	Type I foci	Type II foci	Type III foci	Type II + III foci	
MCA (control)	15.3	15.0	10.0	25.0	
MCA + CH ₂ Cl ₂ fraction					
	25	8.7	4.3	3.7	8.0
	50	4.3	3.3	1.7	5.0

3) 부추김치에서 암예방효과를 나타내는 활성물질 동정

부추 김치 분획물 중 암예방 활성이 가장 뛰어났던 디클로로메탄 분획을 silicagel column chromatography를 이용하여 분리하고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, GC-MS를 이용하여 주요 활성물질을 동정하였다. 디클로로메탄분획으로부터 silicagel column chromatography를 이용하여 얻은 결정을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, GC-MS를 통하여 동정한 결과 주요 활성물질의 하나로 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl hexadecanoic acid가 동정 확인되었다(Fig. 2-26~2-29).

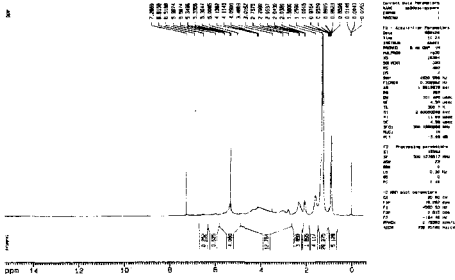


Fig. 2-26.
¹H-NMR spectrum of column chromatography of active compound from dichloromethane fr. of buchu kimchi in CDCl₃

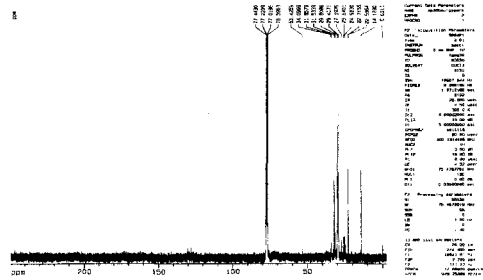


Fig. 2-27.
¹³C-NMR spectrum of column chromatography of active compound II from dichloromethane fr. of buchu kimchi in CDCl₃

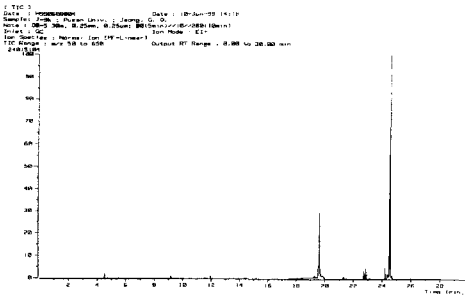


Fig. 2-28.
 Total ion chromatogram of the column A structure of 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) chromatography of active compound from ethyl hexadecanoic acid dichloromethane fr. of buchu kimchi

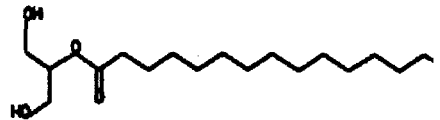


Fig. 2-29.

라. 부추김치의 암예방증진효과 연구

1) Ames 실험계에서 부추김치의 부재료 첨가 조정에 의한 항돌연변이 증진효과 배추김치보다 암예방 활성이 높은 부추김치를 이용하여 배추김치에서와 비슷한 방법으로 암예방 활성을 증진시키기 위한 연구를 하였다. 부재료를 첨가하여 담근 8종류의 부추김치 메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 Table 2-83에 나타내었다. 2.5mg/plate첨가농도에서 표준화된 부추김치는 AFB₁에 대한 돌연변이 유발을 67%억제한 반면 1% sodium alginate와 1% 초피를 첨가한 부추김치는 각각 80%와 79%의 항돌연변이 효과를 보여 sodium alginate와 초피를 첨가한 부추김치가 표준화 부추김치보다 항돌연변이효과가 증진되었다.

2) 부재료 첨가 부추김치의 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제효과 부재료 첨가 부추김치의 C3H/10T1/2 cell에서 MCA에 의한 세포독성저해효과를 살펴본 결과(Table 2-84) 50μg/assay의 농도에서 표준화된 부추김치는 MCA에 의한 세포독

성을 31% 억제한 반면 인삼, 키토산, 알진산염, 첨차, 들깨를 첨가한 부추김치는 39%의 세포독성 억제효과를 보였고 초피를 첨가한 부추김치는 MCA에 의한 세포독성을 45% 억제하여 초피 첨가 부추김치가 표준화 부추김치보다 MCA에 대한 cytotoxicity 억제효과가 큰 것으로 나타났다.

Table 2-83. Effect of the methanol extracts from various kinds of ingredient added buchu kimchi on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment(mg/plate)	Revertants/plate	
	0.625	1.25
Spontaneous	95 ± 9	95 ± 9
AFB ₁ (Control)	1043 ± 34 ^a	1043 ± 34 ^a
Standardized buchu kimchi ¹⁾	475 ± 10 ^b (60) ²⁾	405 ± 14 ^b (67)
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	375 ± 14 ^d (70)	293 ± 11 ^d (79)
1% cinnamon powder added buchu kimchi	405 ± 34 ^{cd} (67)	397 ± 29 ^b (68)
1% ginseng powder added buchu kimchi	448 ± 14 ^{bc} (63)	420 ± 17 ^b (66)
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	399 ± 25 ^d (68)	320 ± 15 ^{cd} (76)
1% sodium alginate added buchu kimchi	367 ± 23 ^d (71)	288 ± 16 ^d (80)
1% sweet tea extract added buchu kimchi	369 ± 13 ^d (71)	316 ± 7 ^{cd} (77)
1% perilla seed powder added buchu kimchi	378 ± 10 ^d (70)	347 ± 10 ^c (73)

¹⁾ The ratios of ingredient in standardized buchu kimchi are 9.0 red pepper powder, 5.0 garlic, 2.0 ginger, 13.0 fermented anchovy juice, 13.0 glutinous rice paste, 2.0 sugar and 2.5 final salt concentration in the proportion of 100 salted buchu.

²⁾ The values in parentheses are the inhibition rate(%)

^{a-d} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2-84. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene(MCA, 10µg/ml) and the methanol extracts from various kinds of ingredient added buchu kimchi

Treatment(50µg/assay)	Cell colony	Cytotoxicity
MCA(Control)	104 ± 5 ^a	1.00
Standardized buchu kimchi ¹⁾	136 ± 1 ^b	1.31
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	151 ± 3 ^d	1.45
1% cinnamon powder added buchu kimchi	141 ± 3 ^{bc}	1.36
1% ginseng powder added buchu kimchi	145 ± 3 ^{cd}	1.39
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	145 ± 1 ^{cd}	1.39
1% sodium alginate added buchu kimchi	145 ± 1 ^{cd}	1.39
1% sweet tea extract added buchu kimchi	145 ± 1 ^{cd}	1.39
1% perilla seed powder added buchu kimchi	144 ± 4 ^{cd}	1.39

¹⁾ See the footnote of Table 2-83

Number of surviving colonies on treated dishes

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

^{a-d} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

이상의 결과를 바탕으로 표준화 부추김치 레시피에 초피와 들깨가루를 첨가하는 것이 가장 암예방효과를 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 초피와 들깨가루를 0.5%씩 첨가한 김치를 제조하여 표준화 부추김치와 비교하여 관능검사를 한 결과 초피의 매운맛 때문에 표준화부추김치보다 종합적인 맛에서 낮은 점수를 얻었다(결과표 생략). 초피의 매운맛을 감소시키기 위해 초피와 들깨가루를 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가한 부추김치를 제조하여 표준화부추김치 및 초피와 들깨가루를 0.5%씩 첨가한 김치와 함께 관능검사를 한 결과 초피와 들깨가루를 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가한 부추김치는 표준화부추김치보다는 종합적인 맛의 점수가 약간 낮았으나 초피의 매운맛은 크게 감소시키는 것으로 나타났다. MTT assay에서 초피와 들깨가루를 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가한 부추김치는 50 μ g/assay의 낮은 농도에서도 78%의 암세포증식억제효과를 나타내어 표준화부추김치(31%)보다 두 배 이상 높은 저해율을 보였다(결과표 생략). 기능성 부추김치는 표준레시피에 초피와 들깨가루를 각각 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가하여 제조하였다.

3) 기능성 부추김치의 소핵유발 억제효과

기능성 부추김치의 *in vivo* 암예방효과를 측정하기 위해 표준화된 배추김치, 표준화된 부추김치와 함께 마우스의 말초혈을 이용한 micronucleus assay를 하였다. MMC 1mg/kg을 복강투여하기 6시간 전에 표준화된 배추김치, 표준화된 부추김치 및 기능성 부추김치를 각각 125mg/kg, 250mg/kg, 500mg/kg씩 경구로 투여하여 소핵유발빈도를 측정하였다(Fig. 2-31). 표준화된 배추김치 투여군은 125mg/kg 투여군에서는 소핵유발 억제효과가 없었으나 부추김치투여군은 유의성 있게 소핵유발 억제효과를 나타내었으며, 기능성부추김치 투여군의 소핵유발빈도가 가장 낮았다($p < 0.05$). 따라서 부추김치에 초피와 들깨 가루를 첨가하고 버섯다시마를 끓인물을 이용하여 찹쌀풀을 만들어 첨가한 기능성 부추김치는 *in vivo*에서도 표준화된 부추김치보다 암예방효과가 증진됨이 확인되었다.

마. 부추김치의 포장 유통실험

1) 포장방법을 달리하여 발효한 부추김치의 이화학적 특성

표준화 레시피로 담근 부추김치를 대조군으로 표준레시피에 초피와 들깨가루를 각각 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가한 기능성 부추김치를 담가 유리병, 플라스틱병, 포장지에 담아 10 $^{\circ}$ C에서 발효하면서 이화학적 변화를 살펴보았다. 기능성 부추김치는 대조부추김치에 비해 발효가 천천히 진행되었고, 유리병>플라스틱병>포장지 순으로 발효가 빨리 진행되었다. 유리병에 담아 발효시킨 대조김치가 발효가 가장 빠르게 진행되어 40일째 pH가 4.10이었으며,

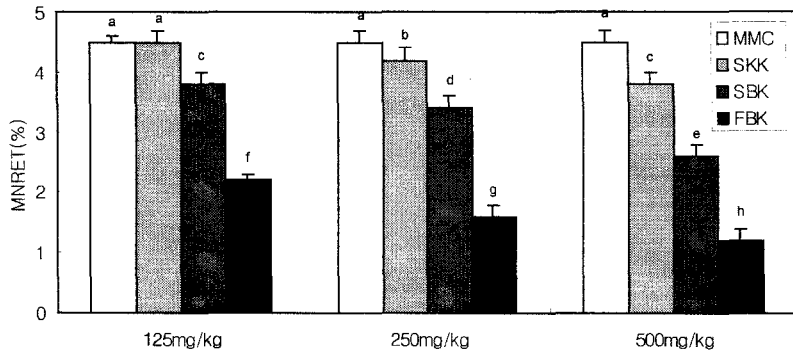


Fig. 2-31. Frequencies of micronucleated reticulocyte(MNRET) in the mice peripheral blood after administration of standardized Korean cabbage kimchi(SKK), standardized buchu kimchi(SBK)and functional buchu kimchi(FBK) followed by mitomycin C(MMC, 1mg/kg) treatment

저장성이 있었다(Fig. 2-32). 산도 역시 기능성 부추김치가 대조부추김치보다 낮았으며 발효 전기간 동안 포장지에서 발효시킨 기능성부추김치의 산도가 가장 낮았다 (Fig. 2-32).

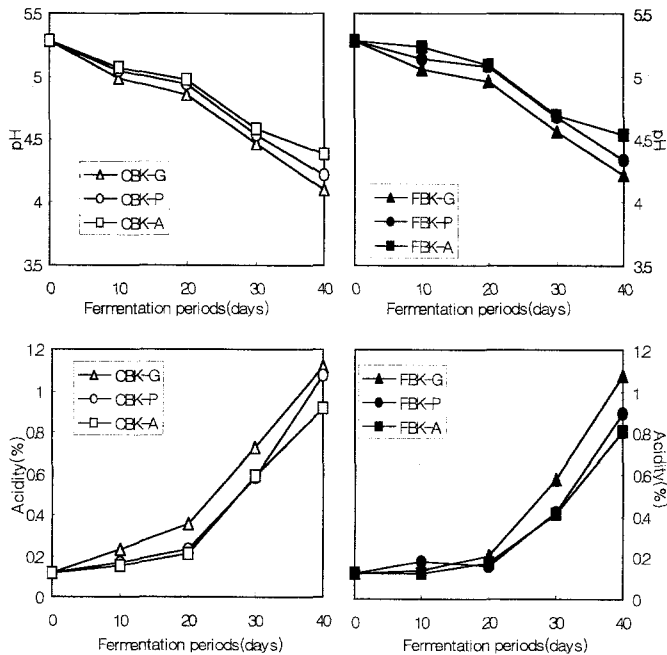


Fig. 2-32. Changes of pH and acidity control buchu kimchi(CBK) and functional buchu kimchi(FBK) fermented in various kinds of vessel at 10°C. (G: glass pint jar, P: plastic pint jar, A: aluminium+Ca(OH)₂)

포장지에 담아 발효시킨 기능성부추김치는 40일째 pH가 4.5이상을 나타내어 가장 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp. 젖산균은 포장지에서 발효시킨 부추김치가 유리병에서 발효시킨 부추김치보다 많았으며, 대조부추김치와 기능성부추김치간에는 차이가 없었다(Fig. 2-33). *Lactobacillus* sp.속 젖산균의 수 역시 포장지에서 발효시킨 부추김치가 유리병에서 발효시킨 부추김치보다 많았다(Fig. 2-33). 포장지에서 발효시킨 부추김치는 갈변이 억제되었으나 국물이 많이 생겨 양념이 씻기는 단점이 있었다.

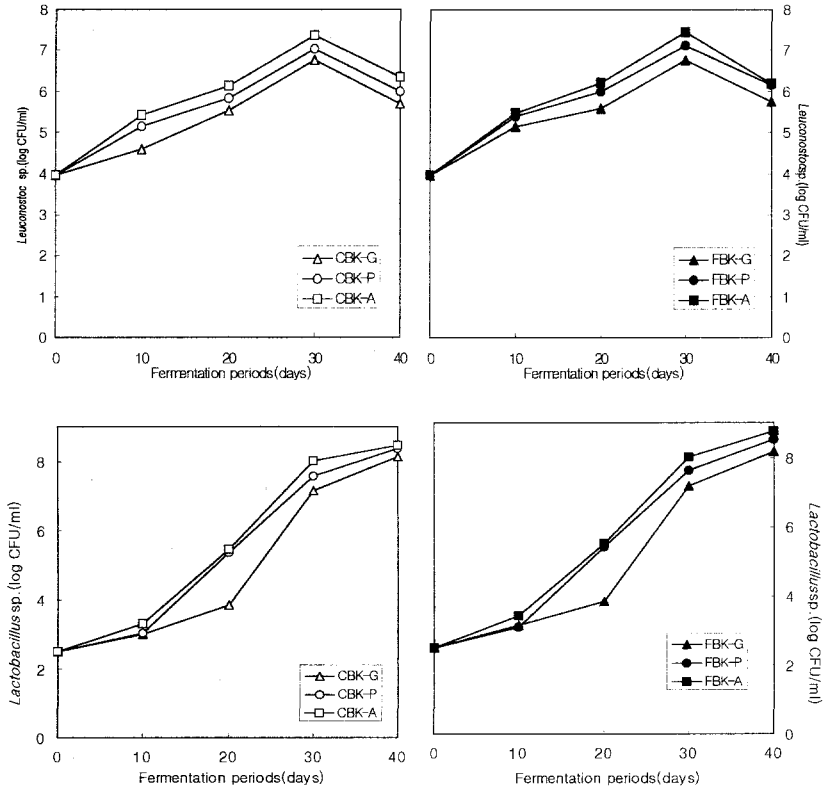


Fig. 2-33. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. counts of control buchu kimchi(CBK) and functional buchu kimchi(FBK) fermented in various kinds of vessel at 10°C.

(G: glass pint jar, P: plastic pint jar, A: aluminium+Ca(OH)₂)

2) 포장방법을 달리하여 발효한 부추김치의 암예방효과

표준화 레시피로 담근 부추김치를 대조군으로 표준레시피에 초피와 들깨가루를 각각 0.5%씩 첨가하고 버섯과 다시마를 우려낸물을 이용하여 찹쌀풀을 끓여 첨가한 기능성 부추김치를 담가 유리병, 플라스틱병, 포장지에 담아 10°C에서 20일간 발효한다음 동결건조 후 메탄올추출물을 제조하여 암예방효과를 측정하였다.

Salmonella typhimurium TA100 균주의 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 살펴본 결과

(Table 2-85) 기능성 부추김치가 표준화부추김치에 비해 항돌연변이 효과가 높았으며 표준화부추김치와 기능성부추김치 모두 플라스틱병에서 발효시킨 부추김치가 AFB₁에 의한 돌연변이 유발을 가장 크게 억제하였다.

AGS 인체 위암세포를 이용하여 MTT와 암세포 증식억제 효과를 검토해 본 결과 (Table 2-86) 기능성 부추김치가 표준화부추김치에 비해 암세포증식억제효과가 높았으며 표준화부추김치와 기능성부추김치 모두 플라스틱병에서 발효시킨 부추김치가 AGS 인체 위암세포의 증식을 가장 크게 억제하였다.

Table 2-85. Effect of the methanol extracts from control buchu kimchi(CBK) and functional buchu kimchi(FBK) fermented in various kinds of vessel on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1.25mg/plate	2.5mg/plate
Spontaneous	83 ± 1	83 ± 1
Control	1054 ± 31 ^a	1054 ± 31 ^a
CBK-G	622 ± 13 ^b (44)	453 ± 9 ^b (62)
CBK-P	545 ± 12 ^c (52)	381 ± 10 ^c (69)
CBK-A	578 ± 8 ^c (49)	414 ± 8 ^c (66)
FBK-G	462 ± 8 ^d (61)	325 ± 9 ^d (75)
FBK-P	389 ± 22 ^e (68)	254 ± 17 ^e (82)
FBK-A	306 ± 7 ^d (64)	306 ± 7 ^d (77)

*Inhibition rate(%)

G: glass pint jar, P: plastic pint jar, A: aluminium+Ca(OH)₂

^{a-e} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 2-86. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from control buchu kimchi(CBK) and functional buchu kimchi(FBK) fermented in various kinds of vessel against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Sample	OD ₅₄₀	
	100µg/assay	200µg/assay
Control	0.558 ± 0.01 ^a	0.558 ± 0.01 ^a
CBK-G	0.182 ± 0.01 ^b (67)	0.154 ± 0.01 ^b (72)
CBK-P	0.126 ± 0.01 ^d (77)	0.062 ± 0.01 ^e (89)
CBK-A	0.171 ± 0.01 ^b (69)	0.137 ± 0.01 ^c (75)
FBK-G	0.146 ± 0.01 ^c (74)	0.095 ± 0.01 ^d (83)
FBK-P	0.060 ± 0.01 ^e (89)	0.023 ± 0.01 ^f (96)
FBK-A	0.113 ± 0.01 ^d (80)	0.062 ± 0.01 ^e (89)

*Inhibition rate(%)

G: glass pint jar, P: plastic pint jar, A: aluminium+Ca(OH)₂

^{a-f} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

제 4절 결론

본 연구를 통해 표준화 김치를 이용하여 암예방 기능적으로 우수한 제품이 여러 개 개발되었으며 이를 위해 김치의 과학적 연구가 시도되었다.

일반적으로 김치는 항돌연변이 효과, 항발암효과 등 암예방 기능이 있었다. 이 기능을 더욱 증진시키기 위해 배추김치를 표준화하여 이를 기초로 기능성 증진 연구를 하였다. 이 연구에서 김치의 재료 중 배추, 소금종류, 고춧가루 농도 다른 양념의 농도등을 조절하였고 발효 방법 중 온도조절 및 용기의 특성등을 비교하여 암예방 기능성 김치 I ~ VI을 개발하였다.

- 암예방 기능성 김치 I은 표준화 배추김치 레시피에서 유기배추, 고춧가루양, 소금종류, 양념종류등을 이용하여 제조되었으며 이 경우 *in vitro*와 *in vivo*에서 암예방효과가 증진된 레시피는 표준화김치레시피에 7% 고춧가루, 2.8% 마늘, 0.1% 초피가루, 5%의 갖을 첨가하였다.
- 발효방법으로는 저온인 5℃에서 저장하고 게르마늄 향아리에서 저장하거나 김치 발효시 게르마늄석이나 맥반석을 넣는 것이 항돌연변이 효과가 컸었다.
- 암예방 기능성 김치 II는 소금(구운소금)에 30%를 KCl로 대체하여 개발한 소금으로 암예방 기능성 김치 I에 KCl대체염을 사용한 김치로 암예방 효과가 10%정도 증가되었다. 이 김치는 colon 26-M3.1 carcinoma 세포를 이용한 종양전이 실험에서 최고 49%까지 억제하는 효과를 나타내었고 소비자 조사 연구에서 시판 김치에 비해 크게 선호도가 떨어지지 않는았다.
- 암예방 기능성 김치 III(기능성김치 II에서 고춧가루를 7%에서 5%로 감소)에서 맛을 고려한 제품을 만들어 암예방 기능성은 다소 떨어지지만(10%) 그 맛은 매우 훌륭하여 일반인에게 제품화했을 때 선호도가 높을 수 있고, 그의 재료비는 다음과 같다. 암예방 김치III에 버섯, 다시마물을 첨가하고 고춧가루 중 반은 시판용 고춧가루, 반은 통고추를 믹서에 간 것을 사용하였다(암예방김치IV).
- 암예방 기능성 김치 V는 기능성 김치 IV에 제 4장에서 개발한 KCl혼합죽염 (NaCl:KCl=5:5)을 사용한 것으로 암예방 효과가 기능성김치IV에 비해 10~20% 증가 되었다.
- 암예방 기능성 김치 VI는 기능성 김치 IV에 녹차잎을 2~4% 첨가한 것으로 암예방 기능이 10~20%로 증가되었고 다이어트 효과도(결과생략) 증진되었다.
- 한편 다른 김치로는 일반 채소류 중 암예방 활성이 높고 별미 김치로 사용되는 부추 김치를 선택하였다. 부추김치는 암예방 효과가 컸으며 기능성 김치 개발을 위해 문헌과 실험을 통해 표준화 작업을 먼저 실시하였다.
- 표준화 부추 김치를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 암예방활성을 검토하고 부재

료 첨가에 의해 암예방 기능성 부추 김치를 개발하였다. 그 레시피는 표준화 부추김치 재료배합비에 들깨와 초피가루 0.5%씩을 첨가하고 초피의 매운맛을 감소시키기 위해 버섯과 다시마를 우려낸 물을 이용하여 찹쌀풀을 만들어 첨가하였으며 표준화 부추김치 보다도 암예방 활성이 2배(표준화 부추김치 31% 에서 기능성 부추김치 78%로 증가) 정도까지 암세포증식억제효과가 높았다. 결국 이 연구를 통해 김치 재료, 발효, 유통 방법등을 이용하여 7가지 암예방 김치가 만들어 졌으며 이들 제품은 벤처 기업((주)효원 메디푸드)에 기술을 이전 중에 있다.

제 5절 참고문헌

1. 윤택구: 암의 원인과 환경. 한국환경성들연변이발암원학회지, 1, 39 (1981)
2. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. : Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379 (1992)
3. 박건영, 이경임, 이숙희: 녹황색 채소류의 들연변이 유발억제 및 AZ-521 위암세포 성장저해효과. 한국영양식량학회지, 21, 149-153(1992)
4. 박건영, 최홍식: 김치와 니트로소아민. 한국영양식량학회지, 21(1), 109-116(1992)
5. 김소희, 박건영, 서명자: *Salmonella* assay system에서 고춧가루에 의한 aflatoxin B₁의 들연변이 유발 저해효과. 한국영양식량학회지, 20, 256 (1991)
6. 김소희: 김치 성분의 보들연변이 유발 및 항들연변이 효과. 부산대학교 대학원 박사학위논문 (1991)
7. Park, K. Y., Baek, K. A., Rhee, S. H. and Cheigh, H. S. : Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotechnology*, 4(3), 141(1995)
8. 김광옥, 이영춘: 식품의 관능검사. 학연사, p.192 (1989)
9. A.O.A.C. : Official methods of analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.60 (1990)
10. 신호선: 식품분석 이론과 실제. 신광출판사, p.91 (1983)
11. 이철우, 고창영, 하덕모: 김치발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리와 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지, 20, 102 (1992)
12. 이명기, 박완수, 강국희: 김치에서 젖산균의 선발 및 계수를 위한 선택배지. 한국식품영양과학회지, 25, 754 (1996)
13. Prosky, L., Asp, N-G., Schweizer, T.F., Devries, J.W. and Furda, I. : Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products; Interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75(5),

1017 (1988)

14. 이승교, 김화자 : 절임조건별 배추에 의한 김치의 숙성 중 riboflavin과 ascorbic acid의 함량 변화. 한국영양식량학회지, 1(1), 27-32(1985)
15. Gross, J. : Pigments in vegetables : Chlorophylls and carotenoids. An AVI Book, New York(1991)
16. Lichtenthaler, H. K. : Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods. Enzymol.* 148, 350(1987)
17. Comar CL, Zcheile PP. *Plant phisiol* 17: 198, 1941
18. Maron, D.M. and Ames, B.N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983)
19. Quillardet, P. and Hofnung, M. : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat. Res.*, 147, 65 (1985)
20. 백창원, 함승시 : SOS chromotest에 의한 사과 효소갈변반응 생성물의 항돌변이 효과. 한국식품과학회지, 22(6), 618 (1990)
21. Wurgler, F.E., Graf, U., Frei, H. and Juon, H. : Genetic activity of the anticancer drug methotrexate In somatic cells of *Drosophilla melanogaster*. *Mutat. Res.*, 122, 321 (1983)
22. Billings, P.C., Uwaifo, A.O. and Heidelberger, C. : Influence of benzoflavone on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity, mutation and transformation of C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.*, 43, 2659 (1983)
23. Kim, H.C., Cha, S.W., Ha, C.S., Han, S.S., Roh, J.K., Lee, Y.S., Furukawa, F., Nishikawa, A. and Takahashi, M. : Ehnancing effects of captafol on the development of GST-P positive liver cell foci in a medium-term bioassay, and protection by L-cysteine of the enhancement in rats. *Cancer Lett.* 111, 15-20 (1997)
24. Kim, H.C., Lee, Y.S. and Nishikawa, A. : Enhancing effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on GST-P positive liver cell foci development in a medium-term rat liver bioassay using D-galacatosamine. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 0, 101-110 (1997)
25. Hayashi M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volder, M., Oleson Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. : *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Res.*, 293-304, 312(1994)
26. Utsugi, T., Shibata, J., Sugimoto, Y., Aoyagi, K., Wierzba, K., Kobunai, T., Terada, T., Oh-hara, T., Tsuruo, T. and Yamada, Y. : Antitumor activity

of a novel podophyllotoxin derivative (TOP-53) against lung cancer and lung metastasis cancer. *Cancer Res.*, 56, 2809-2814(1996)

제 3장 항암김치무리의 개발 분야

제 1절 서설

암예방 효과를 측정할 경우 일반적으로 암발생 단계중 초기단계로부터 시작해서 전이 과정 전단계까지의 발암과정에서의 진행을 억제한다고 할 수 있다(1). 약제나 식품의 항암효과를 연구하는 실험법으로는 암세포 생존 억제능력을 측정하는 *in vitro* 검색방법과 mouse, rat 등의 동물을 이용한 *in vivo* 검색방법으로 나눌 수 있다(2). 또한 항암활성의 기작연구로, cell cycle의 분석을 통하여 cell cycle 지연 및 차단 효과, 종양세포들이 각종 항암제에 의해 사망할 때 나타나는 프로그램된 세포사망기전인 apoptosis 유도효과, 암유전자에 의한 세포내 signal transduction pathway에 관한 연구, 세포의 분화정도의 측정, 혈관신생을 통한 암세포 전이에 관한 연구 등을 들 수 있다(3-12). 대부분의 경우 암예방 활성을 가지면 항암활성도 가질 수 있으므로 본 연구에서는 제 2장에서 개발되었던 암예방 기능성 김치들을 대상으로 항암 활성을 확인하는 작업과 생체내에서 항암활성과 이 경우 간에서 phase II 효소인 glutathione S-transferase(GST) 활성 등 간에서의 해독작용과 생체내의 면역 세포들의 활성 정도를 유도하는지 보았다. 그리고 김치내에서의 항암물질을 동정하고 이들 활성 분획물 및 활성물질의 분자수준에서의 항암기작을 연구하였다.

항암 김치는 일반인들도 섭취할 수 있지만 암환자들을 대상으로 암을 치료할 시 거부감 없이 섭취할 수 있으며 실제 항암효과를 나타내어 암치료에 도움을 줄 수 있는 기능을 갖는 제품으로 이런 기능을 갖는 김치를 개발하려 시도하였다. 즉 암예방 기능성 김치를 개발하고 이들의 항암효과를 확인한 김치를 기초로 해서 암환자들의 기호도, 또는 설문조사를 통해 얻어진 자료를 가지고 항암 기능성김치 제품을 만들려 하였다. 암환자들은 막연히 짜고 매운 것에 대한 반감이 있었기에 고춧가루 농도를 낮추고, 암예방 활성을 갖는 소금(제 4장에서 개발한 제품)과 항암활성이 있는 재료를 이용하고 환자에게 거부감을 주지 않으면서 김치의 맛을 고려하여 만든 항암 기능성 김치를 제조하였다.

부추김치는 배추김치보다도 항암 활성이 컸는데, 암환자들이 별미로 섭취 할 수 있도록 암예방 기능성 부추김치로 개발된 (제 2장) 제품을 이용하여 항암 활성을 확인하고 항암 기작 연구와 함께 부재료 및 발효 방법을 이용하여 항암 부추김치를 제조하였다.

이 실험을 통해 제조된 김치들은 암예방 효과가 확인되고 *in vivo*에서의 항암 활성이 측정되었기에 김치의 부족한 점을 보완하고 가장 건강에 유리한 특히 항암 기능성이 고려된 김치를 개발하여 제품화하려 하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 김치 재료 및 제조 :

제 2장의 재료 및 방법 참조

2. 항암실험

가. 인체 암세포에서의 항암실험

1) 사용 세포주

인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell), 인체 대장암세포(HT-29 human colon cancer cell), 인체 간암세포(H-ep 3B human hepatocellular carcinoma cell) 인체 골육암세포(MG-63 human osteosarcoma cell) 및 NIH3T3 세포는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받았으며 마우스의 정상세포인 Ac2F 간세포 및 sarcoma 180 세포는 본 실험실에서 보관중이다.

2) 암세포 배양

AGS, Hep 3B, HT-29, MG-63 암세포는 100units/ml의 penicillin- streptomycin과 10%의 FCS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75ml cell culture flask에 5ml씩 일정수 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로 부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3) 암세포 증식억제 실험

암세포배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 AGS, Hep 3B, HT-29, MG-63 암세포는 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000cells/ml의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고, 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FCS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이틀에 한번씩 배양액을 교체하면서 37°C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 시료는 2일마다 10 μ l/ml medium씩 농도별로 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(3).

4) DNA 합성 저해 효과

암세포를 24 well plate에 well당 40,000cells/ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 배양액을 제거하고 10% FCS와 시료 추출물이 함유된 새로운 배양액(DMEM)으로 교체한 후 37°C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 48시간 후에 3μCi/ml의 [³H] thymidine이 표시화된 배지로 교체하고 2시간 동안 배양한 후 표시화된 배지를 제거하고 고형성분을 1ml의 PBS로 2번 씻은 다음 1ml의 5% cold TCA를 첨가하여 4°C에서 냉장방치하였다. 1시간후 TCA를 제거하고 250μl의 1% SDS를 첨가하여 세포를 분리하기 위해 55°C에서 1시간동안 가열하였다. Scintillation vial에 옮긴 후 125μl의 H₂O로 2번 씻어내고 3.5ml의 scintillation cocktail을 첨가 한 후 vortexing하여 Beckman LS250 scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다(4).

5) Sulforhodamine B(SRB) assay

암세포를 96 well plate에 well당 40,000 cells/ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100μl를 첨가한 후 37°C 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 이때 blank에는 시료와 10% FCS를 함유한 배지만 넣고 대조군에는 세포와 시료 대신에 DMSO를 첨가하였다. 배양 48시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 한번 씻은 후 50% TCA를 첨가하여 4°C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시킨 후 0.4% sulforhodamine B 100 μl를 첨가해서 30분동안 염색시켰다. 다음 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 150μl를 첨가 후 510nm에서 흡광도를 측정하였다(5).

6) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid(MTT) assay

암세포를 96 well plate에 well당 1×10^3 cells/ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양후 시료추출물을 첨가한 후 37°C 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 4일 후에 MTT 50μl를 첨가하고 4시간 동안 더 배양한 후 plate mixer로 혼합시킨 후에 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료를 농도별로 처리하여 얻어진 평균 세포성장율(%)을 근거로 하여 Lotus data regression program에 따라서 세포성장을 50%저해하는 각 시료의 농도(IC₅₀)을 산출하였다(6).

7) 유선상피세포의 성장과 분화에 관한 실험

가) 유선 절편 조직 배양

7~8주된 정상 F344종 흰쥐를 이산화탄소로 마취시킨 후에 쥐의 서혜부와 복부의 유선을 절취한 다음 수술용 가위로 미세하게 분쇄했다. 이들 분쇄 조직 절편들을 collagenase(Type III, 2mg/ml; Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA)를 함

유한 배지(DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium with 50 μ g/ml gentamicin sulfate and 0.33mg/ml glutamine; Gibco, Grand Island, NY, USA) 180ml에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 진탕하면서 반응시킨 후 유선 조직 등을 분리하기 위해 수회 세척 과정을 거쳤다. 이렇게 하여 얻어진 유선 조직 미세 절편들을 40 μ m 크기의 Nxtex 필터 (Tetko, Briarcliff Manor, NY, USA)로 여과하고 필터에 채집된 조직 절편들을 포획한 뒤 수회에 걸쳐 배지로 세척하고 이들을 현미경하에서 수를 계산했다. 이들 조직 절편들은 유선 상피세포와 도관들로 구성되어 있다. 약 100여개의 미세 조직 절편들을 100 μ l의 배지와 혼합하고 여기에 300 μ l의 Matrigel (Collaborative Research Inc., Bedford, MA, USA)을 섞은 뒤 24well 배양 plate에 넣고 Matrigel이 응고되도록 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 둔 뒤 EGF(10 ng/ml), insulin(5.0 μ g/ml), hydrocortisone(0.5 μ g/ml), human transferrin(10 μ g/ml) 등을 함유한 mammary epithelial growth medium(MEGM, Clonetics, San Diego, CA)로써 serum free medium 1.0ml을 넣고 4주간 배양하였다. 배지는 3일 마다 교환하였다.

나) 다세포구조물의 관찰

2~3일 간격으로 역상 현미경하에서 세포들의 증식을 관찰하고 필요하면 사진 촬영을 하였다.

다) 김치 추출물의 편평상피화생 발생에 미치는 영향 연구

편평상피화생이 발생할 수 있는 조건에서 유선 조직 절편들을 Matrigel에서 배양을 하면서 김치의 MSF를 0.5%, 1.0%, 2.0% 농도로 첨가하였다. 위의 방법으로 유선 미세 조직 절편들을 배양하면서 이들로부터 다세포 구조물 및 편평상피화생의 발생 빈도를 대조군과 MSF 첨가군을 비교하면서 다세포 구조물의 조직학적 변화들을 관찰하였다 (7).

라) 편평상피화생의 조직학적 구조

4주간 배양한 뒤 배양 well에 1.0ml의 methanol/chloroform/acetic acid(6/3/1) 고정액을 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 고정시켰다. 고정된 gel을 일상적인 조직 표본 처리법에 따라 파라핀 블록을 만든 뒤 microtomb을 이용해 5~6 μ m 두께로 자르고 hematoxylin과 eosin으로 염색하고 광학현미경 하에서 관찰하였다.

나. 항암물질 분리 동정

제 2장의 재료 및 방법 참조

다. 분자수준에서의 항암기작 연구

1) Cell cycle analysis와 apoptosis 관련 단백질 측정

MCF 인체 유방암세포는 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI-1640을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. Cyclin D1에 대한

polyclonal antibody와 cyclin B1, A와 cdc 2에 대한 monoclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하고 peroxidase-labeled donkey antirabbit immunoglobulin은 Amersham Life Science(Arlington Heights, IL, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. Western blot을 하기 위해 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 씻은 후 TNN lysis buffer [40mM Tris(pH 8.0), 120mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1mM sodium orthovanadate, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin과 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride]로 0 $^{\circ}$ C에서 20분간 용해하였다.

이 용해물들을 14,000rpm에서 15분간 원심 분리시켜 세포내 잔사물을 제거하였다. 단백질의 농도는 BCA 시약(Pierce, Rockford, IL, USA)으로 측정하고 동량의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel에서 전기 영동시킨 후 electroblotting으로 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 10mM Tris(pH 7.5), 50mM NaCl과 2.5mM EDTA로 씻은 후 blots를 peroxidase conjugated secondary antibody로 배양하면 특이적인 단백질 부분을 chemiluminescence (ECL) detection system으로 눈으로 확인할 수 있다.

60~70%로 채워진 단층의 세포에 cycloheximide(100 μ g/ml)를 처리하여 매 단계마다 세포를 PBS로 씻은 후 TNN lysis buffer로 용해하고 cyclin D1을 Western blot으로 분석하였다(8).

2) Apoptosis(DNA fragmentation assay) 실험

Apoptosis는 위에서와 같은 방법으로 MCF-7 인체유방암세포에서 bcl₂와 Bax protein의 발현을 측정하였다. 한편 DNA fragmentation assay로는 1 \times 10⁶ cell을 seeding하여 2일간 배양하고 lysis buffer를 처리하였다. Ice에서 30분간 shaking하고 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 14000g에서 원심분리하여 상등액을 모은 후, 50 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 proteinase K를 처리하여 incubation시킨다. Phenol extraction방법으로 DNA를 분리하고 5.0M NaCl과 100% Bopropanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하고 14000g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 pellet을 RNase A가 용해된 D.W. 50 μ l로 재현탁하고 1.5% agarose gel에서 1 \times TAE buffer로 3-4시간(50V) 전기영동하였다. Ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator로 관찰한 후 사진을 찍었다(9).

3) Comet assay

1-4 \times 10⁴ 농도로 cell을 PBS에 suspension하고 DDW에 녹인 1% LMPA(low melting point agarose)를 40 $^{\circ}$ C로 유지한 다음 0.25ml cell suspension에 0.75ml LMPA를 섞은 후 0.5ml를 slide에 분주하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C dark room에서 1시간 동안 lysis하였다.

*lysis buffer : 0.03M NaOH, 1M NaCl, 0.1% N-lauroylsarcosinate(Sigma)

Alkaline buffer에 옮겨서 5분간 3회 washing으로 unwinding하였다.

*Alkaline buffer : 0.03M NaOH, 2mM EDTA

21 Volt로 20분간 electrophoresis하고 DDW로 washing 후 $50\mu\text{l}$ EtBr($20\mu\text{g}/\text{ml}$)로 staining한 후 관찰 및 정량(Apoptotic fraction)을 하였다.

*Apoptosis의 경우에는 DNA fragmentation이 nucleosome에 일정하게 발생되는데 반하여 괴사의 경우는 불규칙하다는 특징 때문에 Comet assay시에 Comet의 형태로 apoptosis와 necrosis를 구별할수 있다. Comet assay를 이용한 Apoptosis연구의 parameter로 apoptotic fraction를 정의하는데 전체 Comet에서 apoptotic Comet이 차지하는 비율을 의미하였다(10).

4) Ras에 의한 signal transduction pathway에 미치는 영향

가) 사용시약 및 기기

H-ras^{v12}의 cDNA는 Dr. Feramisco(Univ. of California, San Diego)로부터 분양받았다. 3-bromo-5'-deoxyuridine(BrdU)과 monoclonal anti-BrdU antibody는 Amersham으로부터 구입하였으며, rat immunoglobulin G(IgG)는 Sigma로부터 구입하였고, Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-rat Ig G antibody, tetramethylrhodamine isothiocyanate(TRITC)-conjugated anti-mouse IgG antibody는 Jackson Laboratory로부터 구입하였다.

나) 세포배양

Rat 2 fibroblast normal cell, H-ras^{v12} transformed Rat 2 cell(H06)과 Rat 1 fibroblast overexpressing human insulin receptor(HIRc-B) cell은 Dr. J.M. Olefsky(Univ. of California, San Diego)로부터 분양받았으며, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

다) Rat 2 cell과 H06 cell의 성장에 미치는 영향

김치 추출물이 Rat 2 cell과 H06 cell의 성장에 미치는 영향을 보기 위하여 세포를 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 로 seeding하고 24시간 후 김치시료를 24시간마다 처리하면서 4일 후에 hemocytometer로 생존 세포수를 계수하였다.

라) Oncogenic H-ras^{v12}에 의한 DNA 합성 저해효과

(1) Single cell microinjection

HIRc-B cell을 12mm glass coverslip에 seeding하여(20~30% confluency) 24시간 배양하고 serum-free DMEM으로 24시간 starvation시켰다. 김치시료를 30분간 처리한 후 rat IgG($5\text{mg}/\text{ml}$)와 H-Ras^{v12}($2\text{mg}/\text{ml}$)을 유리된 모세바늘로 microinjection시켰다(11,12).

(2) Immunostaining과 fluorescence microscopy

2시간 뒤 BrdU를 첨가하여 37°C에서 16시간 배양하였다. Acidic alcohol(90% EtOH, 5% acetic acid, 5% dH₂O)로 37°C에서 20분간 고정시키고 0.1% Tween-PBS(TPBS)로 10분간 방치한 후 mouse anti-BrdU antibody, TRITC-conjugated anti-mouse antibody, FITC-conjugated anti-rat IgG antibody로 순차적으로 37°C에서 1시간씩 염색하였다. Coverslip을 PBS와 증류수로 세척하고, 15% gelvatol(polyvinyl alcohol), 33% glycerol, 0.1% sodium azide로 mounting하여 형광현미경하에 injected된 세포와 핵을 계수하여 DNA 합성효과를 살펴보았다.

라. *In vivo* 항암실험

1) 마우스를 이용한 항암효과 실험

가) 실험동물

항암 실험을 위해 웅성 Balb/c mouse로 체중이 25g정도의 것을 사용하며, 사료는 표준사료로 사육하였다. 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하고, 동물실은 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였다.

나) 종양세포

실험동물의 복강내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline(PBS)와 함께 원심분리(1,200rpm, 10min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 sarcoma-180 세포를 1.0×10^6 cells/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1ml씩을 복강주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

다) 시료의 조제

시료는 멸균된 PBS를 사용하여 조제하며 투여량은 마우스당 0.5mg으로 하고 대조군은 멸균 PBS만 주사하며 투여하지 않을 때는 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

라) 세포독성 실험(Viability test)

김치시료의 직접적인 세포 독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 행하였다.

24 well plate에 20% HFCS(heat inactivated fetal calf serum: Gibco Lab., USA)을 함유한 EMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지 1ml에 5×10^4 cell/plate가 되게 seeding하였다. 여기에 20 μ l의 김치 시료를 넣어서 37°C, 5%CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포 50 μ l를 0.2% trypan blue 용액 50 μ l와 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.

Total number of viable cells per ml of aliquot

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

마) 수명 연장 실험

실험동물을 각 군당 7마리씩으로 하여 전술한 방법으로 조제한 종양 세포 부유액 1ml(1×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 복강내에 이식한 뒤 24시간 후 부터 20일간 매일 시료를 복강으로 시료를 투여하고 35일까지의 생존여부를 관찰하여 수명 일수를 계산하였다(13,14).

바) 고형암 성장 저지 실험

실험동물을 각 군당 10 마리씩으로 하여 실험실에서 계대 보관 중인 종양세포 부유액 0.2ml(6×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식한 후 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료 용액을 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 32일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정하였다(13,14).

2) 시료를 투여한 마우스 비장의 *in vivo* NK세포 활성 증강효과

가) 마우스 비장 림프구의 분리

Balb/c 마우스의 비장을 clean bench 내에서 무균적으로 적출하여 penicillin(100 U/ml), streptomycin($100 \mu\text{g/ml}$)를 함유한 5ml의 RPMI 1640 배지로 3회 세척한 후 곱게 마쇄하였다. 이 세포부유액을 $70 \mu\text{m}$ nylon mesh로 여과하고 원심분리하여 림프구를 모은 다음 배지에 부유시킨 후 histopaque-1077을 이용하여 원심분리($500 \times g$, 30 min, 18°C)하여 림프구를 분리하였다.

나) Effector cell의 준비

위의 방법으로 준비된 세포를 10% FCS, 2mM L-glutamine, penicillin(100 U/ml), streptomycin($100 \mu\text{g/ml}$)를 함유한 RPMI 1640 배지에 재현탁시키고, 이것을 37°C , CO_2 incubator에서 1~2시간 배양시켜서 세포가 배양 플라스크(60mm dish)에 부착되도록 하였다. 비부착성 natural killer(NK) cell을 원심분리를 통해서 수집하여 배양배지에 재현탁시킨 다음 적정 세포수를 계수하여 사용하였다.

다) Natural killer(NK) cell의 활성 측정

NK cell은 활성 측정은 앞서 언급되었던 MTT 방법을 이용하였다. Yac-1 mouse lymphoma cell을 target cell로 사용하였는데, Yac-1 세포는 10% FCS, 2mM L-glutamin, penicillin(100 U/ml), streptomycin($100 \mu\text{g/ml}$)를 함유한 RPMI 1640 배지에 5×10^4 cells/ml의 밀도가 되도록 희석한 후, 각 well에 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. NK cell은 1×10^7 cells/ml의 밀도로 현탁시켜 $50 \mu\text{l}$ 씩을 96well flate-bottomed microtitre plate에 첨가하였다. 이것을 37°C , CO_2 incubator 안에서 3일간 배양시킨 후 MTT(5mg/ml)용액을 $10 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 가한 다음 37°C 에서 4시간 배양하였다. 여기

에 SDS(10% in 0.02N HCl)을 25 μ l 첨가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후에 540nm에서 OD를 측정하였다(15). Cell cytolysis percentage는 아래 공식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Cell cytolysis(\%)} = \frac{\text{OD of non-lysed target cells} - \text{OD of effector cell}}{\text{OD of target cell alone}} \times 100$$

3) 효소 활성 측정

가) 효소원의 조제

Mouse를 치사시킨 후 4 $^{\circ}$ C 이하의 생리 식염수로 간을 관류하여 간내에 남아있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 간조직 1g 당 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄세포부분을 제거하고 다시 105,000 \times g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol분획으로 하여 glutathione S-transferase(GST) 활성 측정에 이용하였다(16).

나) Lipid peroxide의 함량 측정

Ohkawa 등의 방법(17)에 준하여 측정하였다. 10% 간 균질액 0.4ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 1.5ml와 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid 1.5ml를 가한 후 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 실온에서 n-butanol : pyridine(15 : 1) 5.0ml와 H₂O 1ml를 첨가하여 잘 섞은 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 분홍색의 n-butanol : pyridine층을 취하여 파장 532nm에서 그 흡광도를 측정한 다음 표준곡선에 준하여 그 함량을 조직 1g당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

다) Xanthine oxidase의 측정

Stripe과 Pella의 방법(18)에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 기질인 xanthine sodium과 효소원 및 전자수용체인 NAD를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid를 가하여 제단백시켜 상정액을 취한 후 생성된 uric acid의 흡광도를 파장 292nm에서 읽은 값을 xanthine oxidase의 활성도로 계산하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다.

라) 조직중의 glutathione의 함량 측정

Ellman의 방법(19)에 준하여 homogenate한 간조직 0.5ml에 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) 2.7ml를 가하여 20분 방치한 후 생성되는 청색을 412nm에서 측정하고 표준 곡선에 의하여 산정하였으며, 단위는 조직 1g당 glutathione μmole 로 표시하였다.

마) Glutathione S-transferase의 활성 측정

Habig 등의 방법(20)에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5)중에 0.04M reduced glutathione 0.075ml를 가한 후 효소액을 0.1ml 넣고 blank에는 20% trichloroacetic acid 0.5ml를 가해 600×g에서 원심분리하여 단백질을 제거하고 시료는 25℃에서 5분간 반응시킨 후 blank와 시료 각각에 기질로써 0.12M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 0.025ml 가하여 25℃에서 2분간 반응시킨 다음 시료에 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 완결시킨 후 blank와 시료 각각을 원심분리하여 얻은 상등액을 340nm에서 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 1mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole수로 표시하였다.

사) Protein 정량

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(21)에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

4) 간의 조직학적 변화 및 종양과 관련된 단백질에 대한 면역조직 화학적 관찰

간을 절취하여 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS)에 4℃, 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 μm 연속절편을 제작하였다(22). 간의 조직학적 변화와 glycogen 분포관찰을 위해 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin (H-E)염색과 periodic acid Schiff (PAS)반응을 실시하였다. 각 종양과 관련된 단백질에 대한 면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀하여 10mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95℃, 5분간 처리하였고 다시 실온에서 동일 buffer에 20분 두었다. 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하고 PBS (0.01M, pH 7.5)로 5분간 3회 세척한 후 비특이성 반응을 없애기 위하여 goat normal serum (Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였다. 이를 제거하고 Santa Cruz Biotechnology Inc 제품의 Bax (sc-493), Bcl-2 (sc-783), Rb (sc-050), c-fos (sc-253), c-jun (sc-1694)을 500:1로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit Ig G (Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척하고 ABC kit (avidin-biotin-peroxidase complex, Vector Lab., PK-6101)에 실온에서 60분간 반응 시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 DAB substrate kit (Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켰다. 증류수로 세척하여 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경하에서 반응정도를 판정하였다(23).

마. 면역효과 증강실험

1) Phagocytic activity 측정실험

가) *In vivo* test

PBS에 적당한 농도로 녹인 시료를 0.5ml 씩 마우스 복강내로 주사하였다. 24시간 후 마우스 복강액을 수거하여 실험에 사용하였는데 추가 주사군들은 첫 주사 24시간 후에 일차 주사때와 같은 양을 주사한후 24시간 후에 복강액을 수거하였다. 수거된 각군의 복강액들을 200×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하였다. Phagocytic 활성 측정을 위해 분리된 세포를 10% FCS RPMI 1640배지에 부유시켜 2×10^5 세포/ml이 되게 조정하였다. 이 세포 부유액을 미리 coverglass를 내재시킨 24well plate에 1ml 씩 이 되게 분주하고 37°C, 5%CO₂ 조건에서 45분 동안 배양하였다. 각 well들을 PBS로 가볍게 씻어냄으로서 비부착성 세포들을 제거하였다. 부착성의 식세포가 존재하는 coverglass상에 2×10^6 세포/ml의 *C. albicans*(ATCC10231), 0.2ml을 작용시켰다. 이때의 배지는 RPMI 1640에 autologous serum을 10% 농도가 되게 포함시켜 사용하였다. 또 다시 plate를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 45분 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 coverglass를 PBS로 가볍게 씻어낸 다음 wright strain액에 10분간 작용시키고 판독은 1000×의 현미경하에서 식세포 50개 가운데 식균된 *C. albicans*의 수를 산정하였다(24).

2) Natural killer (NK) 세포 활성측정

비장세포를 10% FCS RPMI 1640배지에서 부유시킨 다음 75cm²의 조직배양병에 넣어 37°C, CO₂ incubator에서 1시간 배양한 다음 가볍게 흔들어 부착되지 않는 세포만을 수거하여 4×10^6 세포/ml로 만들어 작동세포로 사용하였다.

표적세포로 사용한 Yac-1세포(2×10^5 세포/0.1ml)에 10μCi의 Na²⁵¹CrO₄(Du pont Co., USA)를 가하여 가볍게 섞어준 후 37°C, CO₂ incubator에서 1시간 labelling하였다. 표지된 세포를 10% FCS RPMI 1640배지로 3회 원심세척한 후 1×10^5 세포/ml FCS RPMI 1640배지에 부유시켰다.

⁵¹Cr이 표지된 Yac-1세포를 96 well plate에 well당 1×10^4 세포/0.1ml되게 분주하고 작동세포와 표적세포의 비율이 40:1이 되도록 작동세포를 4×10^5 세포/0.1ml 되게 추가 분주하여 37°C, CO₂ incubator에서 16시간 작용시켰다. 이때 최대 방출량(maximum release)를 측정하기 위해 1N HCl 0.1ml씩 가하였고 자연 방출량(spontaneous release)을 측정하기 위해서는 배지 0.1ml를 가하였다. 작용 16시간 후 각 well의 상층액 0.1ml 씩을 수거하여 gamma counter(Packard Cobra Co., USA)로 유출되는 방사능을 측정하며 NK세포의 활성은 다음과 같이 산출하였다(24).

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{cpm in experiment} - \text{cpm spontaneous release}}{\text{cpm maximum release} - \text{cpm spontaneous release}} \times 100$$

3) Interleukin-2 assay

10% FCS를 함유하고 있는 RPMI 1640 배지에서 CTLL cell(5,000 cells / 50 μ l)를 mouse splenocyte와 함께 3일 배양시켰다. 3일 후 세포 밀도가 2 \times 10⁵ cells/ml되면 2 \times 10⁴ cells/ml로 분리하고 interleukin-2(IL-2)로 refeeding 시켰다. RPMI 1640으로 CTLL cell을 두번 씻은 후 10분동안 250g에서 원심 분리시킨 후 trypan blue dye로 염색시켜 최종 농도가 1 \times 10⁵ cells/ml이 되게 하였다. 96 well에 시료를 첨가하고 세포 부유액을 50 μ l 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양시킨 다음 MTT assay로 IL-2를 측정하였다(25).

3. 상품화 및 산업화연구

가. 포장유통연구

항암김치를 실험공장 단위로 제조하여 알루미늄포장지와 플라스틱병에 소포장하여 10 $^{\circ}$ C에서 저장하면서 유통 중 이화학적 특성 및 기능성의 변화를 검토하였다.

나. 소비자 기호도 조사

항암김치를 개발하기 위해 김치의 재료 및 타입에 대해 암환자의 선호도를 조사하였으며, 항암김치 시제품에 대한 소비자 기호도 조사를 하기 위하여 항암 기능성김치 시제품을 제조하여 시판 김치와 비교하여 암환자를 대상으로 선호도 및 의견 설문지 조사를 하였다.

다. 상품화 및 산업화

실험공장 및 김치공장과 연계하여 원재료 수급, 절임 공정, 양념제조, 포장 및 유통연구를 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

일반적으로 암예방효과가 있을 경우에는 항암효과도 있는데 이 연구에서는 제 2장에서 암예방효과를 항암실험으로 확인하고, 김치에서 항암물질의 동정과 항암 기작 등을 연구하고 암예방 기능성 김치의 항암활성을 확인하였다. 그리고 암 환자를 위한 항암김치를 제조하였다.

1. 배추김치의 항암효과 측정

제 2장에서와 같이 일반배추김치의 항암활성을 암세포와 *in vivo*에서의 항암활성을 중심으로 측정하였다.

가. 인체 암세포에서의 *in vitro*항암효과

김치추출물들(제 2장 참조)의 인체 암세포에서의 항암효과를 검토하였다. 항돌연변이 효과에서와 비슷한 경향으로 3주 발효김치가 활성이 가장 컸었다. 추출물 첨가 농도에 따라 정상세포(Ac2F rat normal liver cell)에서의 cytotoxicity를 측정해 본 결과 본 실험의 사용농도에서는 독성이 관찰되지 않았다. 그러나 여러가지 인체 암세포(leukemia K-562 cell, MG 63 osteosarcoma cell, AGS gastric cancer cell 등)에서는 암세포 성장 억제효과가 관찰되었다(결과생략). 그리고 이 경우 암세포 내의 DNA합성 정도도 크게 억제되었다(Table 3-1). 하지만 정상세포(Ac2F)의 성장에는 김치가 크게 영향을 끼치지 않았다(Table 3-2).

Table 3-1. [³H] Thymidine incorporation at different concentration of methanol extract, hexane extract and methanol soluble fraction(MSF) from 3 weeks fermented kimchi in AGS human gastric cancer cells.

Concentration	[³ H] Thymidine incorporation /well × 10 ³ cpm	Inhibition rate(%)
Control	13.5 ± 0.6	
Methanol ext.		
0.5%	12.2 ± 0.4	10
1.0%	7.4 ± 0.4	46
2.0%	6.5 ± 0.6	52
Hexane ext.		
0.5%	5.7 ± 0.5	58
1.0%	4.5 ± 0.2	66
MSF		
0.5%	12.4 ± 0.3	8
1.0%	9.2 ± 0.6	32
2.0%	8.3 ± 0.3	38

Table 3-2. Growth inhibitory effect of various concentration of methanol extract, hexane extract and methanol soluble fraction(MSF) from 3 weeks fermented kimchi in Ac2F normal liver cell after 6 days of incubation at 37°C.

Concentration(%)	Number cells($\times 10^4$ /ml)
Control	35.8 \pm 4.9
Methanol ext.	
0.5%	36.7 \pm 4.7
1.0%	35.5 \pm 1.7
2.0%	30.8 \pm 2.3
Hexane ext.	
0.5%	33.2 \pm 2.0
1.0%	35.3 \pm 3.0
2.0%	37.3 \pm 2.9
MSF	
0.5%	32.2 \pm 2.5
1.0%	36.2 \pm 1.9
2.0%	36.8 \pm 3.6

나. 유선상피세포의 성장과 분화에 있어 김치추출물의 영향

유선의 미세 조직 절편을 Matrigel과 혼합한 후 24 well culture plate에서 serum free medium에서 4주간 배양한 결과 duct, web, stellate, squamous, lobuloductal colony들이 생성되었고 이들을 조직학적으로 염색하고 현미경하에서 관찰한 결과 ductal 및 lobuloductal colony들을 구성하는 세포들은 casein 단백질 및 lipid 등을 분비하며 stellate와 web colony를 구성하는 세포들은 대부분 foamy cytoplasm을 가지는 단일 세포군들로 이루어졌으며 squamous colony들은 중심부에 keratin pearl과 여러 층의 keratin layer을 가지는 squamous metaplasia였음을 관찰할 수 있었다. Squamous metaplasia(편평상피화생) 조직은 만성 자극을 받은 침샘, 전립선, 기관지, 후각 조직 등에서 발견되는 것으로 알려져 왔고 상습 흡연자들의 기관지나 비타민 A가 부족하거나 여러 가지 화학 및 물리적 자극을 받게 되면 발생하는 비정상적 조직이다. 특히 여러 종류의 암 발생 초기 단계에 나타난다고 알려져 있다.

100개의 organoids를 분주한 각 well에 생성된 다세포 구조물의 수는 대조군이 82.0으로 김치 추출물의 농도가 0.5%, 1%, 2%로 증가 될수록 각각 77.3, 72.7, 68.3으로 다소 감소하는 추세를 보였다(결과 생략). 위의 전체적인 다세포 구조물을 각각의 형태에 따른 다세포 구조물의 발생 빈도에 대한 김치 MSF추출물의 영향을 살펴본 결과 duct 구조물은 농도 증가에 따라 다소 감소하는 경향이 있으나 통계학적 유의성이 없었다. 그리고 stellate 구조물은 농도의 증가에 따른 영향을 볼 수 없었으며 web와 lobuloduct 구조물은 농도가 증가될수록 증가하는 것을 보여 주었다. 특히 squamous metaplasia는 김치 추출물의 농도가 증가할수록 크게 감소하는 경향을 보였

다. 그러나 실험에 사용한 농도에서 완전히 억제하지는 못하였다.

이상의 결과로써 Matrigel은 생체에서만 관찰할 수 있는 삼차원적 조직의 생성뿐 아니라 이들 구성 세포들의 성장과 분화 연구 및 이것에 관여하는 반응의 기전을 이해하는데 주요한 재료로써 이용될 가능성이 높음을 보여 주고 있으며 이에 김치 추출물중 MSF추출물이 정상적인 유선 상피세포들의 성장과 분화 및 squamous metaplasia의 발생에 어떤 영향을 미치는 지를 확인할 수 있었다.

다. *In vivo*에서 김치추출물의 항암효과

1) 배추김치의 *in vivo* 항암효과

가) 세포 독성 실험(Viability test)

In vivo test에서 sarcoma-180을 투여한 마우스에 시료를 투여하기 위해 *in vitro*에서 시료가 종양세포(sarcoma-180)에 대해 직접적인 독성을 주지 않으면서 시료의 효과를 볼 수 있는 농도를 알아보기 위해 sarcoma-180 세포가 seeding된 well에 여러 농도로 시료를 첨가한 후 24시간 뒤에 종양세포의 생존율과 총세포수를 관찰하였다.

Viability test를 한 결과 김치의 메탄올추출물은 0.1mg/ml, 헥산추출물과 MSF추출물 그리고 주스는 0.5mg/ml의 농도로 결정하고 이를 마우스에 투여하여 수명연장효과와 고형암성장저지효과를 살펴보았다.

나) 수명 연장 효과

마우스에 종양세포를 이식하고 24시간 후부터 김치추출물과 주스시료를 투여하여 35일까지의 생존여부를 조사한 결과 Table 3-3과 같이 대조군이 27.8일인데 메탄올추출물이 30.7일, 헥산추출물이 24.0일, 주스투여군이 30.8일, MSF추출물은 26.2일로 group간에 차이를 나타내지 않았으나 메탄올추출물과 주스의 경우 다소 수명연장을 볼 수 있었다.

Table 3-3. Effect on life span of Balb/c mice with sarcoma-180 cells and antitumor activities in it of methanol extract, hexane extract, methanol soluble fraction(MSF) and juice from 3 weeks fermented kimchi at 5°C

Treatment	Survival time(day) ¹	Tumor weight(g) ²
Sacoma-180 + Control	27.8 ± 4.8	4.32 ± 1.5
Sacoma-180 + Methanol ext.	30.7 ± 3.4	3.40 ± 0.8
Sacoma-180 + Hexane ext.	24.0 ± 4.2	3.57 ± 2.0
Sacoma-180 + MSF	26.2 ± 4.5	1.98 ± 1.8
Sacoma-180 + Juice	30.8 ± 4.0	2.80 ± 2.3

¹Balb/c mice were injected I.P with methanol extract(0.5mg/kg), hexane extract(2.5mg/kg), MSF (2.5mg/kg), juice(2.5mg/kg) once a day for 20 days.

²7-days sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain 0.5mg/kg of methanol extract, 2.5mg/kg of hexane extract, MSF, and juice from kimchi or the equal volume of phosphate buffered saline(control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following transplantation. All mice were sacrificed at 5 weeks following the transplantation, and tumor weight were measured.

다) 고형암 성장 저지 효과

마우스에서 종양세포를 이식시킨 후 20일동안 시료를 투여하고 32일 되는날 해부하여 종양을 분리해 내어 무게를 측정하였다. 그 결과 대조군이 4.32g을 나타내었고, 메탄올추출물을 투여한 것과 헥산추출물을 투여한 것이 3.40g, 3.57g으로 대조군과 유사하고 주스시료를 투여한 것이 2.80g으로 다소 종양이 작아졌으며, MSF추출물을 투여한 것은 1.98g으로 54%의 큰 종양생성 저해효과를 볼 수 있었다(Table 3-3).

라) 비장의 중량변화

비장은 면역관련 기관중의 하나로 면역계의 활성 증가를 단편적으로 볼 수 있는 비장의 중량을 고려해 볼 때 김치추출물과 주스시료의 투여로 인한 체중에 대한 비장의 무게 변화는 대조군과 비교할 때 대체적으로 거의 비슷한 수치를 나타내었고 MSF추출물 5mg/kg과 10mg/kg 투여시 약간의 증가를 보였다. 종양세포를 이식한 경우에는 대조군이 0.66%, 메탄올추출물이 0.65%, 헥산추출물이 0.60%, 주스가 0.67%, MSF추출물 5mg/kg투여시 0.57%로 차이가 작았으며 MSF추출물 2.5 mg/kg, 10mg/kg투여시 0.73%, 0.70%으로 약간의 증가를 보였으나 그 차이가 미미하여 유의성을 볼 수 없었다(결과표생략).

마) 각 장기의 중량변화

마우스에 있어 장기들의 김치추출물과 주스의 영향을 살펴볼때 먼저 여러 이물질의 대사작용을 담당하는 간의 체중당 무게는 대조군과 종양세포를 이식한 대조군이 각각 6.03%, 5.89%로 차이가 없었으며 MSF추출물 2.5mg/kg 투여한 것이 5.46%, 주스투여한 것이 6.87%로 다소 차이를 보였다. 종양세포를 이식한 것에 메탄올추출물을 처리했을 때 대조군 5.89%에 비해 6.40%으로 다소 차이를 나타내나 유의성이 없었다($p < 0.05$).

심장의 경우 대조군이 0.54%, 메탄올추출물이 0.50%, 헥산추출물이 0.56%, 주스가 0.53%, MSF추출물 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg 투여시 각각 0.51%, 0.46%, 0.56%로 차이를 볼 수 없었다. 그리고 종양세포이식군에서는 대조군이 0.50%을, 메탄올추출물을 투여한 것은 0.57%를, 헥산추출물을 투여한 것은 0.53%, 주스를 투여한 것은 0.59%, MSF추출물은 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 각각 0.60%, 0.59%, 0.57%로 유사하게 나타났다.

신장의 체중당 무게는 간과 심장과 마찬가지로 대조군과 종양세포투여한 대조군은 1.57%, 1.56%으로 차이를 볼 수 없었고, 시료를 투여한 군에 있어서는 헥산추출물의 경우 1.70%로 다소 차이를 보였으나 유의성이 없었으며 다른 시료의 투여군의 경우는 대조군과 유사한 경향을 보였다(결과표생략).

2) 김치추출물과 주스를 투여한 마우스의 간내의 효소활성 변화

가) Lipid peroxide의 함량에 미치는 영향

Lipid peroxide는 과산화된 지질로 특히 세포막의 주요성분인 인지질을 구성하는

불포화 지방산이 활성산소와 결합하여 생기게 되는데 이는 주로 mitochondria, microsome, erythrocyte, platelet에서 발생하고 그 결과 각종 효소작용의 억제, 세포괴사, 미세혈관 병변 등을 일으키는 것으로 알려져 있다.

Lipid peroxide 함량을 측정한 결과 Fig. 3-1과 같이 대조군은 16.91인데 시료를 단독으로 처리한 경우 메탄올추출물은 16.81, 헥산추출물은 18.24, 주스는 16.60, MSF추출물은 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 17.22, 17.67, 18.85로 전체적으로 유사한 경향을 나타내었다. 한편 종양세포를 이식시킨 경우에는 활성이 증가하여 malnondialdehyde가 25.67을 나타내었는데 종양세포를 가진 마우스에 김치 메탄올추출물을 처리했을 때 27.18로 대조군과 비슷하였고 헥산추출물과 주스를 처리했을 때 23.76, 24.49로 약간 낮아졌으며 MSF추출물 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 20.25, 18.74, 16.95을 나타내어 김치추출물의 경우 MSF추출물에서 lipid peroxide의 함량을 낮추어 대조군수준으로 회복시켰으나 통계적인 유의성은 없었다.

나) Xanthine oxidase의 활성 측정

노화, 암조직의 발생과 같은 질병에 있어 생성되는 free radical들은 체내에서 여러가지 독작용을 유발하며 xenobiotic들이 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 막에 손상을 주어 투과성을 변화시켜 독성을 일으키게 된다. 이러한 free radical생성계는 일반적으로 microsomal system의 cytochrome-p-450 monooxygenase와 non-microsomal system인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase로 알려져 있다. Xanthine oxidase의 경우는 체내에서 D-type의 xanthine dehydrogenase로 존재하다가 이것이 병적 상태로 진행되거나 생리적 조건의 변화에 의해 O-type의 xanthine oxidase로 전환되어 superoxide anion, hydrogen peroxidase 등의 free radical을 형성하게 되고 이들은 cellular deterioration의 일차적인 원인으로 제시되어지고 있다.

Xanthine oxidase의 활성은 uric acid로 나타내는데 이도 lipid peroxide와 마찬가지로의 경향을 나타내어 대조군에 있어 0.70에 대해 단독 시료처리군에서는 메탄올추출물이 0.76, 헥산추출물이 0.79 주스가 0.79, MSF추출물이 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 각각 0.71, 0.73, 0.78로 측정되었으며, 종양세포 이식한 군에서는 대조군이 0.95로 약간 증가했으며 메탄올추출물이 0.94, 헥산추출물이 0.89, 주스가 0.91로 종양세포처리된 대조군과 차이가 없었지만 MSF추출물이 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 0.79, 0.71, 0.67로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3-2).

다) Glutathione content 변화에 미치는 영향

Glutathione은 세포의 주요 protective system으로 sulfhydryl radical을 가지고 있으며 활성산소, 지질과산화물질 및 친전자성 물질의 대사에 있어 무독화 과정에 이용되어지고 있으며 lipid peroxidation의 환원에 관여하는데 이는 glutathione이 여러가지 활성 증가물질과 conjugation을 이루어 glutathione S-transferase와 같은

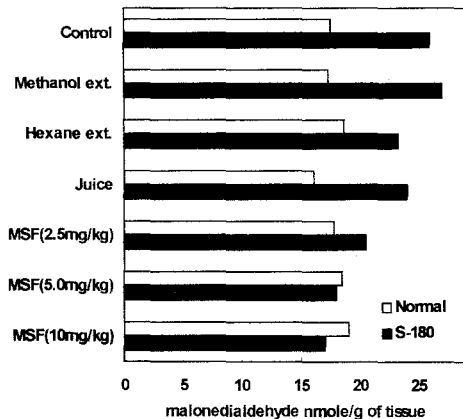


Fig. 3-1. The effect of 3 week fermented kimchi extracts and juice on hepatic lipid peroxide content in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.

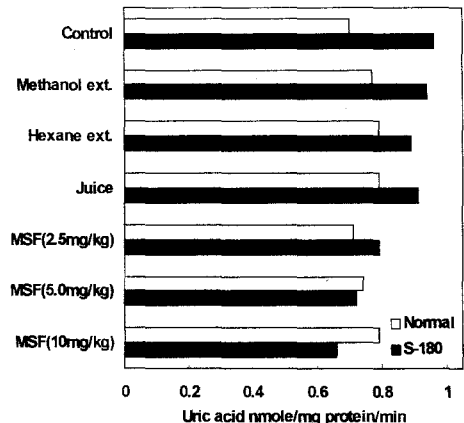


Fig. 3-2. The effect of 3 week fermented kimchi extracts and juice on hepatic cytosolic xanthine oxidase activity in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.

효소의 작용으로 urine으로 배설하도록 함으로써 체내의 독성물질을 제거시키게 된다.

김치추출물의 투여로 인한 glutathione 함량을 측정해 볼 때 Fig. 3-3과 같이 대조군이 5.2을 함유하고 있고 메탄올추출물은 5.2, 헥산추출물은 5.0, 주스는 5.1, MSF추출물 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg는 5.2, 5.3, 5.1로 거의 차이가 없었으나 종양 세포 이식군의 대조군은 3.8로 glutathione 함유량이 감소함을 볼 수 있고 종양세포 이식군에 시료를 처리한 경우에는 메탄올추출물이 4.1, 헥산추출물이 4.0으로 미미한 증가를 볼 수 있고 주스에서는 3.4로 약간 감소하였다. 그리고 MSF추출물에 있어 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 4.5, 4.5, 5.0로 농도에 의존적이지는 않으나 약간의 증가를 보였다. 과산화 지질의 무독화 과정에 필요한 glutathione함량은 종양세포로 인해 저하되고 시료투여군, 특히 MSF추출물에 의해 회복되어짐을 볼 수 있었다.

라) Glutathione S-transferase활성에 미치는 영향

간에서 일어나는 대사효소계의 phase II단계는 내인성 물질이나 외부에서 투여되어진 독성물질을 포함하거나 수용성 물질로 전환시켜 체외로 배출시킴으로써 이물질을 제거하는 작용하는데 glutathione-S-transferase는 reduced glutathione을 이용하여 체내 독성물질과 과산화물질의 전이, 배설에 관여하는 효소이다.

Glutathione S-transferase의 활성은 대조군이 155.0이고 시료처리군은 메탄올추출물이 162.5, 헥산추출물이 145.0, 주스가 152.5이며 MSF추출물이 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 157.5, 162.5, 150.0의 비슷한 활성을 나타내나 종양세포 이식

한 대조군은 102.5로 떨어지고 이에 메탄올추출물 투여시 97.5, 주스 투여시 90.0으로 활성이 조금 더 떨어졌으며 핵산추출물은 102.5을 나타내어 비슷한 정도를 나타내었고 MSF추출물 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg에서 112.5, 125.0, 140.0의 증가를 보였으나 유의성은 없었다. MSF추출물에서 glutathione S-transferase활성 증가는 체내의 독성물질의 배출을 증가시키는 것으로 볼 수 있다(Fig. 3-4).

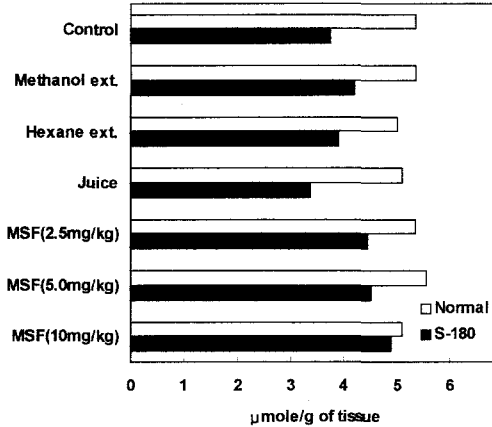


Fig. 3-3. The effect of 3 week fermented kimchi extracts and juice on hepatic cytosolic glutathione content in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.

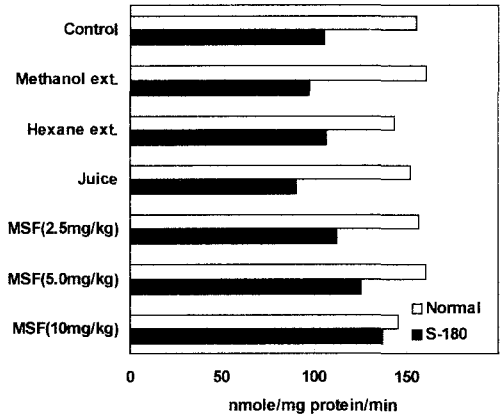


Fig. 3-4. The effect of 3 week fermented kimchi extracts and juice on hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity in normal and sarcoma-180 treated Balb/c mice.

위의 결과들을 볼때 종양세포를 이식한 경우에 lipid peroxide함량이 증가하고 xanthine oxidase에서 free radical 생성이 증가하였으며, 체내 주요 보호 시스템인 glutathione의 함량이 저하되고 glutathione S-transferase의 활성이 저하되었음을 알 수 있었다. 이에 MSF추출물의 투여시 lipid peroxide함량 감소, free radical의 감소, glutathione함량의 회복, glutathione S-transferase의 활성 증가를 볼 수 있었다.

라. 면역 활성 증강 효과

1) 대식세포 활성 증가

면역 증강 활성을 검토하기 위해 *in vitro*와 *in vivo* 에서의 대식세포의 활성화를 검토해 보았다. 김치추출물을 처리한 대식세포들은 활성이 크게 증가되는 효과를 나타내어 김치 MSF추출물 첨가의 경우는 2배 정도까지 대식세포의 활성이 증강되었다 (Table 3-4).

Table 3-4. Effect of kimchi extracts(MeOH, hexane and MSF) on the phagocytic activity and its index in the peritoneal phagocytic cells of Balb/c mice

Treatment ¹	Phagocytosis(%)	Phagocytic index
Control	24.3±0.6	1.37±0.01
MeOH ext.		
0wk	37.3±2.1	1.61±0.02
3wk	57.0±1.5	2.15±0.11
Hexane ext.		
0wk	30.8±1.6	1.71±0.16
3wk	37.2±2.3	1.79±0.16
MSF		
0wk	46.5±1.1	1.93±0.05
3wk	55.0±2.9	2.32±0.10

¹Mice were injected I.P. with MeOH extract(0.25mg/mouse), hexane extract(0wk: 0.13mg/ mouse; 3wk: 0.02mg/mouse) MSF(methanol soluble fraction, 0.19mg/mouse) and control(PBS, 0.5ml) one time each. Phagocytic activities were calculated with *C. albicans* (4×10^5 cell/ml) to be phagocytized in 200 phagocytes.

2) 김치출물물의 NK(natural killer) 세포의 면역증강효과

200/1의 E/T ratio에서 시료를 투여하지않은 대조마우스군에 비하여 일반 배추김치의 NK cell의 활성화는 유의한 암세포살해능력의 상승을 보였으며 유기 배추김치의 경우 매우 유의한 상승효과를 보였다(Fig. 3-5). 100/1의 E/T ratio에서는 대조마우스군에 비하여 일반김치와 유기김치의 암세포살해능력의 상승은 보였지만 유기김치에서만 유의한 상승을 보였다(data 생략). 이로서 김치출물물은 마우스에서 대식세포의 활성을 증가시켰을 뿐 아니라 NK cell의 활성화증가에도 영향을 끼치는 것으로 나타났다.

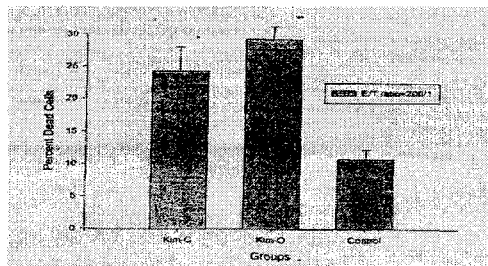


Fig. 3-5. NK cell mediated cytotoxicity in Kim-C(common Kimchi) and Kim-O(organic Kimchi)-treated mice at the effector/target cell ratio of 200/1. Values are means standard deviations for triplicate cultures, which were assayed in duplicate.

*Significantly different from the control value(P<0.05)

**Very significantly different from the control value(P<0.05)

2. 표준화된 배추김치(제 2장 참조)의 항암활성물질 동정 및 항암기작 연구

가. 배추김치 분획물의 암세포증식억제효과

Table 3-5는 AGS 인체 위암세포를 이용하여 김치의 메탄올추출물과 헥산추출물 및 분획물의 암세포 성장억제효과를 검토한 결과인데 메탄올추출물은 0.2mg/ml의 농도에서 70%이상의 인체위암세포의 성장을 억제하였고, 헥산추출물의 경우 이보다 다소 낮은 50%의 암세포 성장억제효과를 보였다. 또 탈지시킨 메탄올추출물은 0.2mg/ml첨가 농도에서 63%의 위암세포성장억제효과를 나타내었고, 이 추출물의 분획물중 디클로로메탄층과 에틸아세테이트층은 높은 암세포 성장억제효과를 보였으며, 특히 디클로로메탄층에서는 0.1mg/ml 의 농도에서 70%, 0.2mg/ml에서는 93%의 매우 높은 암세포성장억제효과를 나타내었다.

Table 3-5. Inhibitory effect of the fractionated samples of kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment (mg/ml)		Cells ($\times 10^4$ /ml)	Inhibition rate (%)
Control		165.7 \pm 7.5	
Methanol ext.	0.1	65.3 \pm 5.9	60.6
	0.2	44.0 \pm 7.5	73.4
Methanol soluble ext.	0.1	86.3 \pm 6.0	47.9
	0.2	61.3 \pm 2.3	63.0
Hexane ext.	0.1	92.3 \pm 6.7	44.3
	0.2	82.7 \pm 1.2	50.1
Dichloromethane Fr.	0.1	49.7 \pm 5.1	70.0
	0.2	12.0 \pm 2.0	92.8
Ethylacetate Fr.	0.1	79.0 \pm 5.3	52.3
	0.2	48.3 \pm 15.9	70.9
Butanol Fr.	0.1	109.3 \pm 8.1	34.0
	0.2	81.0 \pm 1.7	51.1
Aqueous Fr.	0.1	99.3 \pm 8.7	40.1
	0.2	88.0 \pm 6.9	46.9

Table 3-6은 SRB assay를 이용해 김치추출물과 분획물의 인체위암세포의 성장억제효과를 검토한 것이다. 메탄올 및 헥산추출물은 각각 85%, 그리고 62%의 암세포 성장억제효과를 나타내었고, 분획물에서는 디클로로메탄층이 가장 높은 암세포 성장억제효과를 보여 1.0mg/ml의 농도에서도 80%이상의 효과를 나타내었으며, 2.0mg/ml에서는 96%의 매우 높은 암세포 성장억제효과를 보였다. 또 에틸아세테이트층과 수층도 80%이상의 암세포 성장억제효과를 나타내었다.

AGS 인체 위암세포를 이용해 김치추출물과 분획물이 암세포의 성장에 미치는 효과

를 MTT assay를 이용해 검토한 결과(Table 3-6) 김치의 메탄올추출물, 헥산추출물과 탈지한 메탄올추출물은 모두 높은 위암세포 성장억제효과를 보였고 특히 김치의 hexane추출물은 낮은 농도(0.5mg/ml)에서는 암세포의 성장에 거의 영향을 미치지 않았으나 1.0mg/ml에서부터는 인체위암세포의 성장을 90%이상 억제함을 관찰할 수 있었다. 또 분획물들 중에서는 디클로로메탄층과 에틸아세테이트층이 높은 암세포 성장억제효과를 보였으며 특히 디클로로메탄층은 1.0mg/ml에서는 88%의 효과를 보였으며, 2.0mg/ml에서는 97%의 매우 높은 위암세포 성장억제효과를 관찰할 수 있었다. Ames 실험계와 암세포를 이용한 *in vitro* 항암 실험결과 김치의 메탄올추출물, 헥산추출물과 탈지한 메탄올추출물 및 분획물들 중에서 디클로로메탄층이 가장 활성이 높게 나타났다.

Table 3-6. Inhibitory effect of fractionated samples of kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay and 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT) assay

Treatment (mg/ml)		SRB assay(OD ₅₁₀)	MTT assay(OD ₅₅₀)
Control		0.290	0.736
Methanol ext.	1.0	0.085(71)*	0.235(68)
	2.0	0.035(85)	0.106(86)
Methanol soluble ext.	1.0	0.085(67)	0.437(41)
	2.0	0.035(72)	0.226(69)
Hexane ext.	1.0	0.111(62)	0.016(98)
	2.0	0.110(62)	0.009(99)
Dichloromethane Fr.	1.0	0.054(81)	0.087(88)
	2.0	0.920(96)	0.023(97)
Ethylacetate Fr.	1.0	0.021(93)	0.288(61)
	2.0	0.055(81)	0.131(82)
Butanol Fr.	1.0	0.222(28)	0.679(8)
	2.0	0.165(43)	0.687(7)
Aqueous Fr.	1.0	0.124(57)	0.617(16)
	2.0	0.046(84)	0.594(20)

*Inhibition rate(%)

나. 배추김치 디클로메탄 분획물의 apoptosis 유도효과와 cell cycle에서 G2/M phase 저해효과

1) Apoptosis 유도효과

김치의 분획물중 가장 활성이 컸던 디클로메탄 분획물을 HL-60 인체 혈액암세포를 이용하여 comet assay를 실시한 결과는 Table 3-7과 같다. PBS를 처리한 경우에 비해 디클로메탄 분획물을 처리한 경우에 apoptotic comet과 necrotic comet의 비율이 증가하였으며, 특히 apoptotic comet의 비율이 많았다. 또한 농도의존적으로

apoptotic comet의 비율이 증가하여 0.1mg/ml과 0.5mg/ml의 농도에서 각각 42.6%, 49.5%로 나타났다. 이로부터 김치의 디클로메탄분획물에 의한 암세포의 생존저해효과는 암세포내 프로그램된 세포 사망기전으로 알려진 apoptosis를 유도하여 나타난 것으로 여겨진다.

Table 3-7. Comet assay of dichloromethane fr. from chinese cabbage kimchi in HL-60 human promyelocytic leukemia cells

Treatment(mg/ml)	Control	Apoptotic comet	Necrotic comet	Total(%)
PBS	94.6	2.7	2.7	100
0.1	53.7	42.6	3.7	100
0.5	45.7	49.5	4.8	100

2) Cell cycle에서 김치시료의 암세포 G2/M phase 저해효과

인체 혈액암 세포인 HL-60에 일반표준화 배추김치와 유기표준화 배추김치의 메탄올 추출물과 디클로로메탄 분획물을 처리하였을 때 세포주기의 어느단계를 arrest하여 항암활성을 나타내는지 살펴본 결과(Table 3-8), G2/M기에서 control군의 세포 비율은 10.76%에 비하여 일반배추김치의 메탄올 추출물과 디클로로메탄 분획물을 처리한 경우는 각각 18.81%, 22.14%의 세포비율을 나타내어, G2/M기에서의 세포주기 지연 및 차단효과가 있음을 보여주고 있다. 한편 유기배추 추출물은 S기에서 control군의 세포비율은 57.75%에 비하여 64.71%의 비율을 나타내어 cell cycle의 DNA 합성단계인 S기에서의 지연 및 차단효과를 나타내는 것으로 나타났다. 유기배추김치와 일반배추김치는 cell cycle의 조절단계는 다르나, HL-60 혈액암세포의 cell cycle을 지연시켜 암세포의 성장억제 효과를 나타내었으며, 유기배추김치는 일반배추김치보다 MCF-7 인체유방암세포에서 cyclin의 발현을 크게 억제하였으며 cyclin D₁의 발현도 다소 억제하였다(p. 164참조).

Table 3-8. The effect on the cell cycle distribution in HL-60 human promyelocytic leukemia cells treated with kimchi samples after 24 hours of incubation at 37°C

Treatment	% of cells		
	G1	S	G2/M
Control	31.49	57.75	10.96
K-g	23.81	57.38	18.81
K-CH ₂ Cl ₂	37.11	40.75	22.14

Control : treated PBS

K-g : treated methanol ext.(0.5mg/ml) of general chinese cabbage kimchi

K-CH₂Cl₂ : treated dichloromethane fraction(0.05mg/ml) of K-g

다. 배추김치 추출물의 oncogene(Ha-ras) 발현 억제효과

Rat 2 fibroblast normal cells과 H06 Ha-ras transformed fibroblast cells을 이용하여 일반배추김치와 유기배추김치의 메탄올 추출물및 일반배추김치의 디클로로메탄 분획물의 항암효과에 대한 기작을 연구하였다. 3가지 김치시료는 모두 Rat2 정상 세포의 비해서 H-ras에 의해 transformed된 H06 세포의 성장을 훨씬 크게 저해하는 것으로 나타났으며 특히 유기배추의 메탄올 추출물이 가장 큰 저해효과를 보여 김치의 항암활성은 signal transduction pathway에 있어서 H-ras signaling의 downstream으로도 작용하는 것으로 판단된다(Fig. 3-6).

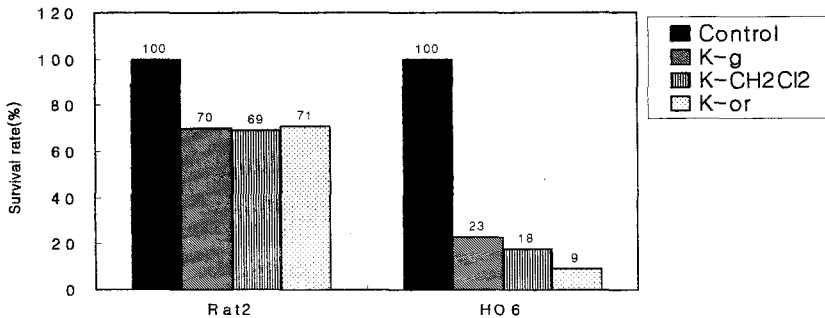


Fig 3-6. The growth effect of Rat 2 fibroblast normal cells and H06 H-ras transformed fibroblast cells

K-g : Methanol ext.(0.1mg/ml) of general chinese cabbage kimchi

K-or : Methanol ext.(0.1mg/ml) of organic cultivated chinese cabbage kimchi

K-CH₂Cl₂ : Dichloromethane fr.(0.05mg/ml) of K-g

일반배추김치와 유기배추김치의 메탄올 추출물및 일반배추김치의 디클로로메탄 분획물과 항암활성물질로 동정된 β -sitosterol의 human insulin receptor(HIRc-B) cell를 이용하여 oncogenic H-ras^{v12}를 microinjection하여 DNA synthesis 저해효과를 살펴보았다(Fig. 3-7). 일반배추김치와 유기배추김치의 메탄올 추출물은 oncogenic H-ras^{v12}에 의한 DNA 합성을 감소시키지 않았으나 디클로로메탄 분획물과 β -sitosterol은 oncogenic H-ras^{v12}에 의한 DNA 합성을 크게 감소시킴을 관찰할수 있었다. Ras는 signal transduction pathway를 조절하여 세포의 성장과 분화를 조절하는 중심적인 역할을 하며 세포표면에서 핵으로 signal이 전달된다. Epidermal growth factor와 같은 growth factor가 tyrosine kinase receptor와 세포막에서 결합하게 되고, ras는 작용하게 된다. 즉 inactive한 ras 형태인 Ras-GDP에서 active한 형태인 Ras-GTP로 전환한다. Ras의 downstream regulation의 경로는 Raf protein→MEK(MAP kinase kinase)→MAP kinase(MAPK)로 signal이 전달된다. 이러한 cascade pathway는 kinase에 의해 transcription factor를 인산화시킴으로써 signal이 핵으로 전달되는 것이다. Oncogenic한 형태의 ras는 많은 암세

포에서 발견되어지며, 암세포에서는 GTPase activity가 매우 저하되어져 있어 ras는 active한 형태로 존재함으로써 세포내 growth stimulatory signal로서 작용하게 된다. 즉 ras의 activity를 저하시키는 기능이 상실되면 암으로 진행되게 되며, 정상 cell을 transformation시켜 tumor cell로 전환시키게 된다. 본 연구에서는 김치의 추출물과 김치에서 항암활성물질로 동정된 β -sitosterol은 H-ras signaling의 downstream regulation으로 핵으로 signal이 전달되는 과정에 직접 작용함으로써 항암활성을 나타내는 것으로 판단된다. Ras-dependent signal transduction의 어떤 경로를 차단하는지에 대한 보다 깊은 연구와 함께 *in vivo* 실험으로 항암활성을 확인할 필요가 있다.

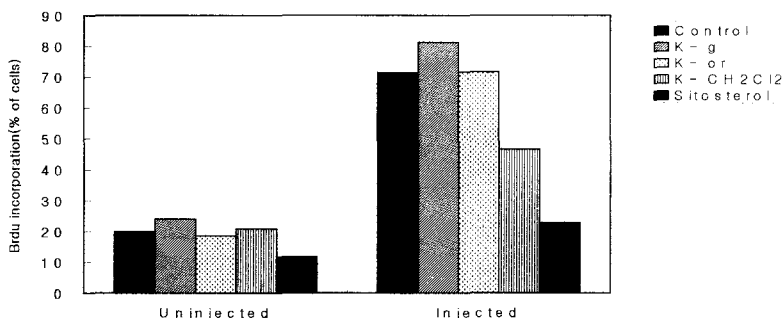


Fig. 3-7. DNA synthesis induced by oncogenic H-rasv12 in quiescent fibroblast overexpressing human insulin receptor(HIRc-B) cell

K-g : Methanol ext.(0.1mg/ml) of general chinese cabbage kimchi

K-or : Methanol ext.(0.1mg/ml) of organic cultivated chinese cabbage kimchi

K-CH₂C₁₂ : Dichloromethane fr.(0.05mg/ml) of K-g

라. 표준화 배추김치로부터 항암물질의 추출 및 분리동정

배추김치에서 항암활성을 나타내는 물질을 동정하였다. 즉, 표준화 배추김치를 동결건조한 후 분말을 만들고, hexane으로 3회 추출하고 잔사물을 메탄올로 추출하였으며, 다시 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올, 수층으로 분획하였다. 이 중 항암활성이 가장 컸던 디클로로메탄 분획을 silicagel column chromatography를 이용하여 분리하고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS와 FAB-MS를 이용하여 2개의 주요 활성물질을 동정하였다.

(자세한 동정방법과 결과 data는 1998. 6. 20. 진도보고서에 보고하였음.)

1) β -sitosterol의 동정

디클로로메탄분획으로부터 silicagel column chromatography를 이용하여 얻은 결정을 EI-MS로 동정한 결과 β -sitosterol로 확인되었다.

2) Linoleic acid 유도체의 동정

디클로로메탄 분획을 silicagel column chromatography를 이용하여 얻은 활성물질

을 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EI-MS 및 FAB-MS를 통하여 동정한 결과 linoleic acid 유도체로 확인되었다.

마. 활성 물질로 동정된 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 *in vitro* 항암 효과

표준화 배추김치의 디클로메탄분획물로부터 주요 활성 물질로 동정된 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 *in vitro* 항암효과를 AGS 인체 위암세포를 이용하여 검토한 결과는 Table 3-9에 나타내었다. 대조군에 비해 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 0.005mg/ml의 농도에서 50%이상 AGS위암세포의 생존을 억제함을 알 수 있었으며, β -sitosterol이 linoleic acid 유도체에 비해 다소 효과가 컸었다. 0.02mg/ml의 농도에서 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 각각 80.8%, 62.4%의 암세포 생존 억제 효과를 보였다.

Table 3-9. MTT assay of β -sitosterol and linoleic acid derivative against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₄₀	
	β -sitosterol	Linoleic acid derivative
Control	0.684	
0.005	0.254(62.9) ¹⁾	0.341(50.1)
0.01	0.279(59.2)	0.316(53.8)
0.02	0.131(80.8)	0.257(62.4)
0.05	0.001(99.9)	0.130(81.0)

¹⁾Inhibition rate(%)

표준화 배추김치의 dichloromethane fr.로부터 주요 활성물질로 동정된 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 AGS 인체 위암세포의 DNA 합성 저해효과를 살펴본 결과는 Table 3-10과 같다. 0.02mg/ml의 처리농도에서 대조군에 비해 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 각각 53%, 55%의 위암세포내의 DNA 합성을 저해하여 암세포 성장을 억제하였다.

Table 3-10. [^3H] Thymidine incorporation of β -sitosterol and linoleic acid derivative in AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	[^3H] Thymidine (\times cpm)	
	β -sitosterol	Linoleic acid derivative
Control		19,038
0.005	14,293(25) ¹⁾	10,919(43)
0.01	12,137(36)	12,292(35)
0.02	8,931(51)	8,524(55)

¹⁾Inhibition rate(%)

Table 3-11은 HL-60 인체 혈액암세포에 대한 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 생존저해 효과를 살펴본 결과이다. 0.01mg/ml의 처리농도에서 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 각각 82%, 41%의 HL-60 인체 혈액암세포의 생존을 저해함을 알 수 있었으며, 0.02mg/ml의 농도에서 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 각각 95%, 59%의 저해효과를 보였다.

Table 3-11. MTT assay of β -sitosterol and linoleic acid derivative against HL-60 human promyelocytic leukemia cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₄₀	
	β -sitosterol	linoleic acid derivative
Control	0.552±0.018	
0.005	0.530±0.012(4) ¹⁾	0.825±0.037(17)
0.01	0.101±0.030(82)	0.670±0.010(41)
0.2	0.023±0.068(96)	0.625±0.032(60)

¹⁾Inhibition rate(%)

β -sitosterol과 linoleic acid 유도체의 HL-60 인체 혈액암세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 세포를 seeding하고 시료를 농도별로 처리한 다음 4일 후 암세포를 계수한 결과를 나타낸 것이다(Fig. 3-8). β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 모두 농도 의존적으로 HL-60 인체 혈액암세포의 성장을 저해하였으며, β -sitosterol은 linoleic acid 유도체보다는 다소 높은 성장 억제효과를 보였다. 대조군의 세포수가 85×10^4 /ml인데 비해, 0.01mg/ml과 0.02mg/ml의 처리농도에서 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 각각 44×10^4 /ml, 36×10^4 /ml과 46×10^4 , 43×10^4 /ml의 세포수로 감소되었다. 이로부터 β -sitosterol과 linoleic acid 유도체는 HL-60 인체 혈액암세포의 생존 및 성장도 역시 억제하였다.

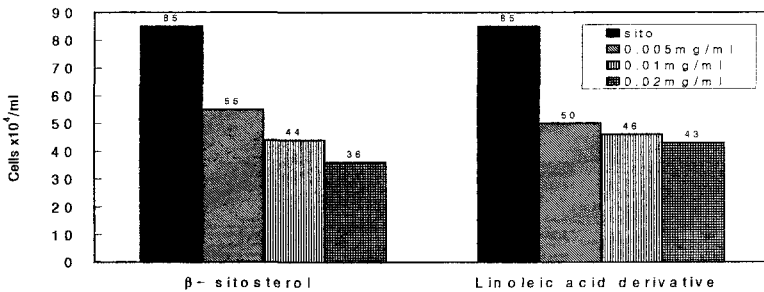


Fig. 3-8. Inhibitory effect of β -sitosterol and linoleic acid derivative on the growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells

3. 배추김치의 항암효과 증진 연구

가. 배추종류

1) 암세포의 cell cycle에 있어 유기배추 김치(제 2장 참조)의 항암효과

세포는 G0 phase에서 시작하여 세포 주기의 첫 번째 단계인 G1 phase를 거쳐서, S phase, G2 phase 그리고 M phase의 주기를 가진다. G1 phase는 DNA 합성의 전 단계로서 많은 종류의 조직특이성 단백질의 발현단계이고 S phase는 DNA 합성 단계이며 G2 phase는 유사분열 전단계이고 M phase는 유사분열 단계이다.

세포 주기에서 중요한 조절작용을 하는 cyclin-dependent kinase(cdk)는 인산화 작용에 의해 세포 증식을 유도하는 protein kinase이며 이것이 활성화가 되기 위해서는 cyclin과 결합해야 한다. Cyclin은 많은 종류의 cdk의 양성 조절자이며 포유동물의 genome은 10종류의 cyclins과 7종의 cdk를 암호화한다. 이러한 cyclin-cdk 복합체가 세포 주기 변환시 주요 조절자로 작용한다. G1 phase에서는 cyclin D와 E type의 발현이 나타나며 DNA 합성의 시작 단계인 S phase에서는 cyclin A가 주로 나타나고 뒤에 S phase와 G2 phase 사이에 cyclin B가 발현된다. 이들 cyclins들은 oncogene과 유사하게 돌연변이 되어지거나 암세포들의 경우처럼 과잉 발현되어질 때 세포를 분화로 유도시키지 않고 계속 증식되도록 야기시킨다. 특히 cyclin D1의 경우 c-myc 발현의 증가에 의해 전사가 촉진되어지는 것으로 알려져 있다. 또한 cyclin D1의 과잉발현은 Myo D의 기능을 저해해서 myocytes를 myotubes로의 분화를 억제시킨다고 보고되어져 있다. Cyclin B는 S phase에서 합성되어져 M phase 쪽으로 가면서 cdc 2와 결합하여 유사분열을 조절한다.

본 실험에서는 인체유방세포인 MCF7세포에 김치(일반배추김치(A), 유기배추김치(B)) 메탄추출물을 투여했을 때 cdk와 cyclins의 발현정도를 검토하여 김치가 세포 주기의 어느 단계를 차단하여 항암활성을 나타내는지 살펴 보았다. Fig. 3-9에서 보듯이 김치추출물은 cyclin B₁의 발현을 크게 억제시켰는데 유기배추김치 1.0mg/ml 첨가시 cyclin B₁의 생성을 완전히 억제시켰다. 또한 cyclin D₁의 발현도 다소 감소되었다.

Fig. 3-10에서는 cyclin B1 와 결합하는 cdc2의 발현을 검토한 결과인데 이 단백질 발현에는 김치는 크게 관여하지 못했다.

Table 3-12에서 보듯이 유기배추김치추출물은 DNA content가 G2/M에서 급격하게 증가되는 것으로 나타나 cyclin B1발현억제와 관련해 볼 때 김치추출물 중 일반배추김치도 효과가 있었으나 유기배추김치는 특히 cell cycle에서 G2/M phase를 차단하므로 항암활성을 나타내는 것으로 나타났다.

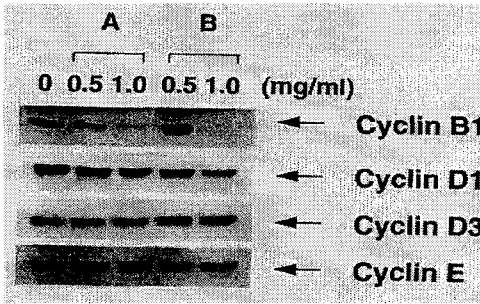


Fig. 3-9. Effect of common Chinese cabbage kimchi(A) and organic cultivated Chinese cabbage kimchi(B) that were fermented for 6days at 15°C on the Western blot analysis of cyclins(B1, D1, D3 and E) in MCF-7 human breast carcinoma cells. Cells were cultured in the absence or presence of either A or B for 36hr. Proteins were detected by Western blot analysis in cell lysates using 50 μ g of protein from untreated cells(0) and in cells 36hr after exposure.

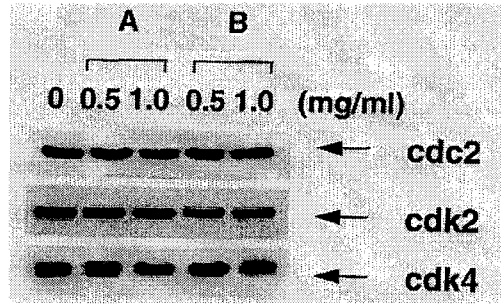


Fig. 3-10. Effect of common Chinese cabbage kimchi(A) and organic cultivated Chinese cabbage kimchi(B) that were fermented for 6days at 15°C on the levels of cdc2, cdk2 and cdk4 proteins in MCF-7 human breast carcinoma cells. Cells were treated with 0.5 and 1.0 mg/ml A or B for 36hr. Total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed using anti-cdks antibody. Proteins were detected by enhanced Chemiluminescence detection.

Table 3-12. Effect of methanol extracts of common Chinese cabbage kimchi(A) and organic cultivated Chinese cabbage kimchi(B) on cell cycle distribution in MCF-7 human breast cancer cells. Exponentially growing MCF-7 cells were treated at 0 time with A and B(1.0mg/ml) and flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated controls with cells treated with A and B for 36hr.

	G1	S	G2/M
Control	51.74	42.92	5.58
A 1.0	69.18	23.56	7.26
B 1.0	43.52	19.64	36.84

2) 김치추출물의 apoptosis유도

또한 이 경우 김치추출물이 apoptosis를 유발하는지를 측정한 결과 특히 유기배추 김치추출물은 bcl2의 발현은 억제시키며 Bax protein은 증가시켜 apoptosis도 유발시키는 것으로 나타났다(Fig. 3-11).

Apoptosis는 세포의 능동적인 자연사로서 자발적인 사망기전이라 할 수 있는데 종양의 자연치유 때나 종양세포들이 각종 항암제에 의해 사멸될 때 많이 관찰되어 발암

기전 연구 및 항암제들의 항종양연구와 관련하여 많은 관심을 모으고 있다. Apoptosis가 유발되면 가장 두드러진 생화학적 특성은 chromatin이 잘려지고, endonuclease의 작용으로 여러개의 사망기전 중 necrosis와 apoptosis를 구별하는 중요한 지표로 사용된다.

Fig. 3-12는 apoptosis를 연구하는 여러 실험방법 중 DNA fragmentation assay를 이용해 유기배추 메탄올추출물의 HL-60 human leukemia cell에서의 apoptosis를 관찰한 것이다.

유기배추 메탄올추출물 1.25mg/ml과 2.5mg/ml의 농도에서 모두 DNA fragment를 관찰할 수 있었으므로 유기배추의 메탄올추출물은 HL-60 혈액암세포의 apoptosis를 유발시켜, 혈액암세포를 사멸시키는 것으로 여겨진다.

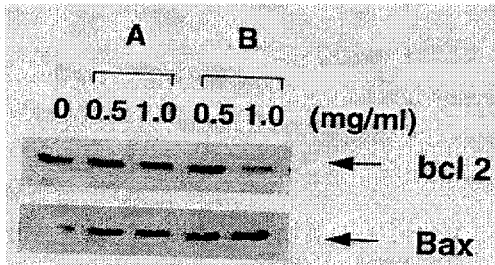


Fig. 3-11 :
Effect of common Chinese cabbage kimchi(A) and organic cultivated Chinese cabbage kimchi(B) that were fermented for 6days at 15°C on the levels of bcl2 and Bax proteins in MCF-7 human breast carcinoma cells. Cells were treated with 0.5 and 1.0 mg/ml A or B for 36hr. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel, transfer to nitrocellulose and probe with anti-bcl 2 or anti-Bax antibody.

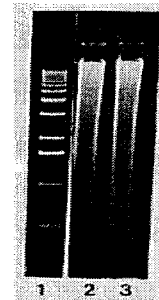


Fig. 3-12 :
Apoptosis in HL-60 human leukemia cells after treating methanol extract from organic cultivated Chinese cabbage kimchi.

1. Size marker 1mg/ml
2. 1.25mg/ml treated
3. 2.5mg/ml treated

3) 일반배추김치와 유기배추김치의 *in vivo*에서의 항암효과 가) 세포독성실험

6일째의 유기배추김치와 일반배추김치 메탄올추출물이 종양세포에 대한 직접적인 세포 살해효과를 보기 위하여 여러 농도를 이들 시료가 포함되어 있는 배지에 배양하여 24시간 후에 종양세포의 생존율을 관찰하였다. 유기배추김치와 일반배추김치 메탄올 추출물 0.75mg/ml 이후 농도에 생존율이 작아지기 때문에 위의 농도가 암세포에

대한 직접적인 살해효과가 있는 것으로 나타났다.

나) 수명연장효과 및 고형암 성장 저지효과

정상 마우스에 종양세포를 이식한 후 시료를 투여했을때 시료로 인한 수명연장 효과를 보기 위하여 복강내로 sarcoma-180 세포를 이식한 다음 매일 1회씩 20일간 시료를 복강으로 투여한 결과 유기배추김치와 일반배추김치에서 각각 21%, 14%의 수명연장효과가 증진되는 것으로 나타났다(Table 3-13).

마우스에서 종양세포를 이식한 후 20일동안 시료를 투여하고 32일 되는 날 해부하여 종양을 분리해 내어 무게를 측정 한 결과 대조군(7.5g)에 비해 종양의 무게가 일반배추김치는 5.4g, 유기배추김치는 4.5g으로 감소되어 종양생성 억제효과를 나타내었는데 특히 유기배추김치가 더 효과가 좋았다.

Table 3-13. Effect of methanol extract from 6 days fermented common Chinese cabbage(CC) kimchi and organic cultivated Chinese cabbage(OC) kimchi on life span and tumor weight of Balb/c mice with sarcoma-180 cells.

Treatment	Survival time(day)	Prolongation rate(%)	Tumor weight
Sacoma-180 + Control	20.2 ± 4.4	-	7.50 ± 0.54
Sacoma-180 + CC kimchi	23.5 ± 4.0	14	5.40 ± 0.78
Sacoma-180 + OC kimchi	25.3 ± 3.7	21	4.54 ± 0.32

Balb/c mice were injected I.P with methanol extract(0.75mg/kg) once a day for 20 days. Antitumor activities of methanol extract of 6 days fermented common volumn of phosphate buffered saline(control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following the transplantation. All mice were sacrificed at 5 weeks following the transplantation, and spleen weights were measured.

4) 유기배추김치 추출물이 마우스의 NK활성과 Interleukin-2생성에 미치는 효과

일반배추김치와 유기배추김치, 2종류의 김치시료를 마우스 구강으로 매일 0.5 mg 씩 각 각 투여하였으며, 투여 1, 3, 5주 후의 실험군으로부터 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 이용하여 김치투여로 인한 interleukin-2(IL-2)생성능과 natural killer 세포활성(NK activity)을 측정하였다.

Kimchi-organic(K-or, 유기배추김치 메탄올추출물)를 투여하였을 때는 투여초기(1주)에는 대조군에 비하여 감소하였으나 3주와 5주 투여군에서 유의한 상승효과를 보였다(Fig. 3-13). Kimchi-general(K-g, 일반배추김치 메탄올추출물)를 투여하였을 때는 3주 투여군에서 가장 높은 상승효과를 보였다(Fig. 3-14). NK세포 활성효과는 3주 투여군, 5주투여군에서는 일반배추김치와 유기배추김치의 메탄올추출물과 일반배추김치 모두 NK cell의 활성도를 증가시킴을 알 수 있었다(Table 3-14~16).

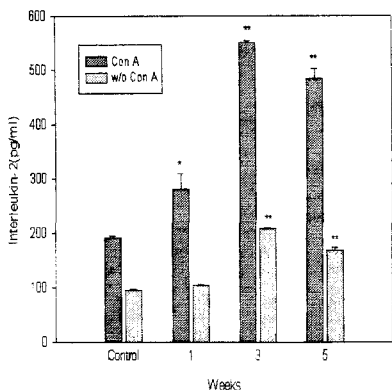


Fig. 3-13. IL-2 production from splenocytes of BALB/c mice treated orally with methanol extract of general kimchi.

The splenocytes were isolated from mice treated orally with 0.5 mg of kimchi extracts or saline solution as control in a day for 1, 3 and 5 weeks. 5 μ g/ml of con A was used as simulating mutagen and each splenocyte from mice treated variously was assayed in triplicate. Following 72 hours incubation at 37°C, the IL-2 productions of the supernatants were measured using Interest-2XTM Mouse IL-2 ELISA kit.

*Significantly different from control by Student's *t* test(* p <0.05, ** p <0.01).

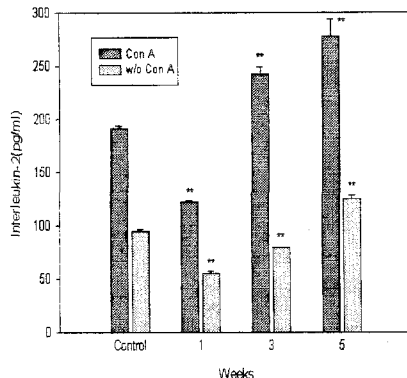


Fig. 3-14. IL-2 production from splenocytes of BALB/c mice treated orally with methanol extract of organic kimchi.

The explanation is the same as shown in Fig. 3-13.

Table 3-14. Effect of kimchi extracts treated orally for 1 week on the NK cell activity of splenocyte¹⁾ in mice

Treatment	% Cytolysis (Effector/Target ratio)	
	200:1	100:1
Control	30.77 \pm 1.01	16.45 \pm 2.12
Methanol ext. from general kimchi	66.39 \pm 0.97**	43.80 \pm 1.69**
Methanol ext. from organic kimchi	58.50 \pm 1.51**	28.41 \pm 0.39**
Dichloromethane fr. from general kimchi	15.93 \pm 0.44**	3.98 \pm 0.15**

¹⁾ Male BALB/c mice were treated orally with 0.5 mg/day of kimchi extracts (methanol extracts from general kimchi and organic kimchi, and dichloromethane fraction from general kimchi, treated group) or saline solution (control group) for 1 week. The cells allowed to adhere in a culture flask for 1 hour at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Non-adherent NK cells used as the effector cells. 50 μ l each of effector cells and Yac-1 murine lymphoma cells (target cell, 10³ cells/ml) were added to each well of a 96 well flatbottomed microplate. Following 4 days incubation at 37°C, the survival cells were measured using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium 5-diphenyl-tetra zolium bromide (MTT). Results are expressed as percent of cytolysis.

²⁾ Data are means \pm SD.

**Significantly different from control by Student's *t* test (p <0.01).

Table 3-15. Effect of kimchi extracts treated orally for 3 week on the NK cell activity of splenocyte¹⁾ in mice

Treatment	% Cytolysis (Effector/Target ratio)	
	200:1	100:1
Control	32.55±1.19	21.09±2.06
Methanol ext. from general kimchi	56.75±1.79**	40.94±0.77**
Methanol ext. from organic kimchi	65.24±5.46**	49.37±1.20**

1,2,**)The explanation is the same as shown in Table 3-14

Table 3-16. Effect of kimchi extracts treated orally for 5 week on the NK cell activity of splenocyte¹⁾ in mice

Treatment	%Cytolysis (Effector/Target ratio)	
	200:1	100:1
Control	33.81±0.90	18.49±2.46
Methanol ext. from general kimchi	52.54±0.68**	18.75±0.34
Methanol ext. from organic kimchi	42.06±2.02**	23.89±2.14

1,2,**)The explanation is the same as shown in Table 3-14

따라서 3종류의 김치추출물의 투여에 의한 마우스비장세포의 IL-2생성능과 NK세포 활성능은 일반배추의 경우 3주까지의 투여에서는 상승을 보인 반면 5주까지의 장기투여에서는 3주까지 보였던 상승에서 하강하는 것을 알 수 있다. 그러나 유기배추 군과 CH₂Cl₂ 군에서는 1, 3, 5주로의 투여횟수가 증가할수록 IL-2 생성능과 NK세포활성능이 지속적으로 증가함을 보여준다. 이는 면역담당세포에 대한 지속적인 자극효과로 볼 수 있으며 구조적적합복합체의 인식과는 무관한 NK세포활성을 항구적으로 유지함으로써 NK세포관련 면역감시기능을 수행할 수 있을 것으로 기대되며 또한 구조적적합복합체의 인식에 의해서 표적세포와 작용하는 T세포의 증식인자, 즉 IL-2의 지속적인 생성은 생체의 세포성면역 유지에 긴요하게 작용할 것으로 예측된다. 이로서 이들 김치 시료의 투여는 *in vivo*에서 면역활성을 조절 증강시키는데도 작용한다고 하겠다.

나. 양념류 첨가 암예방 배추김치의 항암효과 확인 연구

표준화 배추김치를 바탕으로 부재료의 종류와 양을 달리하여 13종류의 김치를 담근 후 이들 김치를 발효온도를 달리하여 발효시켜 가장 적숙기라 알려진 pH4.3이 될 때까지 걸리는 발효일수를 Table 3-17에 나타내었다. 표준화 배추김치에 비해 고춧가루를 3배(10.5%) 첨가한 김치는 발효가 서서히 진행되어 pH 4.3까지 도달하는데 걸리는 시간이 표준화 배추김치에 비해 길었다. 15℃에서 1일간 발효시키고 5℃에서 발효시킨 경우 pH 4.3에 도달하는데 걸린 시간은 표준화 배추김치는 15일인데 비해 고고춧가루 김치는 18일 걸렸다. 또 마늘을 3배(5.2%) 첨가한 김치도 표준화 김치에 비해 발효가 천천히 일어남을 알 수 있었으며, 고춧가루와 마늘을 각각 2배씩 첨가한 김치

는 발효속도가 표준화 배추김치와 큰 차이가 없었으나, 25℃에서 발효시킨 경우 발효가 지연됨을 알 수 있었다. 또 표준화 배추김치에 갖과 청각을 5% 첨가한 김치는 각각 발효속도가 표준화 김치와 별 차이가 없었고, 갖 첨가 김치의 경우 25℃에서 발효시켰을 경우 발효가 다소 지연됨을 알 수 있었다. 산초가루, 계피가루, 인삼가루, 키토산 올리고당, 알긴산 나트륨과 첨차분말을 1% 첨가한 김치의 경우, 산초가루와 키토산 올리고당, 첨차분말을 첨가한 김치가 표준화 배추김치에 비해 발효가 더디게 일어났고, 특히 키토산 올리고당과 첨차분말을 첨가한 김치는 15℃ → 5℃로 발효시킨 경우 pH4.3에 도달하는데 걸리는 시간이 각각 20일, 24일로 표준화 김치 15일에 비해 훨씬 오래 걸렸음을 알 수 있었다. 유기배추로 담근 김치의 경우는 표준화 김치보다 발효가 조금 더디게 일어났으나 큰 차이는 없었다.

Table 3-17. The time(days) required to reach pH 4.3 of various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi at different fermentation temperatures

Kimchi	Fermentation temperature		
	15℃→5℃ ¹⁾	15℃	25℃ (days)
Standardized kimchi	15	4	1
10.5% red pepper powder(RPP) added kimchi	18	5	1.5
5.2% garlic added kimchi	16	4	1.5
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	15	4	2.5
5% leaf mustard added kimchi	15	4	2
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	15	4	1
1% chinese pepper powder added kimchi	16	5	2
1% cinnamon powder added kimchi	20	4	2.5
1% ginseng powder added kimchi	13	4	1
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	20	6	2.5
1% sodium alginate added kimchi	15	4	1
1% sweet tea extract added kimchi	24	7	3
Organic chinese cabbage kimchi	16	5	1

¹⁾ 1 day incubation at 15℃ and then fermented at 5℃

표준화 배추김치를 바탕으로 부재료의 종류와 양을 달리하여 담근 13종류의 김치를 15℃에서 1일간 발효시킨 후 5℃에서 pH 4.3이 될 때까지 발효시킨 다음 동결건조하여 메탄올 추출물을 얻은 후 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포를 이용하여 *in vitro* 항암 활성을 검토하였다. AGS 인체 위암세포를 이용하여 MTT, SRB assay와 암세포 성장저해 효과를 검토해 본 결과를 Table 3-18~20에 나타내었다. MTT와 SRB assay에서 고추가루를 10.5% 첨가한 김치, 마늘을 5.2% 첨가한 김치, 고추가루와 마늘을 각각 7%, 2.8% 첨가한 김치가 표준화 김치에 비해 암세포 생존억제 효과가 크게 나타났다. 또 산초가루와 첨차분말을 첨가한 김치도 표준화 김치에 비해 활성이 뛰어났 으며, 유기배추를 이용하여 담근 김치가 표준화 배추 김치에 비해 암

세포 생존저해가 더 크게 나타났다.

Table 3-18. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₄₀	
	0.05	0.1
Control	0.747 ^a	0.747
Standardized kimchi	0.491 ^{bc} (34) ¹⁾	0.328 ^{bc} (57)
10.5% RPP added kimchi	0.393 ^c (47)	0.152 ^d (80)
5.2% garlic added kimchi	0.511 ^{bc} (32)	0.071 ^{de} (91)
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	0.418 ^c (44)	0.074 ^{de} (90)
5% leaf mustard added kimchi	0.517 ^b (31)	0.395 ^{bc} (47)
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	0.513 ^{bc} (31)	0.380 ^{bc} (49)
1% chinese pepper powder added kimchi	0.400 ^c (47)	0.015 ^e (98)
1% cinnamon powder added kimchi	0.432 ^{bc} (42)	0.455 ^b (39)
1% ginseng powder added kimchi	0.453 ^{bc} (39)	0.331 ^c (56)
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	0.444 ^{bc} (41)	0.114 ^{de} (85)
1% sodium alginate added kimchi	0.400 ^c (47)	0.462 ^b (38)
1% sweet tea extract added kimchi	0.132 ^d (82)	0.082 ^{de} (89)
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	0.449 ^{bc} (40)	0.064 ^{de} (91)

¹⁾Inhibition rate(%)

^{a-d}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 3-19. Sulforhodamine B assay (SRB) of methanol extracts(0.01mg/ml) from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₁₀	
	0.05	0.1
Control	0.757 ± 0.036 ^a	0.757 ± 0.036
Standardized kimchi	0.691 ± 0.076 ^{ab} (9) ¹⁾	0.472 ± 0.006 ^b (38)
10.5% RPP added kimchi	0.667 ± 0.067 ^{ab} (12)	0.328 ± 0.068 ^{cde} (57)
5.2% garlic added kimchi	0.616 ± 0.105 ^{ab} (19)	0.308 ± 0.017 ^{de} (59)
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	0.339 ± 0.047 ^c (55)	0.251 ± 0.013 ^e (67)
5% leaf mustard added kimchi	0.411 ± 0.025 ^c (46)	0.399 ± 0.093 ^{bcd} (47)
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	0.653 ± 0.021 ^{ab} (14)	0.389 ± 0.076 ^{bcd} (49)
1% chinese pepper powder added kimchi	0.720 ± 0.050 ^{ab} (5)	0.200 ± 0.005 ^e (74)
1% cinnamon powder added kimchi	0.691 ± 0.049 ^{ab} (9)	0.434 ± 0.012 ^{bc} (43)
1% ginseng powder added kimchi	0.687 ± 0.114 ^{ab} (9)	0.516 ± 0.161 ^b (32)
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	0.389 ± 0.109 ^c (49)	0.519 ± 0.075 ^b (31)
1% sodium alginate added kimchi	0.393 ± 0.041 ^c (48)	0.397 ± 0.066 ^{bcd} (48)
1% sweet tea extract added kimchi	0.583 ± 0.008 ^b (23)	0.201 ± 0.027 ^e (73)
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	0.663 ± 0.107 ^{ab} (12)	0.294 ± 0.003 ^{de} (61)

¹⁾Inhibition rate(%)

^{a-d}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

AGS 위암세포를 이용하여 13종류의 김치시료를 처리한 후 6일간 배양한 다음 암세포수를 계수하여 암세포 증식억제 효과를 살펴 본 결과는 Table 3-20에 나타내었으며, SRB, MTT assay에서 처럼 고추가루, 마늘을 고농도로 첨가한 김치와 산초가루를 첨가한 김치, 유기배추김치가 암세포 증식억제 효과가 큼을 알 수 있었다.

Table 3-20. Growth inhibitory effect of methanol extracts(0.01mg/ml) from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment	Cell number($\times 10^4/ml$)	Inhibition rate(%)
Control	48.3 ^a	0
Standardized kimchi	18.3 ^{cd}	62.1
10.5% RPP added kimchi	16.0 ^d	66.9
5.2% Garlic added kimchi	15.3 ^{def}	68.3
7% RPP+2.8% Garlic added kimchi	13.0 ^{ef}	73.1
5% leaf mustard added kimchi	23.0 ^b	52.4
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	16.3 ^{de}	66.3
1% chinese pepper powder added kimchi	8.3 ^g	82.8
1% cinnamon powder added kimchi	16.3 ^{de}	66.3
1% ginseng powder added kimchi	16.0 ^{de}	66.9
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	19.0 ^{cd}	66.7
1% sodium alginate added kimchi	13.7 ^{ef}	71.6
1% sweet tea extract added kimchi	20.7 ^{bc}	57.1
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	12.0 ^f	75.2

¹⁾ Inhibition rate(%)

^{a-c} Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

HT-29 인체 결장암 세포를 이용하여 13종류의 김치에 대해 MTT와 SRB assay를 실시한 결과를 각각 Table 3-21과 3-22에 나타내었다. 고추가루를 표준화 김치에 비해 3배(10.5%) 첨가한 김치와 고추가루(7%)와 마늘(2.8%)을 각각 2배씩 첨가한 김치가 HT-29 결장암 세포의 생존을 크게 저해함을 알 수 있었다. 또한 산초가루를 첨가한 김치와 유기배추 김치도 표준화 김치보다 암세포의 생존을 더 크게 저해하였다.

김치시료를 처리하면서 6일간 배양한 후 HT-29 결장암 세포의 증식억제 효과(Table 3-23)를 검토한 결과, 고고추가루 첨가 김치, 고고추가루+고마늘 첨가 김치, 산초가루 첨가 김치와 유기 배추김치가 표준화 김치에 비해 2배 정도 암세포의 증식을 억제함을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 표준화 김치에 비해 고추가루와 마늘을 2~3배 첨가한 김치, 산초가루를 첨가한 김치와 유기배추 김치가 AGS 인체 위암세포와 HT-29 결장암 세포의 생존 및 증식을 억제함을 알 수 있었다.

Table 3-21. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₄₀	
	0.05	0.1
Control	0.434 ^a	0.594 ^a
Standardized kimchi	0.385 ^b (11.3) ¹⁾	0.257 ^{cd} (60.1)
10.5% RPP added kimchi	0.304 ^c (30.0)	0.124 ^{ef} (79.1)
5.2% Garlic added kimchi	0.397 ^b (8.5)	0.251 ^{cd} (57.7)
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	0.297 ^c (35.5)	0.081 ^f (86.4)
5% leaf mustard added kimchi	0.297 ^c (31.6)	0.189 ^{de} (68.2)
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	0.338 ^c (22.1)	0.427 ^b (28.1)
1% chinese pepper powder added kimchi	0.390 ^b (10.1)	0.292 ^c (50.8)
1% cinnamon powder added kimchi	0.377 ^b (13.1)	0.287 ^c (51.7)
1% ginseng powder added kimchi	0.393 ^b (9.4)	0.430 ^b (27.6)
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	0.142 ^a (2.1)	0.292 ^c (50.8)
1% sodium alginate added kimchi	0.438 ^{ab} (1.0)	0.134 ^{ef} (77.4)
1% sweet tea extract added kimchi	0.276 ^c (36.4)	0.148 ^{ef} (75.1)
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	0.250 ^c (42.4)	0.089 ^f (85.0)

¹⁾Inhibition rate

^{a-c}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 3-22. Sulforhodamine B (SRB) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD ₅₁₀	
	0.05	0.1
Control	0.718±0.072 ^a	0.638±0.072 ^a
Standardized kimchi	0.443±0.030 ^c (38) ¹⁾	0.460±0.038 ^{bc} (36)
10.5% RPP added kimchi	0.479±0.005 ^c (33)	0.196±0.047 ^f (73)
5.2% garlic added kimchi	0.711±0.021 ^a (1)	0.498±0.029 ^b (31)
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	0.402±0.046 ^c (44)	0.038±0.035 ^a (95)
5% leaf mustard added kimchi	0.590±0.008 ^b (18)	0.331±0.032 ^c (54)
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	0.439±0.024 ^c (39)	0.514±0.031 ^b (28)
1% chinese pepper powder added kimchi	0.407±0.067 ^c (43)	0.329±0.047 ^e (54)
1% cinnamon powder added kimchi	0.596±0.005 ^b (17)	0.412±0.022 ^{cd} (35)
1% ginseng powder added kimchi	0.703±0.026 ^a (2)	0.482±0.042 ^b (33)
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	0.717±0.062 ^a (0)	0.360±0.006 ^{de} (50)
1% sodium alginate added kimchi	0.668±0.027 ^{ab} (7)	0.308±0.044 ^e (57)
1% sweet tea extract added kimchi	0.394±0.030 ^c (45)	0.342±0.007 ^e (52)
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	0.448±0.033 ^c (38)	0.345±0.044 ^e (52)

¹⁾Inhibition rate

^{a-c}Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 3-23. Growth inhibitory effect of methanol extracts(0.1mg/ml) from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment	Cell number($\times 10^4$ /ml)	Inhibition rate(%)
Control	23 ^a	0
Standardized kimchi	16.0 ^b	30.4
10.5% RPP added kimchi	9.5 ^{efg}	58.7
5.2% garlic added kimchi	12.5 ^{cde}	45.7
7% RPP+2.8% garlic added kimchi	7.5 ^k	67.4
5% leaf mustard added kimchi	14.5 ^{bcd}	37.0
5% <i>codium fragile</i> added kimchi	12.0 ^{def}	47.8
1% chinese pepper powder added kimchi	9.0 ^{fg}	60.9
1% cinnamon powder added kimchi	14.0 ^{bcd}	39.1
1% ginseng powder added kimchi	14.0 ^{bcd}	39.1
1% chitosan oligosaccharide added kimchi	15.5 ^{bc}	32.6
1% sodium alginate added kimchi	11.5 ^{def}	50.0
1% sweat tea extract added kimchi	10.5 ^{efg}	54.3
Organic cultivated chinese cabbage kimchi	10.5 ^{efg}	54.3

^f Inhibition rate

^{a-k} Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

항암김치의 개발을 위해서 표준화 배추김치에 첨가되는 부재료의 종류와 양을 달리 하고 이들 김치에 대한 관능검사 및 이화학적 실험을 바탕으로 선정된 항암활성증진 김치에 대한 *in vitro* 항암활성을 AGS 인체 위암세포를 이용하여 MTT assay로 확인하였다(Table 3-24). 1.0 μ l/assay의 처리농도에서는 표준화 김치에 비해 고춧가루와 마늘을 각각 2배씩 첨가하고 초피와 갖을 첨가한 유기 배추김치만이 더 높은 *in vitro* 항암활성을 보였으나 2.5 μ l/assay의 처리농도에서는 표준화 김치가 36%의 AGS 위암세포 저해효과를 보인 반면, 4종류의 항암활성김치는 모두 60%이상의 훨씬 높은 저해효과를 보였다.

Table 3-24. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay of juice from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi in AGS human gastric adenocarcinoma cells(fermentation, 15°C for 1 day and then 5°C up to pH 4.3)

Treatment(μ l/assay)	OD ₅₄₀	
	1.0	2.5
Control	0.738	0.714
Standardized kimchi(C-1)	0.525(45) ¹⁾	0.574(36)
Standardized OC kimchi(OC-1)	0.552(40)	0.448(67)
7% RPP+2.8% garlic added OC kimchi(OC-2)	0.615(26)	0.445(67)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP added OC kimchi(OC-3)	0.537(44)	0.496(61)
7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added OC kimchi(OC-4)	0.498(55)	0.449(63)

¹⁾ Inhibition rate (%)

다. 암예방(항암) 기능성김치 I의 면역증강효과

부재료의 양을 달리하거나 항암 기능성이 있는 재료를 첨가하여 담근 13종류의 배추김치 메탄올추출물의 *in vitro* 항암효과 실험에서 고춧가루량 증가 김치가 표준화 김치에 비해 암세포 생존억제 효과가 크게 나타났다. 또 산초가루와 첨차분말을 첨가한 김치도 표준화 김치에 비해 활성이 뛰어났으며, 유기배추를 이용하여 담근 김치가 표준화 배추 김치에 비해 암세포 생존저해가 더 크게 나타났다. 따라서 이들 부재료를 첨가한 4종류의 김치를 제조하여 마우스 대식세포의 nitric oxide(NO)생성과 김치가 위암 발생/예방에 어떤 영향을 끼치는지 보기 위해서 *Helicobacter pylori* 성장에 미치는 효과와 인체상피세포를 이용한 TGF- β 1 생성미치는 효과를 살펴보았다.

1) 항암 기능성 김치의 마우스 대식세포의 nitric oxide(NO)생성에 미치는 효과

앞에서 언급한 부재료 첨가를 이용한 4종류의 김치를 제조하여 마우스 대식세포의 nitric oxide(NO)생성에 미치는 김치의 효과를 살펴보았다. 김치 추출물을 구강으로 매일 0.5mg씩 3주간 투여한 다음 실험군로부터 복강내 대식세포를 분리하여 lipopolysacchride(LPS, 10 μ g)를 작용시킴으로서 나타나는 nitric oxide(NO)를 측정하였다. Nitric oxide(NO)는 사이토카인이나 미생물의 영향을 받아 대식세포, 호중구, 혈관내피세포, 활막표층세포, 활막섬유아세포, 연골세포등에서 생성되는 반응질소중간체(reactive nitrogen intermediates, RNI)로서 nitric oxide synthase(NOS)가 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 생체내에서 혈관이완물질, 신경전달물질, 면역기능조절물질로서 작용할 뿐만아니라 항미생물작용 혹은 항암작용을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 표준화김치투여군(K-1, C-1)은 대조군보다 NO의 생성량이 다소 적었으나 고춧가루와 마늘의 첨가량을 늘리고 초피첨가(K-3, OC-3)와 갓과 초피를 첨가(K-4, OC-4)한 김치는 NO생성을 크게 증가시키는 효과를 나타내었다(Fig. 3-15).

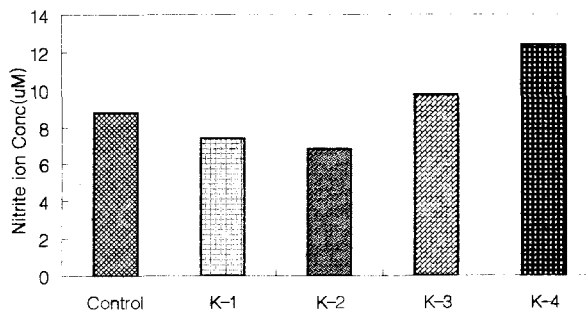


Fig. 3-15. Nitrite ion concentration in peritoneal macrophage of mice treated with kimchi extract.

K-1 : standarized kimchi(C-1), K-2 : 7% red pepper powder(RPP) + 2.8% garlic added kimchi(OC-2), K-3 : 7% RPP + 2.8% garlic + 0.1% chinese pepper powder added kimchi(OC-3), K-4 : 7% RPP + 2.8% garlic + 0.1% CPP + 5% leaf mustard added kimchi(OC-4)

2) 항암활성 증진 김치가 *Helicobacter pylori* 성장과 TGF- β 1 생성에 미치는 효과

가) *Helicobacter pylori*균 성장에 미치는 효과

*Helicobacter pylori*균 배양 6일 후 대조군에서 적색을 나타냈으며, 4 종류의 김치 추출물(K-1(C-1), 일반표준화김치: K-2(OC-2), 유기+양념2김치: K-(OC-3), 유기+양념3김치: K-4(OC-4), 유기고활성김치) 각 각에 대하여 0.5 μ g/ml에서 1,000 μ g/ml 농도까지 모두 적색을 나타냈다. 따라서 *H. pylori* 균은 김치추출물에 의해서 거의 성장이 저해되지 않았으며 또한 성장을 자극하지도 않는 것으로 나타났다.

나) 인체상피세포의 transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) 생성에 미치는 효과

TGF- β 에 의한 생물학적 반응은 복잡할 뿐만 아니라 세포의 종류와 생리적 조건들에 따라서 바뀌게 된다. 더욱이 TGF- β 는 면역반응과 상처치유의 조절, 조직과 기관들의 발육 등에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 부재료를 첨가하여 제조한 4 종류의 김치추출물(K-1(C-1), 일반표준화김치: K-2(OC-2), 고춧가루와 마늘을 2배로 첨가한 김치: K-3(OC-3), 고춧가루와 마늘을 2배로 첨가하고, 초피를 첨가한 김치: K-4(OC-4), 고춧가루와 마늘을 2배로 첨가하고 갖과 초피를 첨가한 김치)를 제조하여 인체상피세포의 transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) 생성에 미치는 효과를 살펴 보았다. 세포에 *H. pylori*분해물만을 작용시킨 군들에서의 TGF- β 1의 생성은 대조군에 비하여 48시간 째에서 증가를 보인 반면 72시간 째에서는 감소를 보이고 있다 (Fig. 3-16). 그러나 K-1, 2, 3, 4(C-1, OC-2, OC-3, OC-4) 추출물이 추가되어 배양되었을 때에는 48시간 째에서의 증가를 낮출 뿐만 아니라 72시간 째의 감소를 다시 높이고 있다(Fig. 3-17~19). 이러한 작용은 세균산물의 노출로 인한 TGF- β 1생성의 변화를 김치추출물이 정상으로 조절하는 것으로 해석된다.

3) 항암활성 증진 김치 추출물이 Interleukin-6 생성에 미치는 효과

Interleukin-6 (IL-6)은 단구, B 세포, T 세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 피부 각질세포 등의 세포에서 생성되는 다기능성 사이토카인이다. IL-6은 당초 B cell stimulatory factor 2 (BSF 2), hybridoma/plasmacytoma growth factor (HPGF), hepatocyte stimulating factor (HSF), interferon- β 2 (IFN- β 2) 등으로 각 각 따로 분리되었으나 이들은 모두 26 KD의 같은 물질로 판명됨으로서 IL-6으로 통일되었다. IL-6의 기능으로서 B 세포에 대하여는 면역글로블린 생성을 유도하고, T 세포에 대하여는 killer T 세포의 유도, IL-2 수용체 발현 유도, 증식 유도, 조혈간세포에 대하여는 Go 기의 단축, 거핵세포에 작용하여 혈소판 생성 유도, 각질세포, 신장 사구체간질세포, 골수종 세포의 증식 유도, 염증 시 간세포로부터의 급성 기 단백질 생성 유도, 알부민 생성억제 등의 작용이 있음이 *in vitro* 실험을 통하여 밝혀졌다. 본 실험에서는 특성화한 김치를 제조하여 이를 마우스비장세포에 작용시켜 IL-6의 생성능

을 비교하고자 하였다.

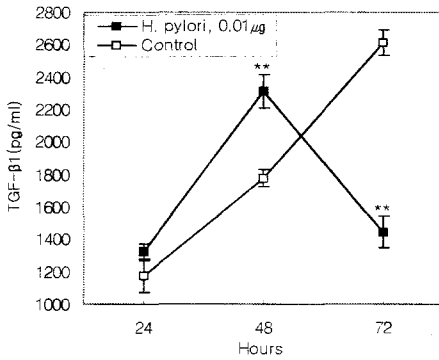


Fig. 3-16.
Production of TGF-β1 by epithelial cells with 0.01 μg of *H. pylori* lysate for 24, 48, and 72 hours respectively in MEM. Culture supernatant were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD**p<0.01 compared with control

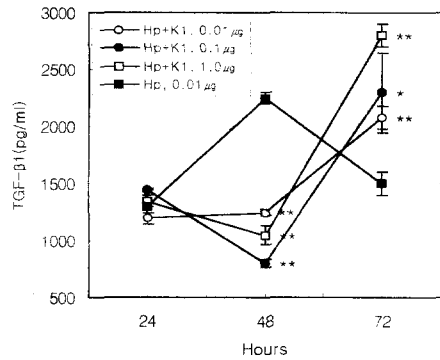


Fig. 3-17.
Production of TGF-β1 by epithelial cells with 0.01 μg of *H. pylori* lysate and 0.01, 0.1, 1.0 μg of kimchi extract, K1 for 24, 48, and 72 hours respectively in MEM. Culture supernatant were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD *p<0.05 and **p<0.01 compared with control

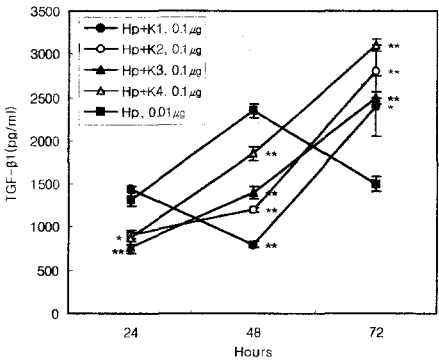


Fig. 3-18.
Production of TGF-β1 by epithelial cells with 0.01 μg of *H. pylori* lysate and 0.1 μg of kimchi extract, K1, K2, K3 and K4 for 24, 48, and 72 hours respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD*p<0.05 and **p<0.01 compared with control

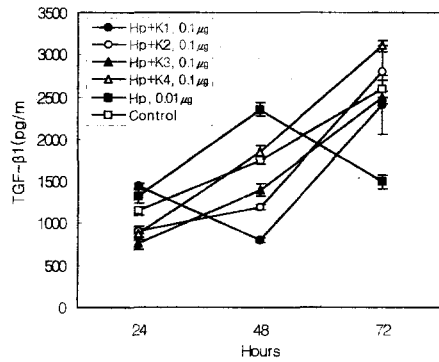


Fig. 3-19.
Production of TGF-β1 by epithelial cells with 0.01 μg of *H. pylori* lysate and 0.1 μg of kimchi extract, K1, K2, K3 and K4 for 24, 48, and 72 hours respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD

첨가물을 작용시켜 제조한 4 종류의 김치추출물(K-1(일반표준화김치, C-1); K-2(유기배추+고춧가루+마늘, OC-2); K-3(고춧가루+마늘+초피, OC-3); K-4(유기배추+고춧가루+마늘+초피+갯, OC-4))을 0.01, 0.1, 1.0 μg 씩 마우스비장세포부유액 (2×10^6 cells/ml), 1 ml에 작용시킨 후 24시간동안 배양하였다. 각 시험 well에는 미리 Lipopolysaccharide(LPS), 1 μg 씩을 분주하였다. 일정배양시간이 경과된 후 배양상층액을 수거하여 -70°C 에 보관하면서 IL-6생성 효과측정에 사용하였다. 대조군은 생리식염수나 LPS(1 μg)만을 투여한 군으로 하였다. 세포에 LPS만을 작용시킨 군들에서의 IL-6의 생성은 대조군에 비하여 10 배 이상의 증가를 보임으로서 그램 음성균 독소의 노출에 따른 염증관련 사이토카인의 증가를 나타냈으며 여기에 김치추출물을 작용하였을 때 K-1(C-1)과 K-4(OC-4)의 경우에는 낮은 농도의 추가노출에서는 증가효과를 나타낸 반면 김치추출물의 농도가 올라가면 분명한 감소를 보이고 있다. 그러나 K-2, 3(OC-2,3)추출물의 경우에는 낮은 농도에서부터 높은 농도에 이르기까지 농도의존적으로 IL-6의 생성이 감소되고 있다(Table 3-25). 따라서 이러한 작용은 세균산물인 LPS의 노출로 인한 염증관련 사이토카인인 IL-6생성이 김치추출물에 의해서 조절되는 것으로 해석된다.

Table 3-25. IL-6 production in mice splenocytes exposed with kimchi extracts(pg/ml)

Samples	0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
K-1	94.66 \pm 7.36	70.74 \pm 1.96	55.83 \pm 1.47
K-2	78.02 \pm 2.45	65.53 \pm 1.47	62.07 \pm 1.47
K-3	70.44 \pm 2.94	75.59 \pm 0.98	60.68 \pm 2.45
K-4	88.42 \pm 4.41	72.13 \pm 0.98	65.88 \pm 1.97
LPS(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	79.06 \pm 2.94		
Control	5.55 \pm 0.98		

이와 같이 김치는 IL-6 생성을 억제하여 항염증 반응이 있는 것으로 확인되었다. 따라서 김치는 NK cell 활성화, 대식세포의 활성화, TGF- β_1 생성조절, NO생성조절 등으로 면역조절반응에 관여하는 것으로 나타났다.

4) 암예방/항암 기능성김치 I의 *in vitro* 항암 증진 효과

표준화 김치의 양념비(I)와 표준화 양념비를 바탕으로 기능성을 증진시킨 양념비(II)로 일반배추(I)김치(C-1), 유기배추(I)김치(OC-1), 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4))를 담아 실험하였다.

MTT assay에서 AGS 인체위암세포의 저해효과가 일반배추(I)김치(C-1)는 5mg/ml, 10mg/ml에서 각각 61%, 67%를 나타낸데 비해 일반배추(II)김치(C-4)는 73%, 72%, 유기배추(II)김치(OC-4, 항암 기능성 김치 I)는 78%, 83%로 높게 나타났다(Table 3-26).

배추별로 보면 일반배추보다 유기배추가 높은 저해율을 보이며 표준화된 양념비 (I)보다 기능성을 증진시킨 양념비(II)가 더 높은 저해율을 보였다.

Table 3-26. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of methanol extract samples from chinese cabbage kimchi in AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment(mg/ml)	OD540	
	5	10
Control	0.873±0.128	0.680±0.044
C ¹⁾ (I) kimchi	0.511±0.014 (61) ³⁾	0.443±0.031 (67)
OC ²⁾ (I) kimchi	0.470±0.083 (66)	0.439±0.074 (71)
C(II) kimchi	0.493±0.093 (73)	0.457±0.022 (72)
OC(II) kimchi	0.407±0.148 (78)	0.354±0.016 (83)

¹⁾ Common chinese cabbage ²⁾ Organic chinese cabbage

$$^3) \text{ Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}}{\text{OD}_{540} \text{ of control}} \times 100$$

5) 항암기능성 김치 I의 *in vivo* 항암효과 및 면역활성 증강효과

*In vitro*의 결과를 바탕으로 *in vivo*에서 Balb/c mouse에 sarcoma-180 종양세포를 이용하여 수명연장효과와 고형암성장저지효과를 살펴보았다.

가) 세포 독성실험(Viability test)

시료 메탄올추출물의 sarcoma-180 마우스 종양세포에 대한 세포독성효과를 살펴본 결과(Table 3-27) 0.75mg/ml에서 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 0.75 mg/kg/day의 농도를 이용하여 수명연장효과와 고형암저지효과를 살펴보았다.

나) 수명연장효과

수명연장효과를 측정한 결과 control이 27일을 생존한 반면 일반배추 고활성(II)김치(C-4)가 39.7일로 32%의 가장 높은 수명연장효과를 보였고 유기배추(I)김치(OC-1)와 유기배추(II)김치(OC-4)가 36.5일로 26%의 높은 수명연장효과를 보였다(Table 3-28).

다) 각 장기의 중량변화

유기배추(I)김치(OC-1)에서 비장의 체중당 무게가 다소 높았으나 그 외의 장기들의 체중당 무게는 유사하게 나타났다(Table 3-29).

라) 고형암 성장 저지 효과

고형암성장저지효과를 보면 유기배추(I)김치(OC-1), 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)가 각각 34.3%, 29.5%, 39.3%로 각각 높게 나타났다(Table 3-30). 4가지 김치종류 중 OC-4 김치가 가장 고형암성장억제에 효과가 컸었다.

Table 3-27. Viability of sarcoma-180 cells in culture medium containing methanol extract from kimchi samples

Sample	Final conc. (mg/ml)	Total cell number ($\times 10^4$)	Viability of cell (%)
Control		17.4 \pm 2.9	92
S-180+C (I) kimchi(C-1)	0.1	12.8 \pm 2.1	85
	0.5	11.8 \pm 3.1	80
	0.75	10.4 \pm 3.0	77
	1.0	7.2 \pm 3.9	62
	2.5	7.0 \pm 2.4	64
S-180+OC (I) kimchi(OC-1)	0.1	11.8 \pm 3.4	84
	0.5	10.2 \pm 2.6	77
	0.75	10.8 \pm 2.8	75
	1.0	7.5 \pm 0.9	66
	2.5	5.6 \pm 2.9	56
S-180+C (II) kimchi(C-4)	0.1	11.6 \pm 4.6	88
	0.5	10.2 \pm 2.4	85
	0.75	8.4 \pm 2.9	81
	1.0	6.2 \pm 1.3	71
	2.5	6.8 \pm 1.9	59
S-180+OC (II) kimchi(OC-4)	0.1	13.0 \pm 2.1	83
	0.5	10.2 \pm 2.3	75
	0.75	12.4 \pm 2.1	81
	1.0	8.4 \pm 2.2	64
	2.5	7.2 \pm 2.5	58

Table 3-28. The influence of methanol extract from kimchi samples on life span of Balb/c mice

Sample	Survival time (day)	Prolongation rate (%)
Control	27.0 \pm 1.7	-
S-180+C (I) kimchi(C-1)	35.2 \pm 1.7	23
S-180+OC (I) kimchi(OC-1)	36.5 \pm 2.9	26
S-180+C (II) kimchi(C-4)	39.7 \pm 2.9	32
S-180+OC (II) kimchi(OC-4)	36.5 \pm 2.8	26

Table 3-29. Effects of methanol extracts from the kimchi samples on the immunoorgan (spleen and liver), heart and kidney weight of the Balb/c mice

Sample	Body wt. (g)	Spleen/body	Liver/body	Heart/body	Kidney/body
		wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)
Control	29.0 \pm 1.63	0.47 \pm 0.13	8.68 \pm 1.15	0.65 \pm 0.09	2.16 \pm 0.19
S-180+PBS	30.2 \pm 1.00	1.50 \pm 0.17	7.78 \pm 0.56	0.55 \pm 0.04	1.78 \pm 0.06
S-180+C (I) kimchi(C-1)	26.6 \pm 1.62	2.35 \pm 0.3	8.77 \pm 0.62	0.68 \pm 0.12	2.39 \pm 0.33
S-180+OC (I) kimchi(OC-1)	28.9 \pm 1.23	1.39 \pm 0.17	6.93 \pm 0.56	0.74 \pm 0.11	1.76 \pm 0.09
S-180+C (II) kimchi(OC-1)	28.1 \pm 0.90	1.82 \pm 0.21	8.07 \pm 0.91	0.72 \pm 0.11	1.92 \pm 0.33
S-180+OC (II) kimchi(OC-4)	27.2 \pm 2.07	1.77 \pm 0.16	8.38 \pm 0.96	0.61 \pm 0.18	2.01 \pm 0.33

Table 3-30. Antitumor activity of methanol extract from kimchi samples in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Sample	Tumor wt. (g)	Inhibition rate(%)
S-180+PBS	5.19±1.19	-
S-180+C (I) kimchi(C-1)	4.57±1.41	11.9
S-180+OC(I) kimchi(OC-1)	3.41±1.09	34.3
S-180+C(II) kimchi(C-4)	3.66±0.73	29.5
S-180+OC(II) kimchi(OC-4)	3.15±0.65	39.3

항발암 효소로 알려진 GST는 친전자성 발암물질의 활성화 대사산물의 해독작용으로서 발암물질은 생체내에서 cytochrome P-450이나 phosphotransferase 등 각종 약물대사 효소에 의해 활성화되어 DNA 손상을 일으키지만, GST는 이들 소수성 잔기를 가지는 활성화대사물을 기질로, 여기에 GSH를 공유결합시켜 안정화된 형태를 만들며, 최종적으로 뇨중으로 배설시키므로써 해독작용을 한다. 간조직 중의 GST 활성화변화는 일반배추 (II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)가 각각 747nmol/mg protein/min, 726 nmol/mg protein/min로 높게 나타났고(Fig. 3-20) glutathione content는 유기배추(I)김치(OC-1), 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)가 각각 0.40 μmol/g, 0.38 μmol/g, 0.43 μmol/g로 높게 나타났다(Fig. 3-21).

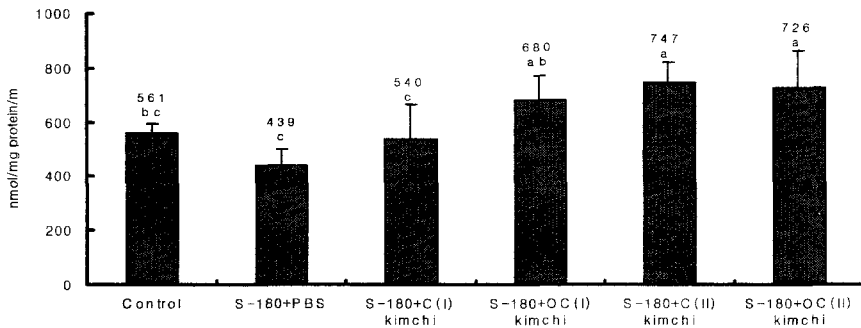


Fig 3-20. The effect of methanol extract from kimchi samples on hepatic glutathione S-transferase activity in sarcoma-180 treated mice

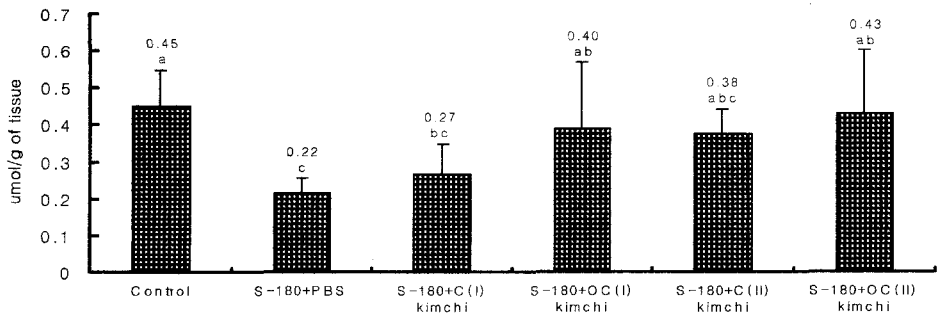


Fig 3-21. The effects of methanol extract from kimchi samples on hepatic glutathione content in sarcoma-180 treated mice

지질성분인 불포화지방산에 산소가 첨가되어 과산화된 지질인 lipid peroxide는 세포막의 주요성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산이 활성산소와 결합하여 생기게 된다. 이 lipid peroxide 함량에서는 유기배추(I)김치(OC-1), 유기배추(II)김치(OC-4)가 6.7nmol/g, 2.6nmol/g으로 값이 낮게 나타났다(Fig. 3-22).

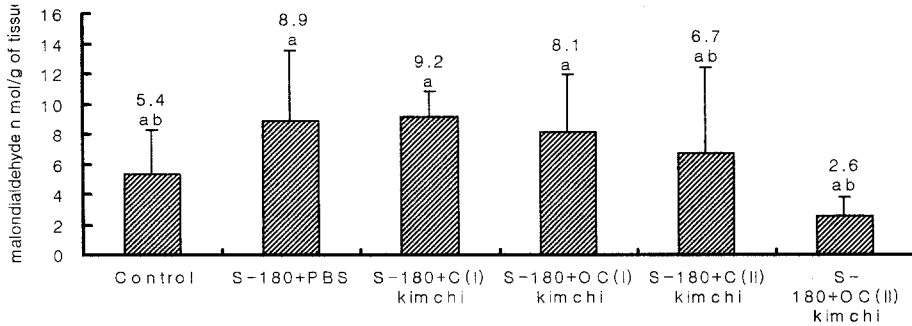


Fig. 3-22. The effect of methanol extract from kimchi samples on hepatic lipid peroxide content in sarcoma-180 treated Balb/c mice

Natural killer(NK) cell은 자연살해성을 갖는 단핵구 세포로서 비탐식성이며 비부착성 세포로서 RNA 종양 바이러스 항원을 표현하고 있는 림프계 세포를 선택적으로 파괴하는 특성이 있기 때문에 이들 세포의 역할은 T임파구와는 다른 면역감시기구로서 종양 저항성에 관여하는 중요한 면역기능으로 인식되고 있다. 이 NK cell의 cytolysis(%)는 유기배추(I)김치(OC-1), 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)에서 각각 47%, 44%, 79%의 높은 cytolysis를 보였다(Fig. 3-23).

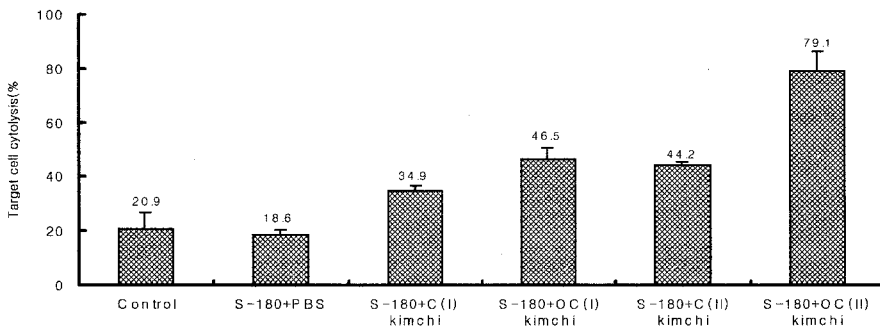


Fig. 3-23. The effects of methanol extract from kimchi samples on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes

이상의 실험으로 보면 배추종류로는 일반배추보다는 유기배추가 항암효과가 있었고 양념비를 보면 표준화된 양념비(I)보다는 기능성을 증진시킨 양념비(II)김치에서 *in vivo* 항암효과가 증진되었으며, 이 경우 간에서 GST와 glutathione 함량을 증가시키

고 lipid peroxide 함량은 감소시켜 간의 해독계를 항암 기능성 김치가 활성화시키는 것으로 나타났다. 그리고 이 김치는 면역계의 NK세포의 활성화도 증진시켜, 분자생물학적 level에서의 항암효과뿐 아니라 *in vivo*에서 phase II 효소 및 NK세포의 활성을 증가시키는 등의 항암 활성 기작을 가지는 것으로 나타났다.

6) *In vivo*에서 항암 기능성김치 I 식이의 항암효과 및 면역활성 증강효과

김치시료로 메탄올추출물을 만들어 복강주사로 실험한 위의 결과를 바탕으로 생쥐에 이 김치시료를 식이로 먹었을 때의 효과를 보고자 먼저 표준화 김치와 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)를 담아 5°C에서 48일 동안 발효시키는 중 이 화학적 검사를 하였고, *in vivo*에서 Balb/c mouse에게 식이로 먹여 실험을 하였다. 15°C에서 하루 방치하고 5°C에서 48일동안 살펴본 결과 표준화김치는 27일에 발효적정기인 pH4.3부근에 도달했고 일반배추(II)김치(C-4)와 유기배추(II)김치(OC-4)는 34일로 발효가 더디게 일어남을 알 수 있었고 맛에 관여하는 *Leuconostoc sp.*는 발효적정기에서 유기배추(II)김치(OC-4)가 가장 높은 1.4×10^8 CFU/g의 값을 나타냈다(Fig. 3-24).

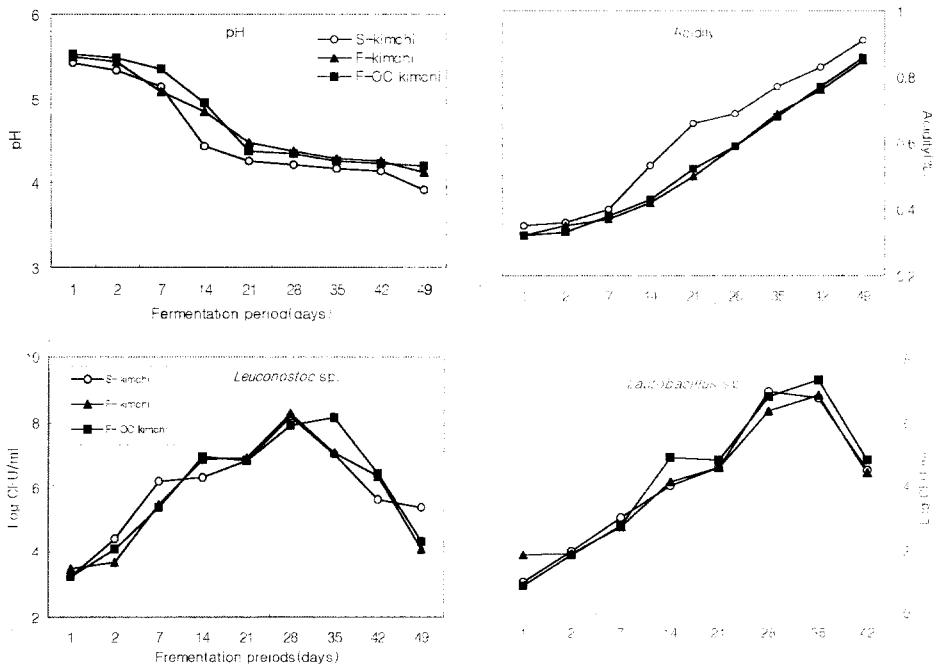


Fig. 3-24. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc sp.*, and *Lactobacillus sp.* counts in various kinds of chinese cabbage kimchi fermented at 15°C for 1 day and then 5°C

S kimchi : standardized cabbage kimchi(C (I),C-1)

F kimchi : functional cabbage kimchi(C (II),C-4)

FOC kimchi : functional organic cabbage kimchi(OC(II),OC-4)

발효적정기에 도달한 표준화김치(C-1), 일반배추(II)김치(C-4), 유기배추(II)김치(OC-4)를 동결건조한 후 분말화 한 다음 농도별로 첨가한 mouse 식이를 조제하여 sarcoma-180 cell을 투여한 Balb/c mouse로 항암효과를 측정하였다.

Table 3-31. General component analysis after freeze drying(%) of kimchi samples

	C (I) kimchi(C-1)	C (II) kimchi(C-4)	OC(II) kimchi(OC-4)
Water	4.68	5.59	3.79
Lipid	2.87	3.09	4.71
Protein	15.76	15.42	13.53
Ash	21.75	20.35	17.77
Carbohydrate	54.76	55.55	60.2

Table 3-32. AIN-76TM purified diet and composition of experimental diets based on general component analysis of kimchi samples

	Control	C (I)4%	C (I)8%	C (II)4%	C (II)8%	OC (II)4%	OC (II)8%
Casein	20.0	19.37	18.77	19.38	18.77	19.46	18.92
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Sucrose	50.0	49.4	48.79	49.51	49.03	49.51	49.03
Fiber	5.0	3.41	1.83	3.26	1.53	3.08	1.16
Corn oil	5.0	4.89	4.77	4.88	4.75	4.81	4.62
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Control : AIN-76 diet, C (I)4% : Standardized kimchi(C-1) 4% added diet, C (I)8% : Standardized kimchi 8% added diet, C (II)4% : 7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added kimchi(C-4) 4% added diet
 C (II)8% : 7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added kimchi 8% added diet
 OC (II)4% : 7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added organic cabbage kimchi(OC-4) 4% added diet
 OC (II)8% : 7% RPP+2.8% garlic+0.1% CPP+5% leaf mustard added organic cabbage kimchi 8% added diet

일반표준화김치(C-1), 일반고활성김치(C-4), 유기고활성김치(OC-4)를 4, 8%를 각각 첨가하여 만든 식이로 2주간 먹이고 sarcoma-180 cell을 마우스 서혜부에 주사한 후 30일 동안 계속 먹여 실험한 결과 종양생성 억제효과는 일반표준화 4%첨가한 김치가 가장 낮았고 유기고활성(OC-4) 8%첨가한 김치가 가장 높아 28%를 나타냈다. 일반표준화김치(C-1)에서는 4%보다는 8%첨가한 김치가 높은 저해율을 보였고 일반고활성김치(C-4)는 4%가 8%첨가한 김치보다 조금 높았으나 큰 차이는 없었다. 유기고활성김치(OC-4)는 4%보다는 8%첨가한 김치가 높게 나타났다. 김치의 군에 따라서는 일반표준화김치(C-1)보다는 일반고활성김치(C-4)가 높았고 유기고활성김치(OC-4)가 더욱 높아 가장 높은 저해율을 보였다(Table 3-33). 이로서 항암 기능성김치 I 은 마우스에 식이로 먹였을 때도 항암효과가 증진되는 것으로 나타났다.

Table 3-33. Antitumor activity of feeding from kimchi diets groups in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Diets	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
S-180+Control	6.0±1.3	--
S-180+C (I) 4%	5.8±1.0	3
S-180+C (I) 8%	4.9±1.0	18
S-180+C (II) 4%	4.9±0.9	18
S-180+C (II) 8%	5.1±0.7	15
S-180+OC (II) 4%	4.8±0.9	20
S-180+OC (II) 8%	4.3±1.0	28

면역계에 작용하는 natural killer(NK) cell의 활성은 일반표준화김치(C-1) 4% 보다는 8%첨가한 김치가 높았고 일반고활성김치(C-4)는 4% 첨가한 김치가 높았으며 유기고활성김치(OC-4)는 4%보다는 8%첨가한 김치의 활성이 더 높았다. 김치의 군에 따라서는 일반표준화김치(C-1)를 첨가한 식이가 control과 유사하게 낮았고 일반고활성 김치(C-4)를 첨가한 식이가 일반표준화김치(C-1)를 첨가한 식이보다 높은 활성을 보였다. 그러나 유기고활성김치(OC-4)를 첨가한 식이가 가장 높은 natural killer cell의 활성을 보였다(Fig. 3-25).

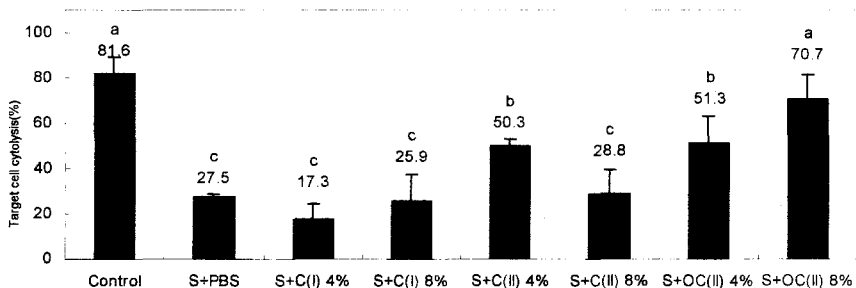


Fig. 3-25. The effect kimchi diet groups on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes

간의 lipid peroxide함량을 살펴본 결과 S-180+PBS군은 48.7인 반면 표준화김치(C-1) 8% 첨가군이 41.6, 고춧가루 7%+마늘 2.8%+초피 0.1%+5% 갓 첨가한 일반배추김치(C-4) 8% 첨가군이 54.4, 고춧가루 7%+마늘 2.8%+초피 0.1%+5% 갓 첨가한 유기배추김치 4% 첨가군(OC-4)이 64.1로 정상인 대조군과 유사하게($p < 0.05$) 나타났고, 고춧가루 7%+마늘 2.8%+초피 0.1%+5% 갓 첨가한 유기배추김치(OC-4) 8%첨가군이 39.9로 가장 낮게 나타났다(Fig. 3-26).

그러나 간의 glutathione S-transferase 활성은 모든 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3-27). 정상인 대조군의 glutathione 함량은 0.250이고, S-180+PBS

군은 0.215, 표준화김치 4%, 8% 첨가군이 각각 0.220, 0.226이며, 고춧가루 7%+마늘 2.8%+초피 0.1%+5% 갖 첨가한 일반배추김치 4%, 8% 첨가군이 각각 0.229, 0.251, 고춧가루 7%+마늘 2.8%+초피 0.1%+5% 갖 첨가한 유기배추김치 8% 첨가군이 0.243으로 다소 높게 나타났다(Fig. 3-28).

이 실험을 통해 주사에 의한 처리와 식이 처리는 다소간의 효소계에 차이가 있었지만 결국 항암 기능성 김치 I 은 *in vivo*에서 일반 표준화김치보다 항암효과가 증진됨이 확인되었다.

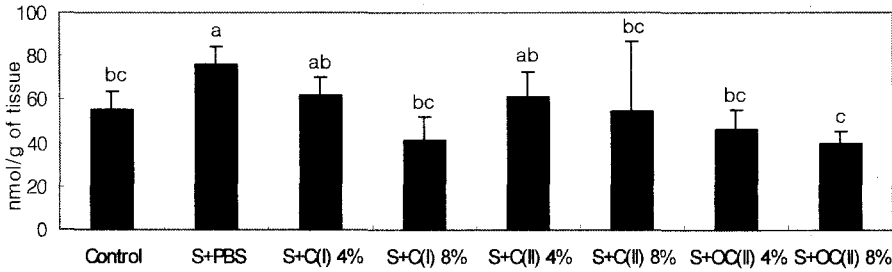


Fig. 3-26. The effect of feeding from kimchi diet groups on hepatic lipid peroxide content in sarcoma-180 treated balb/c mice

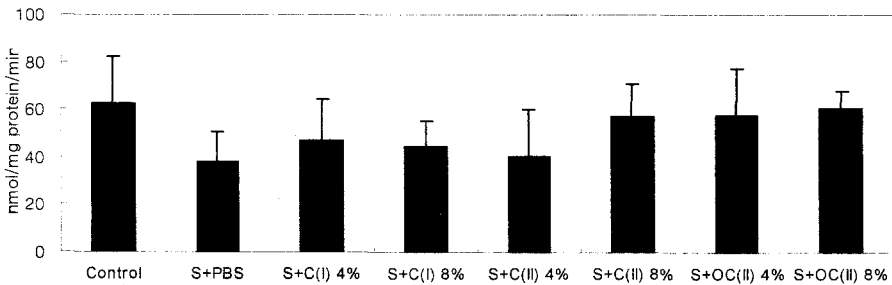


Fig. 3-27. The effect of feeding from kimchi diet groups on hepatic cytosolic glutathione S-transferase in sarcoma-180 treated balb/c mice

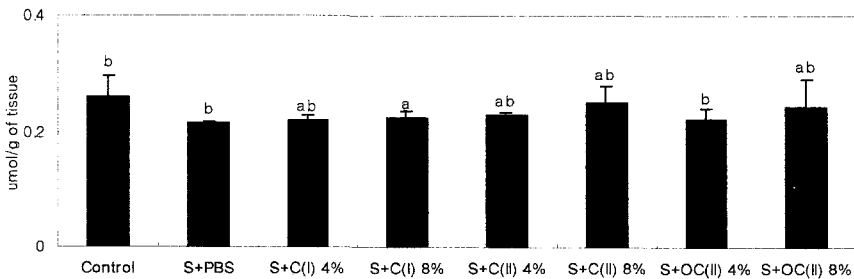


Fig. 3-28. The effect of feeding from kimchi diet groups on hepatic cytosolic glutathione content in sarcoma-180 treated balb/c mice

라. 암예방/항암 기능성김치 II의 *in vivo* 항암활성 및 조직학적 변화 연구

1) 고형암 성장 저지 효과

Sarcoma-180 종양세포만 이식한 대조군은 종양의 무게가 5.4g이었으나 표준화김치(2.5%천일염) 투여군은 종양의 무게가 4.6g으로 감소하여 15%의 종양생성억제효과를 나타내었다. 항암 기능성김치 I 투여군은 표준화 김치보다 높은 24%의 고형암 성장저지효과를 보였다. 또한 항암 기능성김치 II(1.7%구운소금+0.8%KCl) 투여군은 항암 기능성김치 I 투여군보다도 높은 39%의 종양형성억제효과를 보여 김치제조시 소금(NaCl)의 일부를 KCl로 대체할 경우 고형암성장 저지효과가 높아짐을 관찰할 수 있다(Table 3-34).

Table 3-34. Antitumor activities of the methanol extracts from various kinds of kimchi in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Sample	Dose(mg/kg)	Tumor wt. (g)	Inhibition rate(%)
S-180+PBS		5.4±0.3	
S-180+SK ¹ I(Chunil salt)	1.0	4.6±0.5	15
S-180+FK ² II(Gueun salt)		4.1±0.2	24
S-180+FK II(Gueun salt+KCl)	1.0	3.3±0.3	39

¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

2) Glutathione S-transferase(GST)활성 변화

간에서 일어나는 대사효소계의 phase II단계는 내인성 물질이나 외부에서 투여된 독성물질을 포함하거나 수용성물질로 전환시켜 체외로 배출시킴으로써 이 물질을 제거하는 작용이 있는데 그 중 GST는 환원된 glutathione을 이용하여 체내독성물질과 과산화물질의 전이, 배설에 관여하는 효소이다. GST활성은 종양세포를 이식하지 않은 정상군이 가장 높아 630.2nmol/mgprotein/min이었으며, 종양세포를 이식한 대조군은 345.2nmol/mg protein/min로 감소하였다. 표준화김치(2.5%천일염) 투여군은 401.3 nmol/mg protein/min로 종양세포이식군보다 GST의 활성이 높아졌으며, 항암 기능성 김치 I(2.5% 구운소금)을 투여한 군은 483.9nmol/mgprotein/min로 표준화김치(2.5% 천일염) 투여군보다 높아졌다. 항암 기능성 김치 II(1.7%구운소금+0.8%KCl) 투여군의 GST활성은 546.9nmol/mgprotein/min로 항암 기능성 김치 I(2.5%구운소금)을 투여한 군보다 높아졌다(Fig. 3-29).

3) *In vivo* 면역활성 증강효과

Yac-1 세포에 대한 세포파괴 활성이 표준화김치(2.5%천일염) 투여군은 38%, 기능성 김치(2.5% 구운소금)을 투여한 군은 47%로 항암 기능성김치 I 투여군이 표준화김치(2.5%천일염) 투여군보다 NK cell의 면역활성이 높았다. 또한 항암 기능성김치 II(1.7%구운소금+0.8%KCl)는 55%의 높은 세포파괴활성을 보여 항암 기능성증진 레시피에 KCl을 대체하면 표준화김치(2.5%천일염) 보다 마우스 비장내 자연살해세포의 Yac-1 cell에 대한 세포파괴활성을 높일 수 있음이 확인되었다(Fig. 3-30).

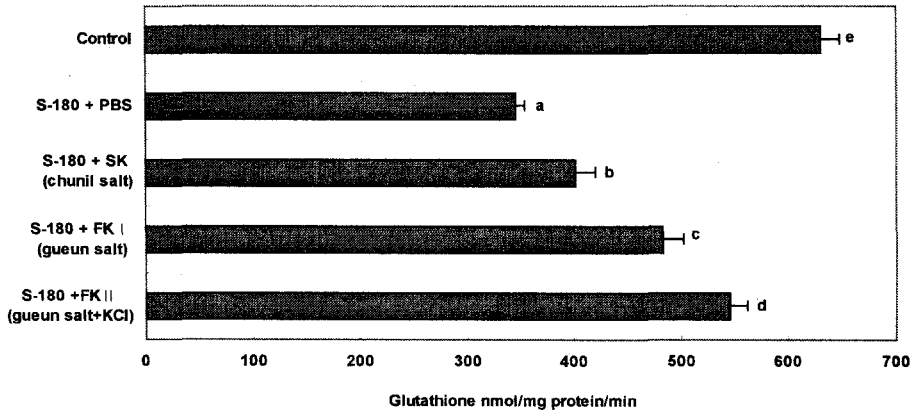


Fig. 3-29. Effect of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the activities of hepatic cytosolic glutathione S-transferase in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice SK ; Standardized kimchi, FK : Functional kimchi

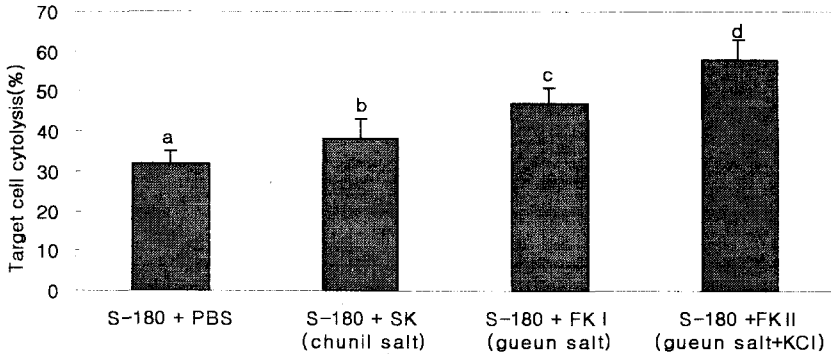


Fig. 3-30. The influence of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the naturalkiller(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes (SK ; Standardized kimchi, FK ; Functional kimchi)

4) 조직학적 관찰과 glycogen 분포

앞의 항암 실험 마우스의 간을 적취하여 간의 조직학적 관찰 및 간내의 glycogen 분포도를 측정하였다. 정상군 간은 정연한 간소엽 형태를 갖추고 있으나 일부 약한 혼탁종창, 지방변성, Kupffer 세포반응 등의 변화가 있었으며 대조군(S-180. 처리군)에서 이러한 조직학적 변화가 현저히 증가할 뿐아니라 국소적괴사, 호산성 세포, 농염된 핵을 가진 세포도 관찰되었다. 대조군에 비해 표준화김치 처리군은 Kupffer 세포변화, 지방변성, 국소적 괴사가 줄어들었으며 이와 함께 항암 기능성김치 I 과 II 투여군은 수포성변성도 줄어들었다(Table 3-35, Fig. 3-31). Glycogen 분포는 정상군에 비해 대조군의 간소엽주변구역과 중간구역에서 감소하는데 표준화김치 투여군은

대조군과 유사한 반면 항암 기능성김치 I 과 II 투여군에서 다소 회복되었다(Table 3-36).

Table 3-35. Histological findings in the liver of mouse

Group \ HC	CS	FC	KC	FN
Normal	+	++	+	0-+
S-180+PBS(Control)	++	+++	+++	++
S-180+SK ¹ (Chunil salt)	++	++++	++++	+
S-180+FK ² I (Gueun salt)	+	++++	++	+
S-180+FK II (Gueun salt+KCl)	+	++++	++	+

HC, histological changes: CS, cloudy swelling; FC, fatty change; KC, Kupffer cell reation; FN, focal necrosis

0-+++ indicate the relative changes of the histological finding : 0, faint and negligible; +, weak; ++, moderate; +++, severe. ¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

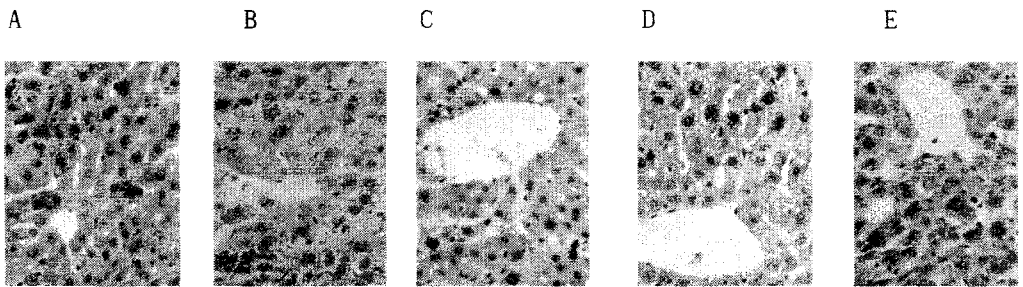


Fig. 3-31. Histological changes in the liver of mouse with H-E stain(×400)

A: normal group, B: control group, C: standardized kimchi treated group, D: functional kimchi I treated group, E: functional kimchi II treated group

Table 3-36. Glycogen distribution in the liver of mouse

Group	PZHL	IZHL	CZHL
Normal	+++	++++	++
S-180+PBS(Control)	++	++	++
S-180+SK ¹ (Chunil salt)	++	++	++
S-180+FK ² I (Gueun salt)	++++	++++	++
S-180+FK II (Gueun salt+KCl)	+++	+++	++

PZHL, peripheral zone of hepatic lobule; IZHL, intermediate zone of hepatic lobule; CZHL, central zone of hepatic lobule. 0-+++ indicate the relative intensity of the reaction : 0, faint and negligible; +, weak; ++, moderate; +++, intense. ¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

5) 종양관련 단백질에 대한 면역조직화학

간세포에 대한 종양관련 단백질의 면역조직화학적 반응을 보면 6가지 항체 중 Bax, Rb, c-fos 에만 반응을 나타내며 세포질에 비해 핵에서 강한 반응을 보였다. 정상군

에서 Bax는 대부분의 핵에서, Rb와 c-fos는 대부분의 핵과 일부 간세포주변구역과 중심정맥주변구역 세포에서만 반응하였다. 정상군과 대조군의 핵에서 염색성은 유사하였으나 Rb와 c-fos는 일부 문맥주변구역과 중심정맥주변구역 세포에서 증가하였으며 대조군과 표준화김치, 항암기능성 김치 I 과 II 투여군 사이의 현저한 염색성 차이는 없었다. 그러나 이러한 염색성은 특히 염증세포로 생각되는 세포집단에 강하게 나타나는데 관찰되는 부위는 대조군에 비해 표준화김치, 항암 기능성김치 I 과 II 투여군에서 적게 관찰되었다(Table 3-37).

Table 3-37. Distribution of tumor related protein-immunoreactivity in the hepatocytes of mouse

Group	Region\Antibody	Bax*	Bcl-2	Rb*	c-jun	c-fos*
Normal	Nucleus	++++	0	+++	0	+++
	Cytoplasm	0	0	0	0	0
S-180+PBS	Nucleus	++++	0	+++	0	+++
	Cytoplasm	0	0	0>+	0	0>+
S-180+SK ¹ (Chunil salt)	Nucleus	++++	0	+++	0	+++
	Cytoplasm	0	0	0>+	0	0>+
S-180+FK ² I (Gueun salt)	Nucleus	++++	0	+++	0	+++
	Cytoplasm	0	0	0>+	0	0>+
S-180+FK II (Gueun salt+KCl)	Nucleus	++++	0	+++	0	+++
	Cytoplasm	0	0	0>+	0	0>+

>, found in most part; +, +++, very strong; *, Cell massed sites showing very strong immunoreactivity were observed in these staining and more numerous sites were detected in the control group as compared with other groups. Abbreviations are listed in Table 3-36.

¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

조직학적관찰에서 정상군에 비해 대조군(S-180처리군)은 많은 간세포 변화를 보여 간손상의 정도를 알 수 있으며 표준화김치, 항암 기능성김치 I 과 II 투여군에서도 이와 유사한 변화를 보이나 대조군에 비해 많이 감소되었다. 특히 항암 기능성김치 I 과 II 투여군은 혼탁종창과 Kupffer 세포변화 차이가 현저하여 inoculated tumor 에 대한 간기능손상에 상대적인 완화를 알 수 있다.

Tumor associated protein에 대한 면역조직화학적 염색은 전 군에 걸쳐 핵에 대한 반응은 유사하나 정상군과 대조군의 세포질에 대한 Rb와 c-fos 반응이 대조군의 일부 간세포 세포질와 차이를 보였다. 그러나 대조군과 표준화김치, 항암 기능성김치 I 과 II 투여군에서의 차이는 없었으며 단지 이들 염색이 국소적괴사로 유추되는 부분에 강하게 반응하는데, 염색 부위가 대조군에서 가장 많고 김치시료 투여군에서 줄어들었다.

이상으로 보아 종양세포를 이식한 마우스의 간기능을 조직학적으로 관찰해 보았을 때 항암 기능성김치 I 과 II 투여군에서 변화가 두드러져 간기능에 대한 회복을 알 수

있었다. 그러나 면역조직화학적 관찰에서 현저한 회복정도를 관찰할 수 없었으나 일부 국소적 괴사로 여겨지는 강한반응을 나타내는 부위에 대한 보다 깊은 관찰이 요구되며 또한 간이 아닌 inoculated tumor 자체에 대한 growth arrest 및 apoptosis 등 직접적 관찰이 보다 의미가 있으리라 사료된다. 이 실험 결과에서 보듯이 간의 조직학적 실험에서도 항암 기능성김치 I 과 II는 그 효과가 확인되었다.

마. 고춧가루를 조절한 암예방 김치 제조: 소비자 기호도 조사

1) 항암 김치의 제조

항암 기능성김치II에서 고춧가루의 함량을 5%로 하고, 붉은 고춧가루의 색을 줄이고 고추씨의 항암성을 강조시키기 위해 고추의 종자와 과피의 비율을 7 : 3로 조정하고 고춧가루를 이용한 항암 기능성김치를 15℃에서 적숙기(pH 4.3)까지 발효시켜 시판(종가집) 김치와 비교하여 김치별 선호도 조사를 하였다.

2) 항암 기능성 김치와 시판김치의 관능검사 결과

관능검사는 부산시 동래에 위치한 국제요리학원 수강생 190명을 대상으로 실시하였다. 먼저 개인별 성향을 조사하고 항암 김치와 시판 종가집 배추(포기)김치를 비교하여 선호도를 조사하였고 항암 김치 개발을 위한 기초 연구로 몇 가지 사항에 대하여 설문조사를 실시하였다.

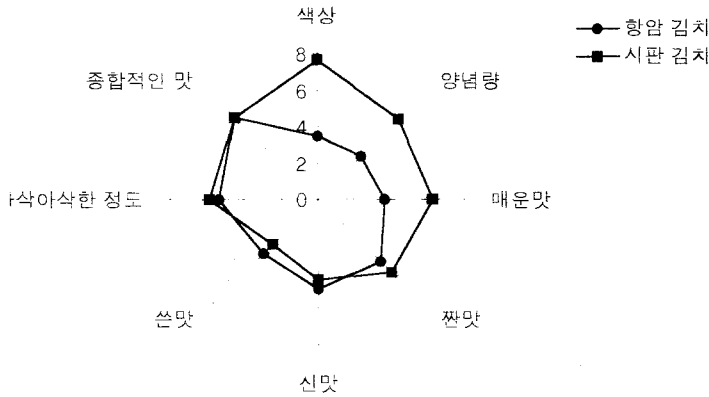
가) 개인별 성향조사결과

응답자의 연령비는 20대가 60%로 가장 많았고 그 외에도 30, 40대가 각각 22%, 16%를 차지했다. 남녀 비율은 여자가 80%, 남자가 20%로 여자가 대부분을 차지하였으며, 출신지별 분포는 부산이 73%로 대부분을 차지하였다. 매끼 김치 섭취량은 30g이 99명으로 응답자의 53%로 가장 높게 나타났으며 이것으로 보아 대부분의 사람들이 1일 100g전후로 김치를 섭취함을 알 수 있었다. 김치숙성 선호도조사는 적당히 익은 김치(pH 4.3)를 가장 선호하였고 그 외에도 갓 담은 김치와 푹 익은 김치에도 26, 12%의 약간의 선호도를 나타내었다. 매운맛 선호도는 조금 매운것과 보통 매운것에 대한 선호도가 가장 높았고 아주 매운것과 맵지 않은 것에는 선호도가 낮게 나타났다.

나) 김치별 선호도 조사 결과

항암 김치와 시판 종가집 배추(포기)김치를 9점 평점법(1점: 대단히 싫음, 5점: 싫지도 좋지도 않음, 9점: 대단히 좋음)으로 선호도를 조사하였다. 색상에서 종자(7) : 과피(3)의 비율로 담은 항암 김치가 3.47점으로 선호도가 가장 낮았고, 이는 항암 김치가 종자가 많아서 붉은 색이 상대적으로 적어 양념양이 적다(3.37)고 느끼는 것으로 나타났다. 매운맛은 시판(종가집)김치가 6.28점이었고 항암 김치는 3.69점으로 낮게 나타나 환자를 위해 의도한 바였으며, 환자를 위해 짠맛은 모두 5점에 가까운 점수를 얻어 적당하다고 생각되어지며, 쓴맛에서 항암 김치는 4.12점으로 KCI에 의한 쓴맛은 크게 감지하지 못하는 것 같았다. 아삭한 정도는 강하지도 약하지도 않다고

나타난 것으로 보아 아삭한 정도는 적당하다고 생각되었다. 종합 평가면에서 시판(종가집) 김치가 6.90점으로 가장 좋은 선호도를 나타냈고, 향암 김치는 4.14점으로 다소 낮은 값을 나타내었다. 시판 김치가 가장 높은 선호도를 나타낸 것은 적당량의 조미료를 첨가하여 조미료에 어느정도 길들여진 사람들의 입맛에 부합한 것으로 생각되었고, 향암 김치가 낮은 값을 나타낸 이유는 색상과 양념양, 매운 맛에 낮은 값을 얻어 종합적 평가에서도 낮은 값을 나타내었다고 생각되어진다.



다) 설문조사 결과

기능성 김치에 대한 일반적인 설문조사에서 기능성 김치에 대한 생각은 과학적 근거가 있다면 믿을 수 있다가 63%로 가장 높았고, 믿을 수도 있다가 35%로 일반인들이 기능성 김치에 대해 많은 관심이 높다고 생각되어진다. 만약 당신이 암환자라면 당신은 김치를 먹겠느냐는 질문에 대해서 93%가 먹겠다고 하였으며 소화기계통의 위암이나 대장암환자의 경우라도 먹겠느냐는 질문에는 응답자의 71%가 먹겠다고 응답한 것으로 보아 한국인의 식생활에서 김치는 중요한 위치를 차지함을 확인할 수 있었으며 암예방 김치 및 향암김치의 연구 개발은 꼭 이루어져야겠다고 생각되어진다. 암환자가 김치를 드시기 어려우시다면 어떤 면을 개선하는 것이 좋겠느냐는 질문에는 짠맛과 매운맛을 줄였으면 하는 응답이 가장 많았고 향암효과가 있는 부재료의 첨가를 요하는 의견도 많았다. 그러나 신맛과 고춧가루를 안 넣음의 의견은 매우 낮은 것으로 보아 김치는 앞에서의 알맞게 익은 김치를 선호하는 것과 같은 결과를 나타냈고 고춧가루가 없거나 적은 김치는 사람들이 선호하지 않는 것 같았으며 이는 종자(7) : 과피(3)인 김치가 고춧가루가 적게 들어간 듯이 보여서 종합적인 평가에서 낮은 값을 나타낸 것과 연관성이 있다고 생각되어진다. 이상의 설문조사결과를 토대로 하여 암환자들이 선호할 수 있는 향암김치의 개발 범위를 설정하면 먼저 맛은 일반 김치와 비슷한 맛을 낼 수 있어야 하며 만약 맛이 떨어진다 하여도 20%이하의 범위 내에서 개발해야겠고, 유리병 등 내부가 투명하게 보이는 용기에 담아서 대형할인매장을 이용하여 판매하는 것이 바람직한 것으로 여겨지며, 암환자를 위한 향암김치는 짠맛과

매운 맛을 줄이고 식미가 날 수 있도록 고춧가루를 첨가하고 항암효과가 있는 다양한 부재료를 좀 더 첨가하여 적당히 익은 김치를 시판하는 것이 좋을 것 같다.

바. 암환자 설문조사 및 암환자 김치 개발

1) 암환자의 김치에 대한 선호도 조사 결과

가) 조사기간 : 2000. 01. 17-31

조사기관 : 동아대 의과대학

나) 조사결과

(1) 성별

	남자	여자	소계
응답수(명)	33	30	63
비율(%)	52%	48%	100%

(2) 연령

	20대	30대	40대	50대	60대	소계
응답수(명)	0	8	10	20	24	62
비율(%)	0%	13%	16%	32%	39%	100%

(3) 진단명

	위암	대장암	유방암	난소암	식도암	소계
응답수(명)	40	13	5	2	1	61
비율(%)	66%	21%	8%	3%	2%	100%

(4) 김치 섭취량

	거의 매끼	하루한끼	가끔	먹지 않음	무응답	소계
응답수(명)	27	18	7	11	0	63
비율(%)	43%	29%	11%	17.5%	0%	100%

(5) 섭취하는 김치 종류

	배추김치	백김치	물김치	동치미	열무물김치	깍두기	갓김치	파김치	기타	소계
응답수	51	12	11	6	2	1	1	3	1	88

(6) 항암김치에 고춧가루 사용여부

	많이	보통	소량	넣지않음	고추씨	피망사용	무응답
응답수(명)	6	27	24	3	0	1	2
비율(%)	10%	43%	38%	5%	0%	2%	3%

(7) 항암김치에 소금 사용 농도

	보통 맛(명)	비율(%)	싱겁게(명)	비율(%)	소계	무응답(명)
일반소금	10	16%	18	29%	28	2
구운소금	15	24%	18	29%	33	
소계	25	40%	36	57%	63	

(8) 부재료 사용여부

	미나리	마늘많이	부추	버섯	청갓	갓
응답수(명)	30	28	18	14	12	14

	인삼	키토산	적갓	녹차	솔잎	기타(굴)
응답수(명)	10	8	6	4	4	1

(9) 항암김치 구입여부

	예	아니요	무응답	소계
응답수(명)	53	9	1	63
비율(%)	84%	14%	2%	100%

(10) 구입 안하는 이유

- ① 맛이 비슷할 것 같아서 (1명)
- ② 집에서 직접 담궈 먹음 (5명)
- ③ 김치를 좋아하지 않음 (2명)
- ④ 기호가 달라서 (1명)

(11) 맛에 상관없이 구입

	예	아니요	무응답	소계
응답수(명)	36	24	3	63
비율(%)	57%	38%	5%	100%

2) 건진센터 일반 환자의 김치에 대한 선호도 조사 결과

가) 조사기간 : 2000. 01. 17-22

조사기관 : 동아대 의과대학

나) 조사결과

(1) 성별

	남자	여자	소계
응답수(명)	59	37	96
비율(%)	61%	39%	100%

(2) 연령

	20대	30대	40대	50대	60대이상	소계
응답수(명)	6	31	31	27	1	96
비율(%)	6%	32%	32%	28%	1%	100%

(3) 섭취하는 김치종류

	배추김치	백김치	물김치	동치미	열무물김치	깍두기	갓김치
응답수(명)	88	3	6	8	2	19	6

	부추김치	파김치	기타	무응답	소계
응답수(명)	1	1	0	0	134

(4) 항암김치에 고춧가루 사용여부

	많이	보통	소량	넣지않음	고추씨	무응답	소계
응답수(명)	42	36	14	2	2	0	96
비율(%)	44%	38%	15%	2%	2%	0%	100%

(5) 항암김치에 소금 사용 농도

	보통 맛(명)	비율(%)	싱겁게(명)	비율(%)	소계
일반소금	29	31%	12	13%	41
구운소금	38	41%	14	15%	52
소계	67	72%	26	28%	93

(6) 부재료 사용여부

	미나리	마늘	버섯	부추	인삼	갓	솔잎
응답수(명)	38	36	26	25	18	25	11

	키토산	청각	적갓	초피	녹차
응답수(명)	10	8	5	1	11

(7) 항암김치 구입여부

	예	아니요	무응답	소계
응답수(명)	79	17	0	96
비율(%)	82%	18%	0%	100%

(8) 구입 안하는 이유

- ① 집에서 직접 담귀 먹음 (2명)
- ② 비쌀 것 같아서 (2명)
- ③ 김치의 향암성에 대한 신뢰 부족 (1명)
- ④ 위생상태에 대한 신뢰 부족 (1명)

(9) 맛에 따른 구입여부

	예	아니요	무응답	소계
응답수(명)	34	57	5	96
비율(%)	35%	59%	5%	100%

다) 분석결과

암환자와 건강인 사이의 향암기능성 김치의 구매에 대한 차이를 분석한 결과는 아래와 같다.

(1) 구매여부에 관한 분석결과

구분	환자	건강인	계
구매	53(33.3)[84%]	79(49.7)[82%]	132(83.0)
비구매	10(6.3)[16%]	17(10.7)[18%]	27(17.0)
계	63(39.6)[100%]	96(60.4)[100%]	159(100.0)

Frequency Missing = 1

빈도표를 보면 환자나 건강인 모두 향암김치의 구매를 선호하는 것을 볼 수 있다. 다만 기존의 생각과는 달리 정상인과 암환자와 비슷하게 높은 구매의사를 가지고 있는 것으로 나타났다.

(2) 맛이 떨어질 경우 구매의사 차이 분석결과

구분	환자	정상인	계
구매	36(23.68)	34(22.37)	70(46.05)
비구매	25(16.45)	57(37.50)	82(53.95)
계	61(40.13)	91(59.87)	152(100.0)

Frequency Missing = 8

빈도표를 살펴보면, 환자의 경우 맛이 떨어지더라도 구매하겠다는 의사를 보인 반면, 정상인의 경우 맛이 떨어질 경우 구매하지 않겠다고 응답한 사람의 수가 높음을 볼 수 있다. 이는 정상인의 경우, 김치의 맛이 구매에 있어 중요한 요인임을 시사한다고 하겠다.

분석결과 카이값이 6.892로서 유의수준 1%에서 정상인과 환자 사이에는 맛의 차이

로 인한 구매의사에 매우 유의적인 차이가 있다고 할 수 있다.

(3) 암치료용 음식을 섭취하고 있을 경우 구매의사 차이 분석결과

구분	환자	정상인	계
구매	33(21.43)	7(4.55)	40(25.97)
비구매	29(18.83)	85(55.19)	114(74.03)
계	62(40.26)	92(59.74)	154(100.0)

Frequency Missing = 6

빈도표를 살펴보면 역시 앞의 경우와 비슷하게 환자의 경우 암치료용 음식을 섭취하고 있을 경우에도 구매를 선호하는 반면, 정상인의 경우 거의 구매하지 않겠다고 응답한 것을 볼 수 있다. 따라서 환자와 정상인 사이에 뚜렷한 차이가 존재함을 볼 수 있다.

분석결과 카이값이 40.086으로서 유의 수준 1%에서 암치료용 음식을 섭취하고 있는 경우 환자와 정상인 사이에 구매의사에 있어서 매우 유의적인 차이가 있다고 할 수 있다. 즉, 환자의 경우 비록 다른 암치료용 음식을 섭취하고 있는 경우라 하더라도 기꺼이 항암효과가 있는 김치를 구매할 의사가 있는 반면, 건강인의 경우 거의 절대 다수가 다른 암치료용 음식을 섭취하고 있는 경우 김치 구매의사가 없다는 것을 의미한다. 따라서 다른 암치료용 음식의 섭취여부는 건강인에 있어서 항암김치의 구매여부에 핵심적인 역할을 할 것이라고 생각할 수 있다.

3) 발병 전 식습관과 발병 후 식습관의 차이를 분석

가) 짠 음식, 밀반찬, 젓갈류, 장아찌, 자반 등의 섭취 횟수의 변화

구분	발병 전	발병 후	계
매일	11. (8.53)	0(0.00)	11(8.53)
가끔	37(28.68)	16(12.40)	53(41.09)
거의 먹지 않음	17(13.18)	48(37.21)	65(50.39)
계	65(50.39)	64(49.61)	129(100.0)

Frequency Missing = 1

빈도표를 보면 발병 전 매일 짠 음식을 섭취하던 사람이 11명(8.53%)이었으나 발병 후 전혀 섭취하지 않는 것으로 나타났으며 발병 전 가끔 짠 음식을 섭취하던 사람도 37(29%)에서 16명(12%)로 급감하고 있음을 볼 수 있다. 반면에 발병 후 짠 음식을 거의 먹지 않는 사람이 48명(37%)으로서 사람들이 발병 후 짠 음식의 섭취를 급격히 줄이는 것을 알 수 있다.

분석결과 카이값이 34.1로서 유의 수준 1%이내에서 짠 음식에 대한 식습관이 발병

전과 발병 후 매우 유의적인 차이가 있다고 결론 내릴 수 있다.

나) 매운 음식, 고추장, 고추 등의 섭취 횟수의 변화

구분	발병 전	발병 후	계
매일	7(5.43)	0(0.00)	7(5.43)
가끔	47(36.43)	16(12.40)	63(48.84)
거의 먹지 않음	11(8.53)	48(37.21)	59(45.74)
계	65(50.39)	64(49.61)	129(100.0)

Frequency Missing = 1

빈도표를 살펴보면 역시 짠 음식과 마찬가지로 사람들이 발병 후 매운 음식의 섭취를 급격히 감소시키고 있음을 볼 수 있다. 발병 전 가끔 매운 음식을 먹는 사람들이 가장 많았으나(47명, 36%), 발병 후 거의 먹지 않는 사람들의 수가 가장 높은 것으로 나타났다(48명, 37%).

분석결과 카이값이 45.452로서 유의 수준 1% 이내에서 매운 음식에 대한 식습관이 발생전과 발병 후 매우 유의적인 차이가 있다고 결론 내릴 수 있다. 다만 기대도수의 과소빈도 문제가 발생했으나(33% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test) Fisher의 정확검정 통계량이 0.05 이하이므로 발병에 따라 매운 음식에 대한 식습관의 차이가 있다는 결론을 내릴 수 있다. 결국 암환자는 짜고 매운 음식에 대해 발병 후 섭취횟수가 증가되기에 항암김치에서는 짜고 매운 점을 감소시키거나 그 기능성의 과학적 근거를 제시하는 것이 필수적이라 하겠다.

4) 암환자의 기호도 조사결과를 이용한 항암김치 제조 개선 연구

김치제조시 소금은 본 연구에서 연구한 바대로 구운소금, KCl소금, 또는 혼합죽염 소금 등을 사용하면 오히려 항암효과를 나타낼 수 있으므로 최종 염농도는 2.5%로 고정하고 고춧가루의 농도를 암예방 김치의 7%에서 5%, 또는 최종 2.5%로 낮추고 대신 마늘과 갖의 농도를 증가시켜 항암김치를 제조하였다. 실험용으로 제조된 김치들의 레시피는 Table 3-38에 나타낸 바와 같다.

가) 이화학적 실험

그러나 일반적으로 Table 3-39에서 보는 바와 같이 고춧가루의 양을 감소시킨 경우 외관과 종합적인 선호도가 많이 감소되었다. 그중 고춧가루를 감소하고 마늘과 갖을 증가시킨 김치(GM kimchi)가 고춧가루 농도를 줄인 시료 중에서는 가장 좋았다.

Table 3-38. The ingredients ratio of various kinds of kimchi(g)

Ingredient	S kimchi	A kimchi	Ga kimchi	MI kimchi	GM kimchi	AGM kimchi
Korean cabbage	100*	100*	100**	100**	100**	100**
Red pepper powder(RPP)	3.5	5.0	2.5	2.5	2.5	5.0
Crushed garlic	1.4	2.8	5.3	2.8	4.05	4.05
Crushed ginger	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Anchovy juice	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Sugar	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Radish	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0
Green onion	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mustard leaf(MI)		5.0	5.0	7.5	6.25	6.25
Chinese pepper		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Final salt concentration	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

*Common Korean cabbage **Organically cultivated Korean cabbage kimchi
 S-standardized kimchi, A kimchi-cancer preventive kimchi, Ga kimchi-A kimchi-low RPP+high garlic,
 MI kimchi-A kimchi+low RPP+high MI, GM kimchi-A kimchi+low RPP+high garlic+ high MI, AGM kimchi-A
 kimchi+high garlic+high MI

Table 3-39. QDA profile1) of various Korean cabbage kimchi fermented at 15°C after 5 days

	Apperance	Sour smell	Moldy smell	Green smell	Sour flavor	Moldy flavor	Green flavor	Hardness	Overall acceptability
S kimchi*	5.0	6.8	3.4	1.0	6.7	3.1	1.0	4.5	5.2
A kimchi	6.3	5.5	1.6	2.0	5.5	2.1	1.0	6.2	7.0
Ga kimchi	4.1	4.3	1.3	1.5	4.5	1.7	1.5	4.7	4.8
MI kimchi	4.9	4.9	1.6	3.4	4.7	1.8	3.1	6.5	5.2
GM kimchi	5.5	4.7	1.5	1.8	4.6	1.8	1.6	6.3	5.9
AGM kimchi	6.3	4.9	1.5	1.5	4.8	1.2	1.3	6.3	7.2

*The abbreviations are same as in Table 3-38

1) Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely bad, 9-extremely good in subjective evaluation(apperance, overall acceptability), and and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluation(sour smell, moldy smell, Green mell, sour flavor, moldy flavor, Green flavor and hardness)

일반배추로 담은 S가 A김치에 비하여 유기배추로 담은 김치들의 향돌연변이 효과가 더 높았고 고춧가루의 감소된 양만큼 갖을 첨가한 김치(MI kimchi)가 81%의 높은 향돌연변이 효과를 보였고 그 다음이 고춧가루 5% 그리고 마늘와 갖을 더 첨가한 김치가 높은 향돌연변이성을 보였다(Table 3-40). 암환자의 경우는 맛보다도 향암 기능이 더욱 중요하기에 적당한 맛의 유지와 함께 환자에게 거부감이 없는 것이 중요하다. 즉 고춧가루를 2.5%로 낮추고 소금은 암예방 김치에 사용되었던 KCl 혼합죽염(NaCl :KCl=3:7)을 사용하여 소금의 함량(2.2%)을 줄이고 젓갈을 첨가하지 않은 김치 레시피로 최종 향암김치를 제조하였다.

Table 3-40. Antimutagenic effect of methanol extract from various kinds of kimchi against Aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate(level of sample, μ g/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous Control(AFB ₁)	123 \pm 6 1320 \pm 23	
S <i>kimchi</i> *	1084 \pm 9(20)**	838 \pm 9(40)
A <i>kimchi</i>	887 \pm 7(36)	715 \pm 12(51)
Ga <i>kimchi</i>	685 \pm 13(53)	518 \pm 9(67)
Ml <i>kimchi</i>	458 \pm 15(72)	357 \pm 6(81)
GM <i>kimchi</i>	728 \pm 8(50)	506 \pm 13(68)
AGM <i>kimchi</i>	551 \pm 11(64)	402 \pm 12(77)

*The abbreviations are same as in Table 3-38

**Inhibition rate

인체위암세포를 이용한 MTT test와 Growth inhibition test 항암효과에서도 갖과 마늘을 많이 첨가한 김치가 고춧가루가 많은 암예방김치보다 더 높은 항암효과를 보였다(Table 3-41, 3-42).

Table 3-41. Inhibitory effect of methanol extract from various kinds of Kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl- thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, μ g/assay)	
	100	200
Control	0.903 \pm 0.010	1.042 \pm 0.006
S <i>kimchi</i> *	0.471 \pm 0.009 (48)**	0.302 \pm 0.011 (67)
A <i>kimchi</i>	0.328 \pm 0.013 (64)	0.255 \pm 0.006 (76)
Ga <i>kimchi</i>	0.294 \pm 0.008 (68)	0.214 \pm 0.009 (80)
Ml <i>kimchi</i>	0.234 \pm 0.006 (74)	0.150 \pm 0.007 (86)
GM <i>kimchi</i>	0.281 \pm 0.010 (69)	0.215 \pm 0.008 (79)
AGM <i>kimchi</i>	0.250 \pm 0.005 (72)	0.186 \pm 0.008 (82)

*The abbreviations are same as in Table 3-38

**Inhibition rate

Table 3-42. Growth inhibition effect of methanol extracts from various kinds of Korean cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cell after 6days of incubation at 37 $^{\circ}$ C

Sample(50 μ g/ml)	Cell number($\times 10^4$ /ml)	Inhibition rate(%)
Control	76.0 \pm 2.7	
Control	37.6 \pm 2.7	50.6
S <i>kimchi</i> *	23.7 \pm 2.1	69.9
A <i>kimchi</i>	20.3 \pm 0.6	73.7
Ga <i>kimchi</i>	13.0 \pm 1.7	82.9
Ml <i>kimchi</i>	19.7 \pm 1.5	74.1
GM <i>kimchi</i>	16.7 \pm 2.1	78.1

*The abbreviations are same as in Table 3-38

사. 향암 배추김치의 제조 및 유통 연구

표준화배추김치와 향암김치를 담귀 10℃에서 4가지 포장용기를 이용하여 발효시키면서 이화학적 실험을 행하였다. 포장용기는 유리용기, 플라스틱 투명용기, Mirafresh 용기, 알루미늄 포장지(가스흡입제포함)를 이용하였다.

1) 포장용기를 달리하여 발효한 표준화 배추김치의 이화학적 변화

pH의 경우 4일까지는 포장용기에 따른 차이가 보이지 않았으나 발효가 진행될수록 Mirafresh 용기와 알루미늄 포장지(가스흡입제 포함)에서 발효가 더디게 일어남을 알 수 있었다. 산도에서도 동일하게 Mirafresh 용기와 알루미늄 포장지(가스흡입제 포함)에서 낮게 나타나 발효를 지연시켜 보존성이 높아진 것으로 사료된다.

Lactobacillus sp.는 발효가 진행됨에 따라 증가하였고 특히 유리용기에서 전반적으로 많이 자랐다. 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp.도 유리용기와 플라스틱 용기에서 많이 자랐다.

2) 포장용기를 달리하여 발효한 향암 배추김치의 이화학적 변화

pH의 경우, 알루미늄 포장지(가스흡입제 포함)에서 pH가 서서히 낮아져 발효가 서서히 진행됨을 알 수 있었다. 산도의 경우, 유리용기에서 가장 빨리 높아져 발효가 빠르게 진행된 반면 알루미늄 포장지(가스흡입제 포함)는 서서히 높아져 발효가 더디게 진행되는 것으로 여겨지며 이는 pH의 결과와 동일하였다.

Lactobacillus sp.는 발효가 진행됨에 따라 유리용기에서 가장 많이 자랐으며, *Leuconostoc* sp.는 유리용기와 Mirafresh 용기에서 가장 많이 자랐다.

유리용기와 플라스틱용기의 경우 균수는 많이 자라게 하는 특징이 있으나 발효가 다소 빠르게 진행되었다. 반면 Mirafresh 용기와 알루미늄 포장지(가스흡입제 포함)에서는 균수는 다소 적게 자랐지만 발효를 지연시켜 보존성을 증진시키는 특징을 보였다.

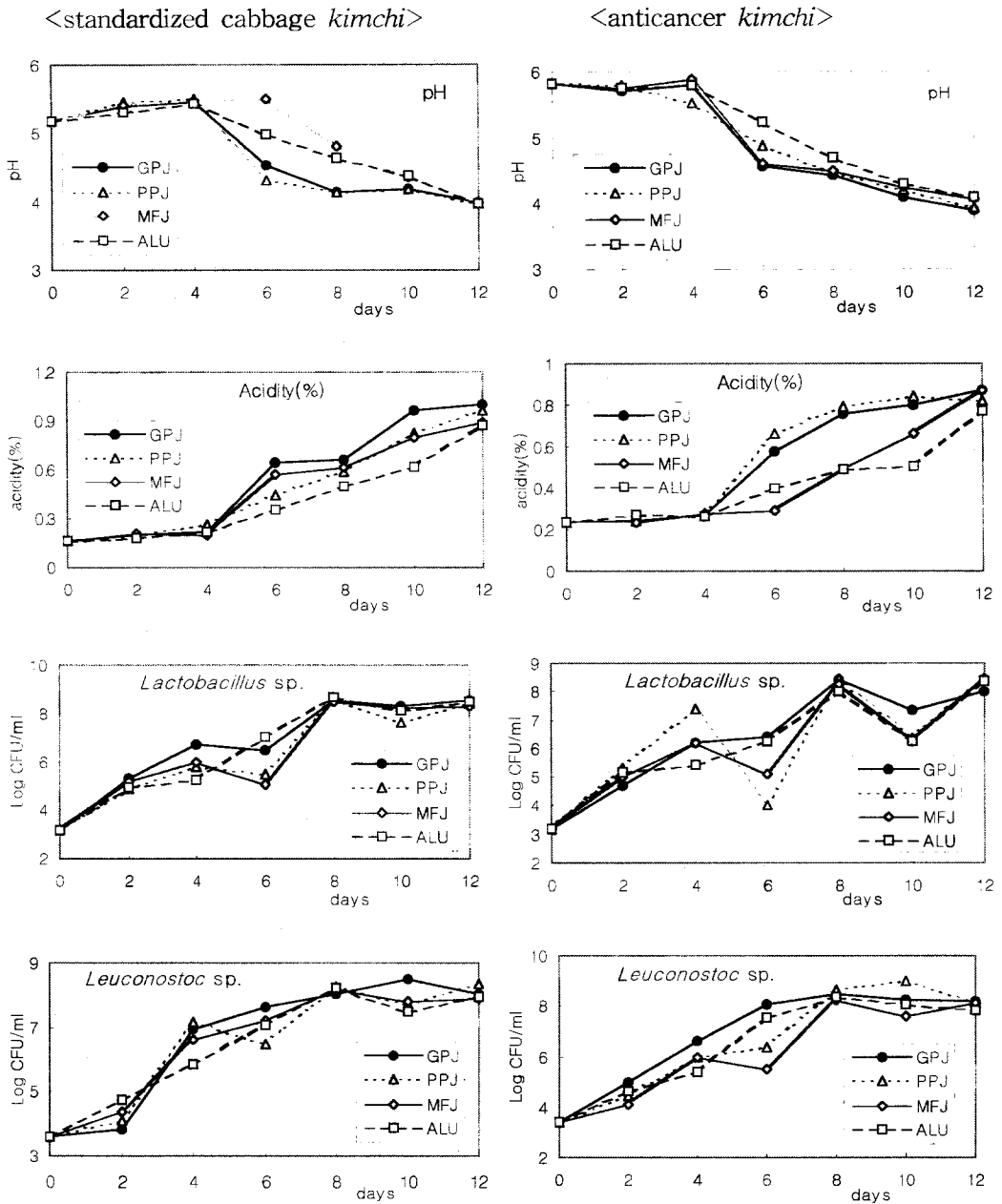


Fig. 3-32. pH, acidity, *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. of standardized cabbage kimchi and anticancer kimchi that fermented at 10°C
 GPJ: glass pint jar,
 PPJ: plastic pint jar,
 MRJ: mirafresh jar,
 ALI: aluminium-Ca+(OH)₂

4. 녹차첨가김치(암예방 기능성 김치VI)의 항암활성 측정

가. 녹차첨가 배추김치의 *in vitro* 항암성 증진효과

앞의 암예방 실험에서 녹차첨가가 암예방 효과가 컸기에 본래의 표준화 김치에 녹차를 2% 첨가한 암예방 김치를 제조하였다. AGS 인체 위암세포를 seeding하고 녹차첨가배추김치 즙액을 처리하면서 6일간에 배양한 후 암세포를 계수하여 성장억제효과를 검토한 결과 5 μ l/ml의 농도에서 일반배추김치가 42.7%의 저해효과를 보인 반면 일반배추김치에 2% 또는 4% 녹차첨가군이 각각 54.8%와 65.1%로 저해율의 증가가 있었으며 고춧가루와 마늘의 양을 늘리고 갓과 초피를 첨가한 kimchi(II)의 레시피를 이용하여 담근 일반 배추 김치에 녹차2, 4%군들의 저해율은 각각 59.6%와 69.3%였다. 또한 유기배추와 kimchi(II)의 레시피에 녹차를 각각 2, 4% 첨가하여 담근 김치의 저해율은 62.1%와 74.3%로 유기배추와 kimchi(II)의 레시피를 이용하여 제조한 김치에 녹차의 첨가량이 증가할수록 항암효과가 증진되는 것을 알수 있었다(Table 3-43).

Table 3-43. Inhibitory effects of control kimchi and various amounts and types of green tea added kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Sample		Cell number($\times 10^4$)	Inhibition rate(%)
Control		55.3 \pm 1.5	
C kimchi(I)		42.8 \pm 3.1	42.7
CK kimchi(I) with green tea	2%	25.0 \pm 1.0	54.8
	4%	19.3 \pm 1.5	65.1
OK kimchi(I) with green tea	2%	24.0 \pm 1.7	56.6
	4%	18.3 \pm 2.1	66.9
CK kimchi(II) with green tea	2%	22.3 \pm 2.5	59.6
	4%	17.1 \pm 1.0	69.3
OK kimchi(II) with green tea	2%	11.0 \pm 1.0	62.1
	4%	14.2 \pm 1.7	74.3

AGS 인체 위암세포를 이용하여 녹차첨가배추김치 즙액에 대한 MTT assay를 이용하여 검토한 결과 김치 즙액중 녹차 4%를 첨가하고 유기배추와 kimchi(II)레시피를 이용하여 제조한 김치가 가장 높은 암세포성장억제효과를 보였다. 또한 일반배추에 녹차4%를 첨가하여 kimchi(II)레시피로 제조한 김치도 높은 억제효과(82%)를 보였기에 상대적으로 구하기 힘든 유기배추를 일반배추로 대체하여 녹차 첨가김치를 제조하여도 항암활성이 증진되는 것을 관찰할수 있었다(Table 3-44).

나. 녹차첨가 배추김치의 *in vivo* 항암성 증진 효과

마우스에서의 항종양효과를 살펴보기 위해 sarcoma-180 cell을 마우스의 서혜부에 이식한 후 김치 samples을 매일 1회씩 20일간 복강투여한 실험에서 종양의 무게를 측정해 본 결과 Table 3-45에서 처럼 대조군의 종양무게는 5.6g이었고 이에 반해 녹차

Table 3-44. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of various amounts and types of green tea added kimchi in AGS human gastric adenocarcinoma cells

Sample	OD ₅₄₀	
	5 μ l/assay	7.5 μ l/assay
Control	0.948 \pm 0.03	0.948 \pm 0.03
C kimchi(I)	0.453 \pm 0.03(52)	0.335 \pm 0.01(65)
CK kimchi(I) with green tea	2%	0.363 \pm 0.04(62)
	4%	0.312 \pm 0.05(67)
OK kimchi(I) with green tea	2%	0.322 \pm 0.06(66)
	4%	0.225 \pm 0.07(76)
CK kimchi(II) with green tea	2%	0.240 \pm 0.02(74)
	4%	0.227 \pm 0.03(76)
OK kimchi(II) with green tea	2%	0.203 \pm 0.03(79)
	4%	0.143 \pm 0.02(85)

를 투여한 김치군들의 종양 무게는 3.8, 3.9, 3.6, 3.2g으로 크기가 줄어든 것을 알 수 있었다.

Table 3-45. Antitumor activity of methanol extracts from various amounts and types of green tea added kimchi in tumor bearing Balb/c mice with sarcoma-180 cell

Sample	Tumor weight(g)	Inhibition rate(%)
S-180 + PBS	5.6 \pm 0.5 ^a	-
CK(I)	4.7 \pm 0.6 ^b	15.9
CK(I)+green tea 4%	3.8 \pm 0.3 ^c	31.3
CK(II)+green tea 2%	3.9 \pm 0.5 ^c	30.4
CK(II)+green tea 4%	3.6 \pm 0.4 ^{cd}	35.5
OK(II)+green tea 4%	3.2 \pm 0.4 ^d	42.6

그리고 비장과 혈액에서 발견되는 cytotoxic lymphocyte로 비특이적 면역계에 관여 하며, 종양세포등을 살해하는 Natural Killer(NK) cell의 활성을 살펴보기 위하여 항 종양실험을 한 마우스의 비장을 무균적으로 적출하였다. Yac-1 cell을 target cell로 하여 effector cell(NK cell)을 1:50으로 seeding하여 활성을 살펴보았을때 s-180투여군과 비교해서 녹차 첨가 김치군들의 세포파괴 활성이 증가하였다(Fig. 3-33).

항발암성 효소로 알려진 glutathione S-transferase는 대부분의 생체 전조직에 함유되어 있으며 특히 간에서 최고의 함량을 나타내고 체내 중요한 역할중의 하나는 친전자성 발암물질의 활성 대사산물을 노중으로 배설시킴으로서 해독작용을 한다. GST활성(nmol/mgprotein/min)은 종양세포를 이식하지 않은 정상군이 598.74으로 가장 높았으며 종양세포를 이식한 대조군은 395.01로 가장 낮았다. 일반배추김치는 418.93이었으며 일반배추김치(II)+녹차4%첨가군과 유기배추김치(II)+녹차4%첨가군의 값은 각각 574.4와 594.5로 거의 정상군에 가깝게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-34).

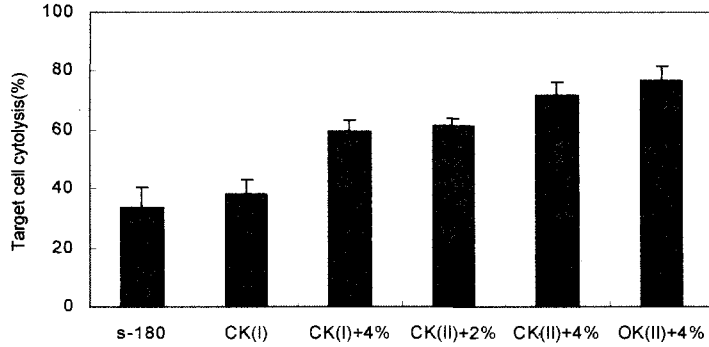


Fig. 3-33 The influence of methanol extracts from various amounts and types of green tea added kimchi on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes

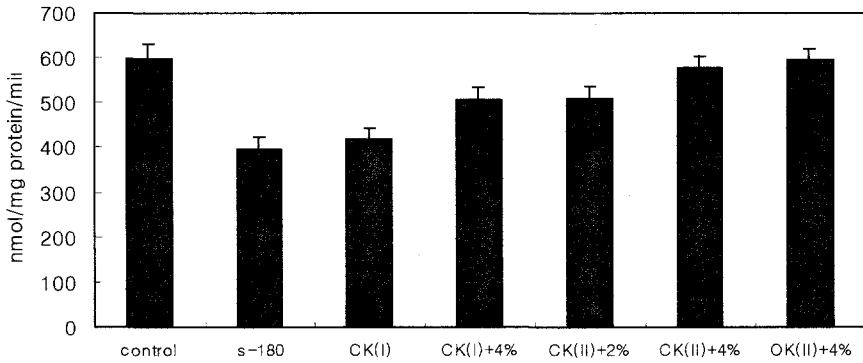


Fig. 3-34. The effect of methanol extracts from various amounts and types of green tea added kimchi on hepatic glutathione S-transferase activity in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice.

5. 암예방 부추김치의 항암활성 측정

가. 암예방 부추김치추출물의 항암효과 및 항암물질의 분리, 동정 연구

1) 암예방 부추김치의 항암효과

표준화된 부추김치를 15℃에서 발효시켜 0, 6, 9일간 발효시켜 동결건조한 메탄올 추출물을 15℃에서 4일간 발효(가장 활성이 높음)시킨 배추김치메탄올추출물과 비교하면서 AGS 인체위암세포와 HT-29인체결장암세포를 이용하여 *in vitro* 항암활성을 검토하였다.

AGS 인체위암세포를 이용한 SRB assay에서 0, 6, 9일째 부추김치메탄올추출물은 400 μ g/well 첨가농도에서 85-94%의 저해효과를 보여 대조군인 배추김치의 메탄올추출물(70%)보다 높은 저해효과를 관찰할 수 있었고(Table 3-46), 그의 MTT assay 및 암

세포성장억제효과 실험에서도 부추김치시료가 배추김치시료 보다 저해효과가 높았다. 이 연구는 1998년 4월 1일 중앙일보에 부추김치가 배추김치보다 항암효과가 높다는 내용으로 보도되었다.

Table 3-46. Inhibitory effect of the methanol extract from buchu kimchi and Chinese cabbage kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay

Treatment	OD ₅₁₀ (level of methanol extract, $\mu\text{g}/\text{assay}$)		
	100	200	400
Control	0.610		
0 day buchu kimchi	0.453(26) ¹	0.224(63)	0.038(94)
6 day buchu kimchi	0.478(22)	0.336(45)	0.090(85)
9 day buchu kimchi	0.461(24)	0.397(35)	0.078(87)
4 day Chinese cabbage kimchi	0.542(11)	0.349(42)	0.126(79)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

HT-29 인체결장암세포를 이용하여 MTT assay를 실시한 결과를 Table 3-47에 나타내었다. 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 첨가농도에서 배추김치의 메탄올추출물은 23%의 낮은 저해효과를 보였으나 부추김치의 메탄올추출물은 49-70%의 저해효과를 보였고, 400 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 첨가농도에서도 배추김치메탄올추출물은 54%의 저해효과를 보인 반면 부추김치메탄올추출물은 74-87%의 높은 저해효과를 보여 부추김치가 배추김치에 비해 더 높은 *in vitro* 항암효과를 보임을 알 수 있었다.

Table 3-47. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of the methanol extract from buchu kimchi and Chinese cabbage kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells

Treatment	OD ₅₄₀ (level of methanol extract, $\mu\text{g}/\text{assay}$)		
	100	200	400
Control	0.753		
0 day buchu kimchi	0.227(70) ¹	0.173(77)	0.158(79)
6 day buchu kimchi	0.299(60)	0.154(80)	0.100(87)
9 day buchu kimchi	0.381(49)	0.241(68)	0.190(74)
4 day Chinese cabbage kimchi	0.581(23)	0.419(44)	0.341(54)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 3-48은 부추김치추출물과 분획물이 AGS 인체 위암세포의 증식에 미치는 효과를 MTT assay를 이용해 검토한 것이다. 추출물 중에서는 탈지한 메탄올추출물이 높은 위암세포 성장억제효과를 보였다. 또 분획물들 중에서는 디클로로메탄층과 에틸아세테이트층이 높은 암세포 성장억제효과를 보였는데 특히 디클로로메탄층은 50 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 첨가농도에서는 58%의 효과를 보였고, 100 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서는 71%의 높은 위

암세포 증식 억제효과를 관찰할 수 있었다.

Table 3-48. Inhibitory effect of fractionated samples of kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, $\mu\text{g}/\text{assay}$)	
	50	100
Control	0.805 \pm 0.02	
Methanol ext.	0.483 \pm 0.01(40) ¹	0.371 \pm 0.01(54)
Methanol soluble ext.	0.388 \pm 0.01(52)	0.324 \pm 0.01(60)
Hexane ext.	0.534 \pm 0.01(34)	0.389 \pm 0.01(54)
Dichloromethane fr.	0.341 \pm 0.03(58)	0.233 \pm 0.02(71)
Ethyl acetate fr.	0.469 \pm 0.01(42)	0.397 \pm 0.01(51)
Butanol fr.	0.649 \pm 0.02(19)	0.425 \pm 0.01(47)
Aqueous fr.	0.579 \pm 0.01(22)	0.524 \pm 0.01(35)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 3-49는 부추김치추출물과 분획물의 HT-29 인체 결장암세포에 대한 증식억제 효과를 MTT assay 살펴본 결과이다. 추출물 중에서는 탈지한 메탄올추출물이 높은 위암세포 성장억제효과를 보였다. 또 분획물들 중에서는 디클로로메탄층과 에틸아세테이트층이 높은 암세포 성장억제효과를 보였는데 역시 디클로로메탄층이 가장 효과가 좋았다.

Table 3-49. Inhibitory effect of fractionated samples of kimchi on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, $\mu\text{g}/\text{assay}$)	
	50	100
Control	0.900 \pm 0.02	
Methanol ext.	0.675 \pm 0.02(25) ¹	0.516 \pm 0.02(43)
Methanol soluble ext.	0.556 \pm 0.02(38)	0.473 \pm 0.01(47)
Hexane ext.	0.816 \pm 0.01(9)	0.744 \pm 0.03(17)
Dichloromethane fr.	0.513 \pm 0.01(43)	0.371 \pm 0.01(59)
Ethylacetate fr.	0.682 \pm 0.01(24)	0.509 \pm 0.02(43)
Butanol fr.	0.513 \pm 0.01(43)	0.478 \pm 0.01(47)
Aqueous fr.	0.698 \pm 0.01(23)	0.673 \pm 0.02(25)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 3-50은 AGS 인체 위암세포를 이용하여 부추김치의 메탄올추출물과 헥산추출물 및 분획물의 암세포 성장억제효과를 검토한 결과인데 디클로로메탄층은 0.1mg/ml의 농도에서 52%, 0.2mg/ml에서는 78%의 높은 암세포성장억제효과를 나타내었다.

HT-29 인체 결장암세포를 이용한 암세포 성장억제실험에서도 디클로로메탄층은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 51%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 65%의 높은 암세포성장억제효과를 나타내어 디클로로메탄층이 암세포증식 및 억제효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서 Ames 실험계와 암세포를 이용한 *in vitro* 항암 실험결과 김치의 메탄올추출물, 헥산추출물과 탈지한 메탄올추출물 및 분획물들 중에서 디클로로메탄층이 가장 활성이 높았으므로 이 분획물에서 활성물질을 분리 동정을 하였다(제 2장 참조).

Table 3-50. Inhibitory effect of the fractionated samples of buchu kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$

Treatment	Cells ($\times 10^4/\text{ml}$, (level of sample, $\mu\text{g}/\text{ml}$))	
	100	200
Control	58 \pm 3	
Methanol ext.	44 \pm 3(24) ¹	37 \pm 2(36)
Methanol soluble ext.	36 \pm 3(38)	35 \pm 4(40)
Hexane ext.	47 \pm 4(19)	43 \pm 4(26)
Dichloromethane fr.	28 \pm 2(52)	13 \pm 1(78)
Ethyl acetate fr.	43 \pm 2(26)	37 \pm 3(36)
Butanol fr.	46 \pm 4(21)	36 \pm 2(38)
Aqueous fr.	54 \pm 3(7)	48 \pm 2(17)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

Table 3-51. Inhibitory effect of the fractionated samples of buchu kimchi on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$

Treatment	Cells ($\times 10^4/\text{ml}$, (level of sample, $\mu\text{g}/\text{ml}$))	
	100	200
Control	49 \pm 4	
Methanol ext.	35 \pm 3(29) ¹	26 \pm 2(47)
Methanol soluble ext.	32 \pm 2(35)	24 \pm 2(51)
Hexane ext.	36 \pm 3(27)	32 \pm 2(35)
Dichloromethane fr.	24 \pm 2(51)	17 \pm 3(65)
Ethylacetate fr.	41 \pm 3(16)	36 \pm 2(27)
Butanol fr.	44 \pm 4(10)	38 \pm 2(23)
Aqueous fr.	46 \pm 2(6)	44 \pm 2(10)

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

2) 부추김치 디클로로메탄분획의 Cell cycle에서 G2/M phase 저해효과

인체 혈액암 세포인 HL-60에 부추김치 디클로로메탄 분획물을 처리하였을 때 세포 주기의 어느단계를 차단하여 항암활성을 나타내는지 살펴본 결과(Table 3-52), G2/M기에서 control군의 세포 비율은 10.76%인데 비하여 부추김치 디클로로메탄 분획물을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우는 17.45%의 세포비율을 나타내어, G2/M기에서의 세포주기 지연

및 차단효과가 있음을 보여주고 있다. 부추김치 디클로로메탄 분획물도 배추김치추출물에서와 같이 HL-60 혈액암세포의 cell cycle을 지연시켜 암세포의 성장억제 효과를 나타내게 되며, cell cycle에 관여하는 cyclin의 발현에 대한 보다 깊은 연구가 필요하다고 여겨진다.

Table 3-52. The effect of dichloromethane fraction from buchu kimchi on cell cycle distribution in HL-60 human promyelocytic leukemia cells

Sample($\mu\text{g/ml}$)	% of cells		
	G1	S	G2/M
Control	31.49	57.75	10.76
Dichloromethane Fr. 50	30.12	56.06	13.82
125	26.48	58.22	15.30
250	23.96	58.60	17.45

¹The values in parentheses are the inhibition rates(%)

반면 부추김치의 메탄올 추출물은 H06 Ha-ras transformed fibroblast cells의 성장을 저해하지 않는 것으로 나타나 부추김치의 항암활성은 H-ras signaling의 downstream pathway에 의한 효과는 아닌 것으로 여겨진다(Fig. 3-37).

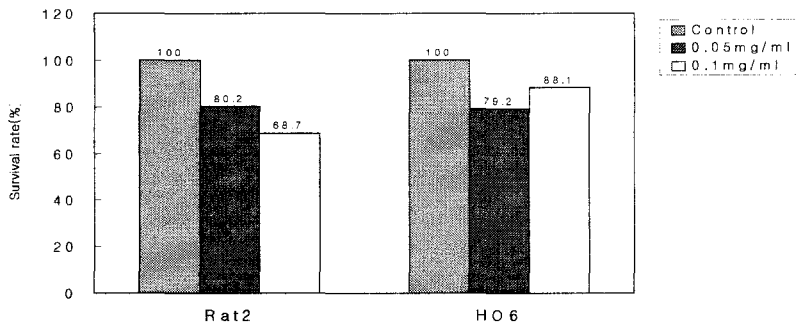


Fig. 3-35. The growth effect of methanol extracts from buchu kimchi on the Rat 2 fibroblast normal cells and H06 Ha-ras transformed fibroblast cells

나. 부추김치의 항암성 증진 연구

부추김치의 항암효과를 증진시키기 위해 표준화 부추김치에 각각 1%의 부재료를 첨가하여 담근 8종류의 김치를 15°C에서 6일간 발효시켜 동결건조한 다음 메탄올 추출물을 얻은 후 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포를 이용하여 *in vitro* 항암 활성을 검토하였다. AGS 인체 위암세포를 이용하여 MTT와 암세포 성장저해 효과를 검토해 본 결과를 Table 3-53~55에 나타내었다. 부재료를 첨가한 부추김치는 모두

표준화 부추김치보다는 AGS위암세포의 증식억제효과가 높았으며, 특히 1% 초피첨가 부추김치, 1% 인삼첨가 부추김치, 1% 알진산염첨가 부추김치가 AGS위암세포의 생존을 크게 저해하였다(Table 3-53, $p < 0.05$). AGS 위암세포를 이용하여 8종류의 부추김치시료를 처리한 후 6일간 배양한 다음 암세포수를 계수하여 암세포 증식억제 효과를 살펴 본 결과 MTT assay에서 처럼 초피, 인삼, 알진산을 첨가한 부추김치가 암세포 증식억제 효과가 증가됨을 알 수 있었다(Table 3-54).

Table 3-53. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added buchu kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment($\mu\text{g}/\text{assay}$)	OD ₅₄₀	
	100	200
Control	0.589 \pm 0.013 ^a	
Standardized buchu kimchi ¹⁾	0.136 \pm 0.008 ^b (77)	0.064 \pm 0.009 ^b (89)
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	0.047 \pm 0.010 ^e (93)	0.005 \pm 0.003 ^d (99)
1% cinnamon powder added buchu kimchi	0.109 \pm 0.005 ^{cd} (81)	0.028 \pm 0.005 ^c (95)
1% ginseng powder added buchu kimchi	0.088 \pm 0.003 ^d (85)	0.010 \pm 0.001 ^d (98)
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	0.098 \pm 0.006 ^d (83)	0.014 \pm 0.002 ^{cd} (98)
1% sodium alginate added buchu kimchi	0.044 \pm 0.007 ^a (93)	0.010 \pm 0.002 ^d (98)
1% sweet tea extract added buchu kimchi	0.118 \pm 0.005 ^{bc} (80)	0.025 \pm 0.007 ^c (96)
1% perilla powder added buchu kimchi	0.095 \pm 0.005 ^d (84)	0.010 \pm 0.001 ^d (98)

¹⁾ See the footnote of Table 2-83

$$^2) \text{ Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}}{\text{OD}_{540} \text{ of control}} \times 100$$

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3-54. Growth inhibitory effect of methanol extracts from various kinds of ingredient added buchu kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell number($\times 10^4/\text{ml}$)	Inhibition rate(%)
Control	58 \pm 2 ^a	
Standardized buchu kimchi ¹⁾	34 \pm 2 ^b	41
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	23 \pm 2 ^e	61
1% cinnamon powder added buchu kimchi	31 \pm 2 ^{bc}	47
1% ginseng powder added buchu kimchi	24 \pm 2 ^e	59
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	28 \pm 1 ^{cd}	52
1% sodium alginate added buchu kimchi	25 \pm 1 ^e	57
1% sweet tea extract added buchu kimchi	26 \pm 1 ^{de}	55
1% perilla powder added buchu kimchi	29 \pm 2 ^{cd}	50

¹⁾ See the footnote of Table 2-83

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

HT-29 인체 결장암세포를 이용하여 8종류의 부추김치에 대해 MTT와 암세포 성장저해 효과를 검토해 본 결과를 Table 3-55에 나타내었다. 초피, 인삼, 알진산염, 들깨를 첨가한 부추김치가 표준화 부추김치보다 암세포의 증식을 더 크게 저해하였다($p < 0.05$). 부추김치시료를 처리하면서 6일간 배양한 후 HT-29 결장암 세포의 성장억제 효과(Table 3-56)를 검토한 결과에서도 초피, 인삼, 알진산염을 첨가한 부추김치가 결장암세포의 성장을 억제하는 효과가 표준화 부추김치보다 높았다.

Table 3-55. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells

Treatment($\mu\text{g}/\text{assay}$)	OD ₅₄₀	
	100	200
Control	0.750 ± 0.010 ^a	
Standardized buchu kimchi ¹⁾	0.249 ± 0.020 ^b (67)	0.194 ± 0.010 ^b (74)
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	0.101 ± 0.002 ^e (87)	0.069 ± 0.010 ^e (91)
1% cinnamon powder added buchu kimchi	0.190 ± 0.004 ^c (75)	0.134 ± 0.007 ^c (82)
1% ginseng powder added buchu kimchi	0.168 ± 0.009 ^{cd} (78)	0.085 ± 0.001 ^{de} (89)
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	0.177 ± 0.010 ^{cd} (76)	0.106 ± 0.010 ^d (86)
1% sodium alginate added buchu kimchi	0.120 ± 0.005 ^e (84)	0.084 ± 0.011 ^{de} (89)
1% sweet tea extract added buchu kimchi	0.184 ± 0.010 ^c (76)	0.132 ± 0.018 ^c (82)
1% perilla powder added buchu kimchi	0.161 ± 0.005 ^d (79)	0.107 ± 0.005 ^d (86)

¹⁾ See the footnote of Table 2-83

$$\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}$$

$$^2) \text{ Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}}{\text{OD}_{540} \text{ of control}} \times 100$$

^{a-d} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3-56. Growth inhibitory effect of methanol extracts from various kinds of ingredient added buchu kimchi against HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment($\mu\text{g}/\text{assay}$)	Cell number ($\times 10^4/\text{ml}$)	Inhibition rate(%)
Control	74 ± 4 ^a	
Standardized buchu kimchi ¹⁾	35 ± 2 ^b	53
1% chinese pepper powder added buchu kimchi	21 ± 1 ^e	73
1% cinnamon powder added buchu kimchi	30 ± 2 ^c	59
1% ginseng powder added buchu kimchi	25 ± 1 ^{de}	67
1% chitosan oligosaccharide added buchu kimchi	31 ± 2 ^{bc}	59
1% sodium alginate added buchu kimchi	24 ± 1 ^{de}	68
1% sweet tea extract added buchu kimchi	27 ± 1 ^{cd}	64
1% perilla powder added buchu kimchi	31 ± 2 ^{bc}	59

¹⁾ See the footnote of Table 2-83

^{a-d} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

이상의 결과로부터 표준화 부추김치에 비해 알진산염과 초피를 첨가한 부추김치가 AGS 인체 위암세포와 HT-29 결장암 세포의 증식 및 성장을 억제함을 알 수 있었다. 따라서 부재료 중 들깨와 초피를 첨가하면 부추김치의 항암효과를 증진시킬 수 있을 것으로 보이며 5차년도에서는 표준화 재료배합비를 기본으로 들깨와 초피를 첨가한 부추김치를 제조하여 암예방/항암 부추김치로 개발하였다(제 2장 참조).

제 4절 결론

항암 기능성 김치의 개발에서도 일반 배추김치의 항암성을 확인하고, 제 2장에서 개발된 암예방 기능성 김치의 항암성을 인체 암세포와 마우스 생체 실험을 통해 확인하였다.

- 일반 배추김치는 인체 암세포의 성장을 억제하고 DNA합성도 감소되었고 유선상 피세포의 성장, 분화에도 영향을 주었다. 그리고 마우스에서 종양의 성장을 억제하였고 마우스간의 실험에서도 GST활성과 glutathione의 활성을 증가시키고 lipid peroxide 함량과 xanthine oxidase는 감소시켜 김치추출물은 항암효과도 있었다.
- 김치 추출물 중 dichloromethane 분획이 항암 활성이 컸으며 β -sitosterol과 linoleic acid derivative가 중요 활성물질로 동정되었다. 이 활성 물질과 분획물은 암세포의 apoptosis를 유도하고 G₂/M phase에서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 김치 활성 물질(분획물)은 signal transduction을 조절하여 Ha-ras발현을 억제 하는 방법으로 항암효과를 나타내었다.
- 김치(유기배추김치)추출물은 마우스의 면역 활성을 증가시키는 효과도 있었는데, 마우스의 NK 활성과 interleukin-2의 생성을 높이는 효과가 관찰되었다.
- 김치의 암예방 효과가 높았던 발효방법(온도), 양념들은 인체 암세포에서도 활성이 높아 암예방 김치는 항암효과도 있는 것으로 나타났다.
- 항암성을 증진시키기 위한 실험 결과 암예방 기능성 김치 I, (유기배추(II)) 김치가 항암활성이 가장 높았으며 이 연구는 마우스 종양생성 억제, 간의 효소계 활성 효과, *in vivo*에서 면역활성 효과 및 *Helicobacter*를 이용한 NO생성 및 TGF-B1 활성을 증가시켰다. 결국 암예방 기능성 김치 I은 항암효과도 있는

것으로 확인되어 암예방/항암 김치 I으로 개발되었다.

- KCl 대체 소금을 이용했던 암예방 기능성 김치 II는 *in vivo*에서도 항암 활성이 컸으며 이 경우 구운소금(70%) + KCl(30%) 소금을 김치 담금시 사용할 때 항암성이 증진되었으며 마우스 간의 조직학적 관찰에서도 대조군(sarcoma-180 tumor cell처리군)과는 달리 Kupffer 세포변화, 지방변성, 국소적 괴사가 줄어들고 정상군으로 회복되어 항암효과가 확인되었다. 즉, 암예방/항암 기능성 김치 II가 되었다.
- 항암 기능성 김치 II에서 고춧가루 함량을 2%로 줄이고 (총 5%) 고추종자와 과피를 7:3으로 조절하여 제조된 김치(제 2장 참조)를 소비자 기호도 조사를 한 경우 선호도는 감소되어 고춧가루 사용시 씨가 항암효과가 컸으나 관능검사, 선호도 조사에서 떨어져 30% 정도의 씨가 들어가는 일반 고춧가루를 사용하는 것이 좋게 나타났다.
- 위의 소비자 기호도 조사를 근거로 암환자용 항암 김치를 맛과 항암 기능을 고려하여 개발하였다. 암환자를 대상으로 설문 조사를 하고 맛을 고려하여 김치를 제조하고 제조 유통 실험을 한 결과 좋은 선호도 결과를 얻었다. 이 경우 항암 기능성 김치 II에 고춧가루를 2.5%로 낮추고 마늘과 갖의 농도를 높이고 소금은 제 4 장에서 개발한 KCl 혼합 죽염을 사용하였다.
- 제 2장에서 개발된 녹차첨가 암예방 기능성김치는 역시 항암효과가 높았다. 녹차 김치는 인체 위암세포, sarcoma 180 종양생성억제, 간의 GST활성증가 등으로 항암 김치로도 손색이 없다고 하겠다.
- 항암 기능성 부추 김치도 개발되었다. 부추 김치는 일반 배추 김치보다 항암 활성이 높았고(2배 정도), 활성물질은 dichloromethane층에 있었으며, 활성 분획은 암세포의 G₂/M phase를 arrest하는 효과가 있었다.
- 항암 기능성 부추김치는 암예방 기능성 부추김치로 항암활성이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 다시 확인되었다. 표준화부추김치 재료배합비에 들깨와 초피가루 0.5%씩을 첨가하고 초피의 매운맛을 감소시키기 위해 버섯과 다시마를 우려낸 물을 이용하여 찹쌀풀을 만들어 첨가하였으며 표준화 부추김치 보다도 항암활성이 크게 높아졌다.

제 5절 참고문헌

1. Boone, C. W., Bacus, J. W., Bacus, J.V., Steele, V. E. and Kelloff, G. J. : Properties of intraepithelial neoplasia relevant to the development of cancer chemopreventive agents. *J. Cellular Biochem. Suppl.*, 28/29 1-20(1997)
2. Green, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. M. and Abbott, B. J. : Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological system. 3rd edition. *Cancer Chemother. Rep.*, 3, 1 (1972)
3. Goldberg, E., Nitowsky, H. and Colowick, S. : The role of glycolysis in the growth of tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 24, 2791 (1965)
4. Kageyama, K., Onoyama, Y., Nakanishi, M., Matsui-Yuasa, I., Otani, S. and Morisawa, S. : Synergistic inhibition of DNA synthesis in Ehrlich ascites tumor cells by a combination of unsaturated fatty acids and hyperthermia. *J. Applied Toxicol.*, 9, 1 (1989)
5. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. : Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 757 (1991)
6. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. : Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48, 4827(1988)
7. Kim, N.D., Oberley, T.D. and Clifton, K.H. : Primary culture of flow cytometry-sorted rat mammary epithelial cell(RMEC) subpopulation in a reconstituted basement membrane. Matrigel, *Exp. Cell Res.*, 209, 6(1993)
8. Beijersbergen, R.L. and Bernards, R. : Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1287, 103 (1996)
9. Joshua James Fairbairn, Mohammad Waleed Khan, Kirk Joseph Ward, Brian Willard Loveridge, Daryl William Fairbairn, and Kimm lesile O'Neill : Induction of apoptotic cell DNA fragmentation in human cells after

- treatment with hyperdermia, *Cancer Letters*, 183-188, 89(1995)
10. Olive, P.L., Garnet F. and Judit P.B., Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 Human B lymphocytes cells using the comet assay, *Radiat. Res.*, 130-136, 136(1993)
 11. Jhun, B. H., Haruta, T., Meinkoth, J. M., Leitner, J. W., Draznin, B., Saltiel, A. R., Pang, L., Sasaoka, T. and Olefsky, J. M. : Signal transduction pathways leading to insulin-induced early gene induction. *Biochemistry* 34, 7996 (1995)
 12. Jhun, B. H., Benjamin, R., Price, D. and Avraham, H. : The MATK tyrosine kinase interacts in a specific and SH2 dependent manner with c-Kit. *J. Biol. Chem.* 270 (1995)
 13. Chihara, G., Maeda, Y. Hamuro, J. Sasaki, T, and Fukuoka, F. : Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*(Berk)Sing., *Nature*, 222, 687 (1969)
 14. Kim, H.Y., Bae., H.s. and Baek, Y.J. : In vivo antitumor effects of lactic acid bacteria on Sarcoma180 and mouse Lewis lung carcinoma. *J. Kor. Cancer Assoc.*, 23(2), 188(1991)
 15. Hana, N. and Burton, R.C. : Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.*, 95, 95(1985)
 16. Jakoby, W.B. and Pastan, I.H. : Methods in enzymology cell culture. Academic Press., N.Y. 56, 119(1979)
 17. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351(1979)
 18. Stripe, F. and Della, C. : The regulation of rat liver xanthine oxidase conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase(Type D) to oxidase(Type O). *J. Biol. Chem.*, 244, 3855 (1969)
 19. Ellman, G.L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 79(1950)
 20. Harig, W.H., Pabist, M.J. and Jakby, W.B. : The first enzymatic step in mercaptic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130 (1974)
 21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951

22. Richmond, R.E., Carter, J.H., Carter, H.W., Daniel, F.B. and DeAngelo, A.B. : Immunohistochemical analysis of dichloroacetic and (DCA)-induced hepatocarcinogenesis in male Fischer(F344) rats. *Cancer Lett.*, 92, 67-76(1995)
23. Hasmall, S.C., Pyrah, I.T.G., Soames, A.R. and Roberts, R.A. : Expression of the immediate-early genes, c-fos, c-jun, and c-myc : A comparison on rats of nongenotoxic hepatocarcinogens with noncarcinogenic liver mitogens. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 40, 129-137(1997)
24. Olive, P. L., Garnet, F. and Judit, P. B. : Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 human B lymphocytes cells using the comet assay. *Radiat. Res.*, 136, 130 (1993)
25. Balkwill, F. R. : Cytokines. 2nd edition TRL press, Oxford University Press, New York. p.358 (1995)

제 4장 소금의 특성, 젓갈의 안전성, 저염김치 개발 및 암예방 소금 김치개발

제 1절 서설

소금은 인체 생리에서 중요하게 작용하며 또한 식품 제조시 보존성, 맛 증진 등에 중요하게 관여하고 있지만 건강유지와 관련하여 고혈압, 위암 발생 등과는 정의 관계를 가지고 있다. 한국인의 식품에서는 소금이 매우 중요하여 음식의 부패를 방지하고 밑반찬, 발효 등에 소금은 중요하게 관련되어 왔었다. 김치에서 고염은 문제가 될 수 있음이 제기되어 왔으며 실제 일반김치(소금농도 3%)는 문제가 없었지만 8%의 고염도 김치 추출물은 MNNG와 같은 발암물질과 같이 존재할 경우 돌연변이 유발을 촉진(1) 하였으며, 소금자체는 문제가 없지만 소금이 쥐에서 발암물질(MNNG)과 같이 섭취될 경우 암을 유발한다고 보고된 바 있다(2).

본 연구에서는 이러한 소금의 특성을 연구하여 인체에서 특히 암발생과 고혈압 발생을 억제 또는 완화 할 수 있는 소금을 선택하고 소금 자체가 암예방 효과가 있으며 김치제조시 사용되면 암예방/항암효과가 증대되는 소금을 개발하려고 하였다.

국내에서 대표적으로 시판되는 소금종류를 선택하여 이들의 이화학적 특성, 특히 무기질 함량의 차이점 등을 비교하고 우리나라의 전통 소금인 죽염의 미네랄 함량을 굽는 회수에 따라 비교하였다. 또한 이들 소금종류들의 항균효과, 과산화 촉진효과, (보)돌연변이 유발효과 등을 측정하여 김치발효와 인체에 가장 유리한 소금을 찾으려고 하였다.

김치에 소금공급원으로 들어가는 젓갈은 그 안전성에 문제가 많이 제기 되었다(3). 젓갈은 고 농도의 소금양(20~25%), 이급 아민류 등의 안전성에 관련된 확인연구는 암예방/항암 김치를 제조하는데 매우 중요하다 하겠다. 이 연구에서는 젓갈의 발효기간에 따른 돌연변이유발/항돌연변이 효과를 측정하였다.

또한 이 연구에서는 김치에서 소금의 함량을 감소시키기 위한 몇 가지 방법이 시도되었는데, 즉 전체 NaCl 대신에 30%를 KCl로 대체하는 방법으로 김치제조 방법을 연구하고, 소금을 적게 넣는 대신 항균효과가 큰 초피를 이용하여 초피 첨가 김치, 그리고 다시마내의 알긴산의 Na 흡착 기능성을 이용한 다시마첨가 김치 개발 등이 시도되었다. 또한 소금의 종류에 따라 고혈압 발생을 차이를 *in vivo*를 통해 검토하였고, 소금을 가공 제조하여 암예방 기능이 우수한 소금을 개발하였다. 이 소금은 죽염과 비교해 그 기능면에 크게 손색이 없으며 경제성, 생리 기능적인 면에 우수한 것으로 나타났다. 결국 여기에서 제조된 소금으로 암예방 식탁

용 소금으로 뿐 아니라 암예방/항암 기능성 김치제조시 사용하여 기능성을 증가시키도록 하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 시료

가. 소금

시료로는 국내 천일염 5종(경기냉장, 팔도식품, 한성식품, 산내들식품, 자하죽염에서 구입한 서해안 천일염), 수입천일염 3종(중국, 멕시코, 호주), 기계염 4종(한주, 오복, 해표, 샘표), 구운소금(산내들식품), 생금 2종(산내들식품, 선맥), 죽염(자하죽염(1회, 3회, 5회, 7회, 9회), 영명죽염(2회, 9회), 대나무(자하죽염), 황토 6종(김해, 진주, 대전, 이천, 나주, 대전)을 사용하였다. 1회 구운 KCl 혼합죽염은 대나무 속에 KCl과 천일염의 혼합염(A:천일염:KCl=3:7, B:천일염:KCl=5:5, C:천일염:KCl=7:3)을 넣고 진흙으로 봉한 후 소나무 장작불로 구워서 제조하였다. 2회 구운 KCl 대체죽염은 대나무 속에 1회 구운 KCl 대체죽염 A(천일염:KCl=3:7), B(천일염:KCl=5:5), C(천일염:KCl=7:3)를 넣고 진흙으로 봉한 후 소나무 장작불로 구워서 제조하였다.

나. 멸치젓갈

멸치젓 원료 및 발효된 멸치젓의 돌연변이 유도 여부를 관찰하기 위하여 생멸치, 생멸치에 소금(천일염)을 첨가한 것, 6개월간 발효된 멸치젓 건더기 및 액 그리고 12개월간 발효된 멸치액젓을 경남, 기장(대변)에서 구입하여 사용하였다. 생멸치는 크기가 12~15cm로 1998년 2월에 기장에서 잡은 것을 사용하였고, 6개월간 발효시킨 멸치젓갈은 1997년 9월에 잡은 멸치에 20% 소금을 첨가하여 1998년 2월까지 실온에서 발효시킨 것으로 어체와 액을 분리하여 각각 시료로 이용하였으며, 12개월간 발효시킨 멸치액젓은 1997년 3월에 잡은 멸치에 20%소금을 첨가한 후 1998년 2월까지 실온에서 발효한 다음 3번 여과하여 제품화 된 것을 사용하였다. 생멸치 및 젓갈은 동결 건조한 다음 분말화하여 각각 20배의 메탄올을 넣고 3회 추출하였다. 회전식 진공농축기(Buchi 011 & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 DMSO에 녹여 실험에 이용하였다.

2. 실험방법

가. 무기질 정량

Mg, Si, P, S, K, Ca, Fe, Na의 함량은 ICP/AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer ; Shimadzu ICPS-III model, Japan)로 측정하였고, Ge,

As, Cu, Zn, Pb, Mn, Cd, Co, Cr의 함량은 ICP/MS(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer ; Fisons PQ3 STE model, UK)로 측정하였다.

나. 소금과 젓갈의 mutagenicity/carcinogenicity 측정

Ames test와 SOS chromotest를 이용하여 mutagenicity를 측정하고, C3H/10T1/2 cell에서 세포 독성실험과 transformation test로 carcinogenicity를 측정하였으며, *in vitro* 및 *in vivo*에서의 실험방법은 제 2장과 제 3장의 방법과 동일하다.

다. C3H/10T1/2 세포를 이용한 NaCl의 발암효과 실험

1) 사용세포 및 세포배양

Mouse embryo cell인 C3H/10T1/2 세포는 100unit/ml penicillin-streptomycin 과 10%의 fetal calf serum(FCS)가 함유된 basal medium Eagle(BME)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 C3H/10T1/2 세포는 5일마다 refeeding하고 PBS용액으로 0.05% trypsin-0.02% EDTA효소로 부착된 세포를 떼어내어 cell culture fask에 일정수 분할하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

2) Dose Response

C3H/10T1/2세포를 2,000 cell/5ml의 농도로 60mm dish에 seeding하고 24시간동안 배양한후 배양액을 버리고 free serum medium에 MCA(1, 5, 10, 50 µg/ml)를 농도별로 첨가한 후 48시간 지난 뒤 5ml씩 60mm dish에 feeding 하였다. 실험군과 대조(DMSO) 군을 10% FCS가 함유된 새 배지로 refeeding 하였다. 1주일 배양 후 메탄올로 고정화 하여 Giemsa stain 으로 염색한 뒤 군집을 이룬 cell colony를 계수하였다(4).

3) 세포독성 (cytotoxicity) 효과

Cytotoxicity test는 C3H/10T1/2 세포를 2,000 cell/5ml의 농도로 60mm dish에 seeding한 후 24시간 동안 배양하고 배양액을 버린후 free serum medium에 발암물질 [MCA(5µg/ml)]과 시료를 첨가한 후 5ml씩 60mm dish에 feeding하였다. 실험군과 대조 군을 10% FCS 가 함유된 신선한 배지로 refeeding하였다. 1주일 배양 후 메탄올로 고정화 하여 Giemsa stain으로 염색한 뒤 군집을 이룬 cell colony를 계수하여 아래 공식에 따라 C3H/10T1/2 세포에 대한 소금의 cytotoxicity 효과를 측정하였다(4).

$$\text{Survival fraction} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

4) 소금의 MCA에 의한 transformation증가효과

C3H/10T1/2 세포를 2,000 cell/5ml로 계수하여 60mm dish에 seeding한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 free serum medium에 20-methylcholanthrene(MCA)와 시료를 넣고 24시간 동안 배양하고, 대조군에는 발암물질과 H₂O를 첨가하였다. 처

리균과 대조균을 10% FCS가 함유된 신선한 배지로 refeeding하면서 5주간 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 배양하였다. 그 후 메탄올로 고정화하고 Giemsa stain으로 염색하여 transformed foci가 형성되는 집약도에 따라 3가지 type(type I, II, III)로 구분하여 계수하였다.

라. 항고혈압 활성 측정실험

1) Angiotensin I 전환 효소(ACE) 활성 측정

ACE활성은 Cushman와 Cheung의 방법을 개량한 Yamamoto 등의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정농도의 시료100 μ l에 ACE조효소액 100 μ l 및 붕산 완충액(pH 8.3, containing 400mM NaCl) 200 μ l를 가한 후, 37°C에서 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 12.5mM의 hippuryl-histidyl-leucine용액 100 μ l를 가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1N HCl 300 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다(공시험은 시료 용액 대신에 붕산 완충액 100 μ l를 가함). 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 교반한 후, 3,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이 상층액을 140°C에서 20분간 건조시킨 다음 실온에서 5분간 방치한 후, 1M NaCl 3ml를 가하여 15초간 교반하여 용해시키고 228nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후 잔존 활성의 백분율로써 ACE 저해율을 나타내었다(5).

2) 평형투석법에 의한 식이섬유의 소금 흡착효과 측정 실험

Sodium의 흡착능을 측정하는 실험 방법으로 Crane & Wilson' apparatus를 이용하였다. Mucosal solution은 dietary fiber와 NaCl을 3차증류수에 녹여 dialysis tubing(Sigma : MW 12,000)외부에, 그리고 내부에는 장막액(serosal solution)으로 3차증류수를 이용하였다. 각각의 시료를 증류수에 용해한후 pH를 위내관과 같이 2이하로 낮추기 위해 0.3N HCl을 가하였다. HCl의 량에 따라 control에 함께 첨가하고, Na를 함유한 시료일 경우 blank도 같이 행하였다. 37°C water bath에서 2hr동안 incubation한 후 dialysis tubing 내액을 500 μ l덜어 AA로 Na의 량을 측정하였다. pH를 소장내와 같이 pH 7이상으로 높이기위해 3N NaOH을 가하였다. NaOH의 량에 따라 control은 함께 첨가하였다. 37°C water bath에서 2hr동안 incubation한 후 dialysis tubing 내액을 덜어 AA 로 Na의 량을 측정하였다(6).

3) 과산화물가(POV가) 분석

삼각플라스크(100ml)에 유지 1.00g을 정칭하여 주입한 후, 에탄올 20ml을 가해 용해하여 phosphate buffer(0.2M, pH 7.0) 25ml을 가하여 혼합하였다. 그리고 이때 첨가하는 항산화물질은 용해성에 따라 에탄올, phosphate buffer에 용해시켜 해당 농도로 만든 다음 그 1ml를 삼각 플라스크에 첨가하였다. 50°C에서 해당 반응시간 동안 자동산화시킨 후, 이들 반응용액을 300ml 분액여두에 옮긴 다음 소량의 물과 클로로포름 25ml를 사용해 3회 추출한 다음 하층을 500ml 삼각 플라스크에 모았다. 여기에

아세트산 25ml를 사용하여 3회 추출한 다음 하층을 500ml 삼각 플라스크에 모았다. 여기에 아세트산 25ml를 가하고 포화 KI용액 1ml를 가해 1분간 진탕한 후 암소에서 10분간 방치하여 증류수 50ml를 가하고 1%전분 용액을 지시약으로 하여 0.01N-티오황 산나트륨용액으로 적정하여 POV를 다음과 같이 구하였다(7).

$$POV(=meq/kg) = \frac{S \times N \times 10}{L}$$

S ; 0.01N- $Na_2S_2O_3$ 적정치(ml)

N ; $Na_2S_2O_3$ 의 규정농도

L ; 유지의 중량(g)

마. 이화학적실험

1) pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(Corning 220, USA)로 측정하고, 산도는 AOAC방법(8)으로 측정하였으며 phenolphthalein 지시약을 첨가하고 0.1N NaOH로 적정하여 적정값은 lactic acid 로 환산하고 함량 %로 나타내었다.

$$\text{Lactic acid}(\%) = \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 9}{\text{weight of sample (g)}}$$

2) 환원당 함량 측정

김치의 환원당은 Schoorl 방법(9)으로 측정하였다.

3) *Leuconostoc*속 젖산균수와 *Lactobacillus*속 젖산균수의 측정

평판계수법을 이용하였으며, *Leuconostoc*은 *Leuconostoc* 선택배지로 phenylethyl alcohol과 sucrose를 첨가한 phenylethyl alcohol sucrose agar medium(PES medium)를 사용하여 20℃에서 5일간 평판배양하였다. *Lactobacillus*는 *Lactobacillus* selection medium(LBS medium)에 *Pediococcus*의 생육을 억제하기 위하여 acetic acid 와 sodium acetate를 첨가한 modified LBS agar medium(m-LBS medium)을 사용하여 30℃에서 3일간 평판배양하여 나타난 colony수를 계수하였다(10,11).

바. 관능 검사

반복된 랜덤화 완전 블럭 계획(replicated randomized complete block design)에 따라서 훈련된 8명의 관능요원이 1회에 3가지 시료를 평가하게 하고 이를 4회 반복 실시하였다(12). 묘사항목은 주관적인 평가로 종합적인 외관(apperance), 냄새(overall smell), 향미(overall flavor), 질감(overall chewness)으로 평가하고, 1에

서 9까지로 분류한 등급을 사용하여 평가하였으며, 1에 가까울수록 극도로 좋고, 9에 가까울수록 극도로 싫은 것으로 나타내었다. 또 객관적인 평가로는 후각적 지각인 신내(sour smell), 군덕내(moldy smell), 풋내(green smell)와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 군덕맛(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 평가하고, 미각적 지각은 여러차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신내와 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 풋내와 덜익은 맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕내와 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

유의성 검정은 대조군과 각 시료로부터 얻은 평가점수로부터 ANOVA을 구한 후 Duncan's multiple range test를 행하거나 Student's t test를 이용하여 통계분석하였다.

사. 다른 소금으로 제조된 김치 및 식탕용 소금의 *in vivo* 항암실험

제 3장의 재료 및 방법에서 소개한 바와 같이 마우스를 이용한 *in vivo* 항암효과 실험과 동일한 방법으로 하였다.

제 3절 결과 및 고찰

본 연구에서는 김치 제조시 사용되는 소금이 암발생과 관련하여 중요하게 연결되어 있기에 소금 종류의 특성을 연구, 제조하여 맛과 암예방 기능을 갖는 소금을 개발하고 암예방 기능을 가지면서 김치 담금시 암예방효과를 증진시킬 수 있는 적합한 소금을 개발하는 데 목적이 있다. 그리고 소금이 많이 들어 있는 젓갈의 안전성을 측정하고 저염김치 개발도 하였다.

1. 소금종류별 화학적 및 생리적 특성

가. 소금의 무기질 함량 측정

1) 소금 종류별 무기질 분석

소금의 종류는 다양한데 KS규격에 따라 정제염의 규격을 원용하던 소금은 크게 천일염과 정제염으로 나누어 지고 정제염은 기계염과 가공염으로 분류되고 있다.

소금의 종류에 따른 생리 활성을 가지는 무기질의 상대적인 함량을 측정하기 위해 ICP-AES와 소금내의 Na 함량은 AAS를 이용하여 측정한 결과는 Table 4-1과 같다. 정제과정을 거친 시약용 NaCl은 대부분이 NaCl이며 다른 원소들이 미량검출되었다. 역시 기계적으로 추출된 기계염(한주소금)도 마찬가지였다.

기계염에 비해 천일염은 Ca(1,037ppm), K(3,700ppm), Mg(10,266) 및 S(7,459ppm)이 많았다. 이에 비해 간수를 제거한 생소금은 Mg(5,883ppm)이 반으로 줄었으며 Ca(579ppm), K(1,661ppm), S(4,708ppm)이 줄어들었다. 간수속에 Mg(53,618 ppm)이 많이 함유되어 있는 것으로 보아 대부분 천일염에서 제거되는 간수는 대부분 Mg일 것으로 생각된다(Table 4-2). 간수속에는 Ca(193ppm) K(10,030ppm), S(24,299 ppm), Zn(9,332ppm) 등이 많았으며 Na은 5%로 매우 낮았다. 그 외 중금속으로 Al, Pb, Cr등이 검출되었고 Co, Hg, Ni, Se 등도 미량 검출되었다. 구운소금은 Ca(926ppm) K(2,729ppm), Mg(8,750ppm)이 많았고 Fe(10ppm)도 많았다. 생금은 Ca(1,952ppm) K(4,255ppm), Mg(12,628ppm)이 많았고, Fe(13ppm)도 가열온도가 높아짐에 따라 증가되었다. 죽염은 K(11,136ppm) 함량이 상당히 많았고, Fe(100ppm)이 크게 증가하여 가열 온도와 처리 횟수에 따라 증가되는 것을 볼 수 있었다. 또한 가열에 의해 Si도 점차적으로 증가하였으며 죽염에 Ge(256ppm)도 함유되어 있었다. 그러므로 천일염을 이용한 각종 가공소금은 염화나트륨뿐만 아니라 인체에 필요한 미네랄을 다량 함유하고 있어 생리적으로 유용하다고 생각된다.

주사식 전자 현미경(SEM)을 이용한 염의 표면구조 관찰 시료의 표면구조를 100배로 관찰하였다. 시약용 NaCl과 기계염은 소금의 특징적인 정육각형의 결정구조를 가지고 있으나 천일염은 다른 미네랄이나 이 물질에 의해 결정구조의 핵이 중복되면서

접을 이루고 있다. 생소금은 물세척과 원심분리과정을 거치는 동안 사각형의 구조가 손상된 형태였다. 고온 가열처리를 행한 가공염인 구운소금과 생금 그리고 죽염은 용융된 상태에서 다시 식는 동안에 용융된 표면구조를 그대로 유지하고 있었다(하정옥, 박건영: 소금의 종류별 미네랄 함량과 외형구조 비교연구. 한국식품영양과학회지, 27(3), 413-418(1998))

Table 4-1. Mineral contents of various salts analyzed with ICP-AES

(Unit : ppm)

Salt var. Mineral	NaCl (Reagent)	Purified Salt	Chunil Salt	Seang Salt	Gueun Salt	Seang Kum	Bamboo Salt
As	6.0	1.4	ND	ND	ND	ND	ND
Ca	36	161	1037	579	926	1952	390
Cu	4.5	1.2	4.1	3.2	1.5	2.1	6.8
K	21	870	3701	1662	2729	4255	11136
Mg	ND	10	10266	5883	8750	12628	3552
Mn	0.1	0.1	4.5	2.1	3.4	3.1	4.1
P	1.3	0.3	89	66	82	100	809
Pb	5.3	7.7	11.7	ND	1.2	ND	ND
S	24	33	7459	4708	5585	7873	1525
Zn	9.3	2.8	4.3	4.6	1.6	3.0	3.1
Fe	1.4	0.4	2.6	0.6	9.9	12.7	99.5
Ge	ND	93	78	23	14	ND	256
Si	9	4	22	9	258	423	478
Na(%) ²	39.4	33.6	36.2	38.1	35.0	31.9	31.6
NaCl(%) ³	99.8	99.8	94.4	97.9	93.0	92.4	93.6

¹ Hanju salt

² Na(%) is analyzed with AAS

³ NaCl(%) is analyzed with titration of 0.1N AgNO₃

Table 4-2. Mineral contents of salt water from Chunil salt analyzed with ICP-AES

Mineral	Content (ppm)	Mineral	Content (ppm)
As	ND	Ge	37.8
Ca	193.0	Si	27.4
Cu	4.2	Al	1135.0
K	10030.0	Ba	ND
Mg	53618.0	Co	1.1
Mn	1.4	Cr	771.3
P	ND	Hg	22.8
Pb	5343.0	Ni	3.2
S	24299.0	Se	2.3
Zn	9332.0	Na ¹⁾	5.1
Fe	4.7	NaCl ²⁾	29.8

¹⁾ Na(%) is analyzed with AAS

²⁾ NaCl(%) is analyzed with titration of 0.1N AgNO₃

2) 천일염 및 간수를 제거한 천일염의 미네랄 성분변화

천일염은 해수를 모아 태양열과 바람에 의해 수분을 증발시켜 염의 결정을 얻은 것이다. 같은 천일염이라도 제조원에 따라 무기질의 함량이 달라질 수 있으므로 천일염 종류별 무기질 함량을 가공염인 구운소금과 비교하여 측정하였다(Table 4-3). 천일염은 종류에 따라 차이가 크긴 하지만 가공염인 구운소금보다 Mg, Ca, K, Si, As 등이 많이 함유되어 있었으며 Fe, Mn, Cu, Zn은 적은 것으로 나타났다. 경기천일염이 생리 기능성이 있는 Mg, Ca, K의 함량이 높고 중금속인 Pb의 함량이 가장 낮았다.

Table 4-3. Mineral contents of various kinds of commercial Chunil salt, salt water-separated Chunil salt, salt water and Gueun Salt analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Mineral		Na	Mg	S	Ca	K	Fe	Si	P	Mn	Cu	Zn	Ge	As	Pb
		%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb
Chunil salt	Kyounggi	32.2	1.62	0.76	2533	5468	8.5	16.3	<5	2.97	<50	102	<50	71	185
	Paido	32.6	1.38	0.57	715	4234	5.5	19.2	<5	2.13	<50	65	<50	66	122
	Hansung	35.4	0.79	0.40	1150	2507	25.4	31.7	<5	5.12	<50	166	<50	109	153
	Sannaedeul 0 ¹	32.8	0.96	0.59	1630	2273	16.4	19.4	<5	2.65	<50	242	<50	98	310
	0-SW ²	36.7	0.55	0.46	1658	1555	14.0	16.1	<5	2.72	<50	46	<50	19	492
	SW ³	4.45	3.82	1.81	156	7677	3.9	18.1	<5	1.60	<50	505	<15	96	55
Seang salt		36.9	0.27	0.24	1374	909	18.5	24.0	<5	2.75	<50	87	<50	98	310
Gueun Salt		38.1	0.66	16.1	938	2044	40.1	16.1	<5	3.22	84	1559	<50	12	241

¹Original Chunil salt ²Original Chunil salt-Salt water ³Salt water

천일염은 다량의 무기질을 함유하고 있으나 환경오염의 영향으로 해수가 다소 오염되어 있어 중금속이 미량 검출될 수 있으므로 가능하면 간수를 제거하는 것이 좋다. 때문에 최근 해수오염과 쓴맛이 있는 간수를 제거한 천일염인 생소금이 나오는데 이것은 서해안의 천일염을 물로 세척하여 불순물과 간수를 제거한 후 원심분리한 것이다. 천일염에서 간수를 제거할 경우 중금속이 어느정도 제거될 수 있는지 검토하기 위하여 간수를 제거하지 않은 천일염과 실험실에서 원심분리하여 간수를 제거한 천일염, 간수가 제거되어 시판되는 생소금, 간수의 무기질 함량을 측정하였다. 간수를 제거하지 않은 천일염에 비해 간수를 제거한 천일염과 생소금은 Mg, S, K, Zn, Pb의 함량이 낮았으며 이들 무기질은 간수속에 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 실험실에서 원심분리하여 간수를 제거한 천일염은 생소금에 비해 Mg, Ca, K 등의 생리기능을 가진 무기질 함량이 상대적으로 높으며 As도 많이 제거된 것으로 나타났다.

따라서 원심분리 등으로 간수를 제거하면 중금속의 함량을 줄일 수 있으며 김치제조 시 천일염을 수개월~1년정도 방치한 후 간수를 제거하여 사용하는 것은 천일염속에 함유된 중금속을 다소나마 감소시킬 수 있어 바람직하다 하겠다.

3) 수입천일염의 미네랄 함량

최근 김치공장에서 단가가 낮고 짠맛이 강한 수입천일염의 이용이 늘고 있다. 사용 빈도가 높은 수입천일염의 종류별 무기질 함량을 국내천일염(산내들(주))과 비교하여 측정한 결과(Table 4-4) 수입천일염은 국내 천일염에 비해 Na함량이 높은 것으로 나타났다. 특히 멕시코산 천일염과 호주산 천일염은 생리기능성을 나타내는 무기질인 Mg, Ca, Fe의 함량이 낮고 Na의 함량이 높아 천일염이라기 보다는 기계염과 비슷한 무기질 조성을 가진 것으로 나타났다. 앞의 연구결과에서 기계염은 김치의 암예방측면에서 천일염이나 가공염에 비해 불리하게 작용했던 점을 고려하면 김치제조시 수입 천일염보다는 국내천일염을 사용하는 것이 바람직할 것으로 보인다. 그러나 경제적인 측면에서 볼 때는 사용이 불가피할 수 있으므로 수입소금을 이용한 김치제조 연구가 필요하다.

Table 4-4. Mineral contents of various kinds of chunil salts analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Variety	Mineral	Cu	Pb	Mn	Zn	Ge	As	Mg	Si	P	S	K	Ca	Fe	Na
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Sannaedeul salt		0.09	0.52	3.9	0.49	<0.01	<0.01	9219	20.8	<10	7341	2070	1497	16.6	35.0
Salt imported from China		0.11	0.34	2.5	0.31	<0.01	<0.01	1691	2.9	<10	1860	267	1512	11.0	38.1
Salt imported from Mexico		0.11	0.06	0.8	0.19	<0.01	<0.01	125	1.7	<10	315	7	283	5.4	38.5
Salt imported from Australia		1.50	0.08	0.4	0.17	<0.01	<0.01	105	2.1	<10	302	39	284	4.1	39.1

4) 기계염 종류별 미네랄 성분

기계염의 종류별 무기질 함량을 구운소금과 비교하여 측정한 결과(Table 4-5) 기계염은 가공염인 구운소금에 비해 Na함량이 높은 것으로 나타났다. 또한 생리기능성을 나타내는 무기질인 Mg, Ca, Fe의 함량도 구운소금보다 훨씬 낮았다. 따라서 앞의 연구결과에서 기계염의 보들연변이 효과가 높고 기계염으로 김치를 제조했을 때 MCA의 cytotoxicity억제효과가 거의 없었던 것은 이런 기능성 무기질의 함량은 낮고 Na의 함량이 높았기 때문으로 추정되며 김치제조를 위해서는 천일염, 생소금, 구운소금 등이 기계염보다 유리하리라 생각되는데 이에 관해 계속적인 연구가 필요하다.

Table 4-5. Mineral contents of various kinds of commercial Purified salt and Gueun Salt analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Mineral		Na	Mg	S	Ca	K	Fe	Si	Mn	Cu	Zn	Ge	As	Pb
		%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
PS ¹	Hanju	38.3	94	149	278	2089	<1	<15	0.04	0.2	<0.1	<0.5	<0.25	<0.04
	Haepyo	37.5	645	618	457	1492	5.9	<15	0.71	0.2	<0.1	<0.5	<0.25	<0.04
	Obok	38.9	330	123	276	722	1.2	<15	0.06	0.3	0.3	<0.5	<0.25	<0.04
	Saempyo	37.7	538	550	231	2200	<1	<15	0.21	0.3	0.7	<0.5	<0.25	0.05
Gueun Salt		35.8	7026	4267	1045	2000	47.4	<15	3.75	0.3	1.7	<0.5	<0.25	0.22

¹Purified salt

5) 구운소금의 가공과정 중 미네랄 성분변화연구

최근 시중에 나와있는 가공염은 가열공정을 거쳐 가공하는 방법이 공통적이며 구운소금은 천일염을 세라믹 반응로에서 800℃이상 고온으로 2번이상 구워 불순물과 간수, 유해성분을 제거한 것이다. 구운소금(산내들(주))의 가공과정 중 생리활성을 가지는 무기질의 함량 변화를 살펴보기 위해 ICP-AES와 ICP-MS를 이용하여 무기질함량을 측정하였다. Table 4-6은 굽는 횟수를 달리한 구운소금의 무기질 함량을 천일염과 비교한 것이다. 2, 3, 4번 구운소금은 천일염에 비해 Fe, Si, Cu, Zn, Ge의 함량이 높았으며 중금속인 As의 함량은 낮았다. 특히 4번 구운 소금은 천일염보다 혈압을 낮추는 물질로 알려진 Mg와 K가 많이 함유되어 있었다. 따라서 앞의 연구 결과에서 구운소금이 보돌연변이 효과를 낮추고 구운소금으로 제조된 김치가 MCA에 의한 cytotoxicity억제효과가 높았던 것은 이들 기능성 무기질의 함량이 높았기 때문이 아닌가 추정된다.

Table 4-6. Mineral contents of Chunil Salt and various types of Gueun salt analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Mineral		Na	Mg	S	Ca	K	Fe	Si	P	Mn	Cu	Zn	Ge	As	Pb
		%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Chunil Salt		33.80	1.39	1.33	0.24	0.44	6.29	7.09	<6	2.75	0.09	0.18	0.10	1.23	0.11
Gueun Salt	2 times	35.46	0.79	0.62	0.18	0.27	16.06	9.89	<6	1.66	0.12	1.00	0.12	0.79	0.17
	3 times	36.24	0.79	0.52	0.15	0.31	25.92	20.63	<6	1.99	0.13	0.46	0.14	0.50	0.16
	4 times	33.32	1.75	1.26	0.19	0.55	19.35	39.24	<6	1.56	0.17	0.89	0.13	0.87	0.18

6) 죽염의 가공과정 중 미네랄 성분변화연구

소금의 종류 중 가장 암예방 활성이 좋았던 죽염의 가공과정 중 미네랄의 변화를 ICP-AES와 ICP-MS를 이용하여 측정하였다. Table 4-7은 처리횟수를 달리한 죽염(자하죽염, 김해)의 무기질 함량을 천일염, 한주소금과 비교한 것이다. 죽염의 굽는 횟수가 증가하면서 천일염에 비해 Cu, Mn, Zn, P, K, Fe의 양이 증가되어 9회 죽염이 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 이들 무기질은 대나무와 황토에도 많이 함유되어 있었는데 대나무와 황토에 함유된 무기질이 반복적으로 죽염을 제조과정에서 소금으로 옮겨져 9번째 구운 죽염에서 가장 높은 함량을 나타내게 되는 것으로 보인다. 또한 죽염은 9번째 구울 때 송진가루를 뿌려 온도를 1300-1700℃까지 높이며 이 과정에서 소금이 용융된 것과 용융되지 않은 2가지 죽염이 생성된다. 용융된 9회 죽염은 용융되지 않은 9회죽염보다 Cu, Mn, Zn, P, K, Fe 등의 무기질함량이 다소 감소되었으며 이는 소금의 용융과 함께 다른 무기질까지 용융되었기 때문인 것으로 보인다. 현재 죽염의 생리활성은 자하죽염(주) 박만석 대표와 연계하여 연구 중이며 소금개발과 김치제조와 관련하여 연구 및 제조를 진행하고 있다.

자하죽염: 경남 김해시 상동면 북방리 505-1
 전화: 055-323-6377, 6588, Fax: 055-323-6588

Table 4-7. Mineral contents of various salts and raw material analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Mineral	Cu	Pb	Mn	Zn	Ge	As	Mg	Si	P	S	K	Ca	Fe	Na
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%
Hanju salt	0.2	0.05	0.2	<0.1	<0.5	<0.25	22	7	<3	65	563	121	<1	36.0
Chunil salt	0.2	0.28	2.8	0.2	<0.5	<0.25	4068	9	<3	2813	1542	1408	13	34.5
1 time bamboo salt	0.4	0.30	3.0	0.4	<0.5	<0.25	3512	10	21	1808	1936	951	12	36.9
3 times bamboo salt	0.8	0.19	5.1	1.1	<0.5	<0.25	4438	14	54	1208	2870	963	19	35.9
5 times bamboo salt	1.0	0.21	5.2	1.1	<0.5	<0.25	4198	7	95	1400	3789	978	24	36.2
7 times bamboo salt	1.5	0.25	6.2	1.1	<0.5	<0.25	4398	304	147	1390	4623	1034	41	34.7
9 times bamboo salt	12.3	0.09	10.3	1.1	<0.5	<0.25	1810	46	404	488	7976	1015	189	35.1
9 times bamboo salt(melted)	10.8	0.08	6.3	1.1	<0.5	<0.25	193	18	270	630	7379	715	131	34.5
Bamboo	1.6	0.15	16.1	1.2	<0.5	<0.25	252	45	563	224	3413	3442	39	0.0068
Raw yellow mud	33.3	11	868	57.7	0.2	4.4	3801	*	99	256	5321	394	50376	0.08

7) 죽염과 죽염제조시 사용하는 황토의 미네랄 함량 및 중금속 오염도 연구

죽염의 원료인 천일염과 지역에 따라 제조된 죽염의 미네랄 성분 및 중금속 오염의 차이가 있는지를 검토하였다. 자하죽염(경남김해)과 영명죽염(전남담양)의 2, 3번 및

9번 구운 죽염을 비교한 결과 영명죽염이 Pb와 As 등의 양이 다소 많았다(Table 4-8). 즉, 죽염의 경우 사용하는 재료와 방법에 따라 무기질 함량에 다소 차이가 있을 수 있다. 환경오염에 의해 죽염에 사용하는 황토가 중금속으로 오염되어 있을 수 있기에 죽염의 원료로 사용되는 지역별 황토의 무기질 함량을 측정해 보았다(Table 4-9). 이 연구에서 시료는 자하죽염, 박만석 대표에 의해 수집, 공급되었다. 김해황토는 Pb, As, Co, Cr 등의 중금속 함량이 많았으며, Fe, S, Mg의 함량이 높았다. 대전의 계룡산 황토는 Fe, Ca, K, S, P, Mg 등의 생리기능성을 나타내는 무기질의 함량은 높고, 중금속의 함량이 다른 지역 황토에 비해 낮은 것으로 나타났다. 따라서 죽염 제조시 생리기능성을 나타내는 무기질의 함량이 높고, 중금속의 함량이 낮은 대전의 계룡산 황토를 이용하는 것이 바람직 할 것으로 보인다.

Table 4-8. Mineral contents of various kinds of salts analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Variety	Mineral	Cu	Pb	Mn	Zn	Ge	As	Mg	Si	P	S	K	Ca	Fe	Na
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Jaha chunil salt		0.10	0.19	3.6	0.53	<0.01	<0.01	4775	18.0	<10	3056	1458	1056	10.4	36.9
3 times jaha bamboo salt		0.93	0.13	5.7	1.05	<0.01	0.02	5290	5.6	54	1735	2696	1037	20.5	38.0
9 times jaha bamboo salt		14.4	0.05	51	3.5	<0.01	0.03	2050	55.9	434	1129	7654	1092	223	38.0
2 times youngmyung bamboo salt		0.90	0.14	14.3	1.87	<0.01	0.05	19460	14.7	102	15262	4115	1529	53.3	36.0
9 times youngmyung bamboo salt		17.3	0.41	411	24.5	0.1	0.6	7538	6.7	1424	2544	8453	2773	1979	35.7

Table 4-9. Mineral contents of various raw yellow mud from various district analyzed with ICP-AES and ICP-MS (unit : ppm)

Mineral District	Cd	Pb	As	Co	Cr	Mn	Cu	Zn	Mg	P	S	K	Ca	Fe	Na
Kimhae	<0.2	80.0	15.6	15.2	93	763	55.6	202	4900	217	369	5600	200	88000	400
Jinjoo	<0.2	6.6	6.8	18.5	69	411	19.6	52	2900	143	234	5800	300	34300	700
Daejun	<0.2	24.1	3.5	14.4	42	515	16.5	84	5100	486	275	15900	500	52600	600
Leechun	<0.2	20.7	6.7	11.7	39	258	18.5	55	2300	270	56	22000	400	39400	800
Naजू	<0.2	20.2	17.8	8.6	61	240	19.9	64	3100	268	151	12400	100	43800	600
Choonchun	<0.2	23.5	7.1	8.0	34	369	14.8	54	5300	333	121	35000	1500	32800	5400

나. 소금의 항균성, 돌연변이, 과산화촉진 및 암세포성장 억제와 소핵실험

1) 소금 종류에 따른 항균효과 실험

소금은 김치발효에 있어서 유해균의 번식을 억제하고 젖산균의 생장을 돕는 작용을 하게 되는데 소금의 종류는 다양하다. 천일염은 서해안의 해수를 모아 태양열과 바람에 의해 수분을 증발시켜 염의 결정을 얻은 것이다. 최근에는 해수 오염과 쓴맛이 있는 간수를 제거한 천일염(생소금)이 나오는 데 이것은 서해안의 천일염을 분쇄

한 후 물세척을 하여 불순물과 간수를 제거한 후 원심 분리한 것을 말한다. 정제된 기계염은 바닷물을 끌어들여 이온교환막을 이용하여 염화나트륨만을 추출한 소금(시약용 NaCl과 기계염)으로 기계적인 대량 생산을 한다. 한편 최근에 시중에 나와 있는 가공염(Processed salt)은 가열공정을 거쳐 가공하는 방법이 공통적인데 천일염을 세라믹 반응로에서 800℃이상 고온으로 2번 구워 불순물과 간수, 유해성분을 제거한 것(구운 소금)과 이보다 높은 온도인 1300℃이상 고온으로 3번 구운 것(생금)것이 있다. 죽염은 우리나라의 사찰 등지에서 제조되어 오던 것으로 천일염을 대나무 속에 다져넣고 1000~1700℃로 가열한 후 9번째 가열하여 소금은 용융되고 식으면 죽염의 결정이 된다.

김치의 초기발효과정에 관여하는 *Leuconostoc mesenteroides*, 김치발효 후기에 관여하여 산패에 관여하는 *Lactobacillus plantarum*, 산막효모로써 *Pichia membranefaciens* 그리고 *E. coli*에 대한 최적 조건에서의 소금의 종류별 항균 실험 결과 *Leu. mesenteroides*에 대한 소금종류별 항균효과의 차이점은 적었으나 기계염이 다른군에 비해 1.7, 2.5, 3.5%의 소금농도에서 다소 높은 항균성을 나타내어 김치젖산균의 원활한 성장을 저해하였다. 모든 시료에서 *Leu. mesenteroides*보다 *Lac. plantarum*의 성장을 더 크게 저해시켰는데 염농도 1.7%, 2.5%에서 죽염의 항균효과가 가장 컸고 그 다음이 기계염이었다. *Pichia membranefaciens*에 대해서는 2.5%에서 시약용 NaCl과 기계염의 항균성이 가장 컸고 그 다음이 죽염이었다. NaCl 1.7%, 2.5% 농도에서 *E. coli*는 모든 소금에서 항균성을 보이지 않았으나 3.5%에서는 시약용 NaCl, 기계염, 죽염이 항균성을 보였다(data생략). 2.5% 염도 김치의 경우 발효시 산의 생성으로 *E. coli*는 대부분 소실되어 검출되지 않으나 김치제품 초기에 미생물에 대해 오염되지 않도록 하는 것이 중요하다 하겠다. 정 등은 김치제조시 보다 철저한 세척과 이에 따른 김치제품의 초기 미생물 제어 효과를 목적으로 전해산화수를 세척 매체로 사용하였는데 원료배추를 1회 세정한 결과 총균수와 대장균수가 1/2로 감소하였고 절임배추를 전해산화수로 세정한 경우 총균수는 1/16수준, 대장균은 검출되지 않았다고 보고하였다.

배추즙액을 이용한 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pichia membranefaciens*에 대한 항균 실험결과, *Leu. mesenteroides*에서의 경우, 소금농도 1.7%에서는 죽염이 가장 항균성이 적었고, 다음이 시약용NaCl, 천일염순으로 항균성이 적었고 2.5%에서는 천일염, 죽염, 생금, 구운소금, 생소금, 시약용 NaCl순으로 항균성이 적어 기계염과 구운소금의 항균성이 가장 커서 김치의 발효에 관여하는 *Leu. mesenteroides*의 성장을 억제하였다. *Leu. mesenteroides*는 소금 함량이 적을수록 산을 많이 생성하는데 소금농도 1~2.25% 이하 농도에서는 산생성이 우세하였으나 소금농도 3.5% 이상에서는 억제되었다고 하였다. *Lac. plantarum*은 최적조건에서와 마찬가지로 *Leu. mesenteroides*보다 더 큰 저해작용을 보였는데 2.5%

농도에서는 구운소금의 항균력이 가장 강했고 그 다음이 시약용 NaCl, 생소금 순서였고, 시약용 NaCl, 생금, 죽염이 비슷한 수준이었다. *Pichia membranefaciens*는 거의 모든 종류의 소금에서 저해를 보이는데 2.5%에서는 천일염이 항균력이 가장 적었다. 즉 배추즙을 이용한 배지에서 염도 2.5% 농도에서 *Leu. mesenteroides*는 시약용 NaCl이 항균력이 가장 컸고 *Lac. plantarum*은 구운소금이, *Pichia membranefaciens*는 생금이 가장 컸다. 천일염이 가장 항균력이 약했다. 최적조건에서 *Leu. mesenteroides*는 기계염이 항균력이 가장 컸고 *Lac. plantarum*은 죽염이, *Pichia membranefaciens*는 기계염이 가장 컸고 역시 천일염이 가장 항균력이 약했다(data생략). 대체적으로 *Leu. mesenteroides*에 대해서는 기계염이 항균력이 크게 나타났으나 *Lac. plantarum* 부패젖산균에 대해서는 가공염 즉 구운소금 및 죽염이 컸었다.

2) 소금 종류별 보들연변이 효과

가) Ames 실험계에서 보들연변이 유발효과

소금을 종류별로 기계염 2종(NaCl시약용, 기계염(한주소금)) 즉, 천일염 2종(서해안 염전(천일염), 생소금), 가공염 3종(구운소금, 생금, 죽염)을 각각 3~25%로 처리하여 Ames실험계에서 보들연변이 유발 실험을 한 결과 모든 처리군에서 MNNG에 대해 보들연변이성이 관찰되었으나 가공염인 구운소금, 생금, 죽염에서는 다소 낮은 보들연변이 효과를 보였다(Fig. 4-1). MNNG만을 처리한 대조군이 plate당 695 ± 27 개의 복귀돌연변이수를 나타내었는데 소금농도 3%에서 시약용 NaCl이 1445 ± 136 개, 기계염이 1837 ± 694 개, 천일염이 1404 ± 198 개, 생소금이 1224 ± 130 개이었으나 가공염인 구운소금은 938 ± 26 개, 생금은 948 ± 17 개, 죽염은 985 ± 122 개로 보들연변이 효과가 기계염에 비해 훨씬 낮아지는 결과를 보였다. 이것은 가공염은 순수한 NaCl이외에 다른 미네랄성분들이 7%이상 함유되어 있음으로 인한 것으로 추측된다. 또한 25%의 고염농도에서 NaCl과 다른 소금은 1671~2084로 큰 보들연변이성을 보였으나 죽염은 1254 ± 17 개의 다소 낮은 복귀돌연변이수를 나타내었다.

나) SOS chromotest에서 보들연변이 효과

SOS chromotest에서 보들연변이 효과를 살펴 보기위해 *E. coli*의 변이주인 PQ37를 이용하였는데 PQ37은 정상적인 lacZ gene이 제거되고 sfiA gene에 삽입하여 repressor protein에 의해 lock되어 있다. Genotoxic 한 물질이 들어오면 spiliting 되어 lacZ gene이 발현되어 β -galactosidase의 활성을 띄게 되는데 발색제로는 ONPG와 PNPP를 이용한다. NaCl에 대한 dose response를 행한 후, MNNG를 well당 20ng처리하고 NaCl의 농도를 0.1~600 μ g까지 처리한 결과 β -galactosidase의 활성은 0.1~100 μ g처리시까지 증가하여 well당 10 μ g~100 μ g처리시에 보들연변이 효과를 나타내었다. 소금종류별 각 well당 20~100 μ g을 처리한 AFB₁에 대한 결과는 Table 4-10과 같다. 20 μ g의 낮은 농도에서는 소금의 보들연변이 효과가 나타나지 않았으나 100 μ g의

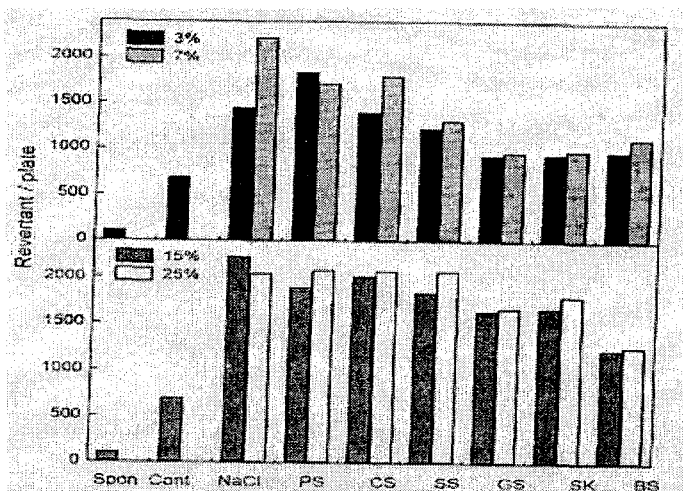


Fig. 4-1. Comutagenic effect of various kinds of salt on the mutagenicities induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.17 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.
(NaCl ; reagent grade, PS ; Purified salt, CS ; Chunil salt, SS ; Saeng salt, GS ; Gueun salt, SK ; Saeng kum, BS ; Bamboo salt)

Table 4-10. Comutagenic effects of various salts with different concentrations on the induction of SOS function by aflatoxin B₁(AFB₁, 10ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample concentration	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		$(\beta)/(\rho)$	SOS induction factor
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit		
Spontaneous Control	0.71 \pm 0.05	35.5	0.84 \pm 0.03	42.2	0.8	1.0
	1.88 \pm 0.03	94.0	0.85 \pm 0.01	42.6	2.2	2.8
20 μ g/plate						
NaCl	1.63 \pm 0.05	81.6	0.86 \pm 0.07	43.1	1.9	2.4
Purified salt	2.07 \pm 0.10	103.4	0.97 \pm 0.13	48.5	2.1	2.6
Chunil salt	1.96 \pm 0.29	97.8	0.96 \pm 0.00	47.9	2.0	2.5
Seang salt	1.86 \pm 0.07	93.2	0.85 \pm 0.09	42.5	2.1	2.5
Gueun salt	1.69 \pm 0.03	84.4	0.83 \pm 0.02	41.3	2.0	2.6
Seang Kum	1.66 \pm 0.12	83.1	0.86 \pm 0.17	42.8	1.9	2.5
Bamboo salt	1.78 \pm 0.01	89.0	0.88 \pm 0.05	43.9	2.0	2.5
100 μ g/plate						
NaCl	2.14 \pm 0.26	106.8	0.90 \pm 0.10	45.0	2.4	3.0
Purified salt	2.13 \pm 0.08	106.5	0.85 \pm 0.05	42.7	2.5	3.1
Chunil salt	2.02 \pm 0.12	101.2	0.81 \pm 0.00	40.7	2.5	3.1
Seang salt	2.18 \pm 0.10	109.0	0.86 \pm 0.03	42.8	2.5	3.1
Gueun salt	1.89 \pm 0.00	94.7	0.87 \pm 0.03	43.3	2.1	3.1
Seang Kum	1.71 \pm 0.09	85.4	0.85 \pm 0.02	42.7	2.0	2.6
Bamboo salt	1.83 \pm 0.11	91.5	0.91 \pm 0.16	45.4	2.0	2.5

고농도에서는 생금과 죽염을 제외한 다른 소금들은 약한 보돌연변이 효과가 있었다. Table 4-11에서 20 μ g처리시에 기계염이 유일하게 MNNG에 대해 보돌연변이 효과를 보였다. 100 μ g처리시 시약용 NaCl, 기계염, 천일염, 생소금은 보돌연변이 효과가 있었으나 구운소금, 생금은 없었고 죽염은 항돌연변이 효과를 나타내었다. SOS chromotest실험계에서는 죽염이 가장 효과가 좋아서 20과 100 μ g처리시 항돌연변이 효과를 보였다. 결국 소금에 의한 보돌연변이 효과도 소금종류에 따라 그 정도가 다른 것으로 나타났고 기계염은 보돌연변이 효과를 보였으나 가공염은 그 효과를 낮추거나 항돌연변이 효과를 나타내었다.

Table 4-11. Comutagenic effects of various salts with different concentrations on the induction of SOS function by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 20ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample concentration	β -Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit		
Spontaneous	0.60 ± 0.04	29.9	0.29 ± 0.04	14.5	2.1	1.0
Control	1.30 ± 0.07	66.5	0.28 ± 0.05	13.9	4.8	2.3
20 μ g/plate						
NaCl	1.56 ± 0.04	78.0	0.34 ± 0.01	17.0	4.6	2.2
Purified salt	1.48 ± 0.07	74.2	0.29 ± 0.04	14.6	5.1	2.4
Chunil salt	1.41 ± 0.16	70.7	0.32 ± 0.08	16.2	3.5	1.7
Seang salt	1.42 ± 0.14	71.0	0.43 ± 0.09	21.6	3.3	1.6
Gueun salt	1.49 ± 0.13	72.1	0.38 ± 0.00	18.9	3.8	1.5
Seang Kum	1.36 ± 0.10	68.2	0.39 ± 0.13	23.0	3.0	1.4
Bamboo salt	1.32 ± 0.16	66.2	0.43 ± 0.09	22.6	2.9	1.4
100 μ g/plate						
NaCl	1.65 ± 0.06	82.5	0.30 ± 0.05	16.8	4.9	2.3
Purified salt	1.80 ± 0.09	90.1	0.36 ± 0.07	17.8	5.1	2.4
Chunil salt	1.60 ± 0.07	80.2	0.32 ± 0.03	16.0	5.0	2.4
Seang salt	1.62 ± 0.05	81.0	0.30 ± 0.06	15.2	5.3	2.5
Gueun salt	1.59 ± 0.01	79.3	0.33 ± 0.06	16.6	4.8	2.3
Seang Kum	1.56 ± 0.20	77.9	0.36 ± 0.00	16.8	4.6	2.2
Bamboo salt	1.51 ± 0.20	75.4	0.30 ± 0.06	22.3	3.4	1.6

다) Ames test를 이용한 NaCl의 보돌연변이 유발기작

NaCl이 보돌연변이를 유발시키는 기작으로 추정되는 몇 가지 기작으로 활성화단계(activation), 초기단계(initiation), 촉진단계(promotion)를 거쳐 진행단계(progression)로 진행되어 악성종양으로 발전한다. 먼저 활성화단계로 NaCl이 MNNG의 화학반응에 의해 돌연변이원의 활성을 돕는 경우로 NaCl과 MNNG를 반응시킨 후 균주에 처리하고 배양한 경우, 보돌연변이성을 증가시키지 못했다. 다음이 초기단계

(initiation)인데 NaCl로 TA100 균체에 손상을 준 후 MNNG를 처리한 후 배양했을 때 보돌연변이성이 333 ± 29 개에서 431 ± 8 로 약간 증가하였다. 마지막으로 촉진단계 (promotion)로 복귀 돌연변이가 일어난 균체에 대한 NaCl의 영향을 살펴보기 위해 MNNG로 균주를 돌연변이 시킨 후 NaCl을 처리하여 배양시킨 경우 723 ± 36 에서 942 ± 48 로 증가되어 보돌연변이 효과를 관찰할 수 있었다. 이로써 NaCl은 발암단계 중 초기단계와 촉진단계에 관여하는 것으로 생각된다. 이것은 또한 NaCl이 lipid oxidation에 관여하여 산화를 촉진시킴으로 생성된 free radical의 생성과 관련된 것으로도 추정된다.

3) 소금종류별 과산화촉진능

노의 MDA 함량은 *in vivo*의 다른 기관이나 위점막에서 지질과산화상태의 직접적인 측도로 인식되며 TBA와 반응시켜 측정하는데 NaCl이 표적조직에서 지질과산화를 증가시켜 위점막과 노에서 NaCl의 농도가 증가함에 따라 malondialdehyde가 증가되었다고 보고하였다. NaCl을 2~4% 첨가한 식이를 5주 동안 feeding한 결과 분문부에서 지질과산화의 증가와 평행하여 점막세포의 증식이 증가되었다. 이것으로 식이 중 소금은 위점막에서 지질과산화에 영향을 끼쳐 세포증식에 관여한다. 그러므로 소금의 보발암 효과에 대한 기전을 추정하기 위한 방법으로 소금의 과산화 촉진효과를 비교 실험하였다. 0.2~2%의 NaCl을 처리하여 linoleic acid의 autooxidation에 관여하는 소금의 영향을 본결과 0.4%에서 과산화를 촉진하여 0.6%에서 최대를 보이나 그보다 높은 농도에서는 다시 낮아졌다. 그러므로 소금의 상대적인 차이를 보기 위해 0.4%농도에서 기계염 2종(NaCl시약용, 기계염)과 천일염 2종(서해안 염전, 생소금) 그리고 가열처리 공정을 거친 가공염 3종(구운 소금, 생금, 죽염)을 각각 실험에 이용하여 과산화 효과를 측정하였다. Talbe 4-12에서 보는 바와 같이 죽염이 과산화촉진효과가 가장 낮았고 그 다음이 천일염과 간수를 제거한 생소금 그리고 가공염인 구운소금과 생금이었고 기계염이 가장 과산화 효과가 컸다. Watts와 Peng은 NaCl, MgCl₂, Na₂NO₃, sodium acetate, potassium nitrate가 동결 중에 생돼지고기에 산패를 촉진시키는 효과가 있으나 KCl는 그러한 효과가 없었으며 Zipser 등은 KCl가 산패진행을 다소 저해한다고 보고하였다. 육가공품에서 산패를 예방하고 감소시키기 위해 KCl로 NaCl을 대체하는 것은 NaCl을 50% 감소시키는 것보다 효과적이라고 보고한 바 있다. 결국 소금의 과산화촉진능은 KCl과 같은 염과의 혼합염 개발로 극복되리라 사료된다.

4) 소금 종류별 암세포 성장저해 효과 실험

가) HT-29 암세포를 이용한 성장저해 효과

HT-29 결장암세포를 이용한 NaCl에 대한 dose response 실험을 행한 결과 대조군은 37°C, 6일간 배양한 경우 5.4×10^5 cells/well이었으나 12.5 μ g처리시 4.6×10^5 cells/well로 약간 감소하고 25 μ g처리시 3.7×10^5 cells/well을 보인 후 비슷한 수준으로 유지되었으며 800 μ g처리시에는 급격한 감소를 보였다. 그러므로 소금의 농도

를 1, 5, 10, 20 μ g으로 처리하여 배양한 후 각 소금종류에 따른 비교 실험을 행하였다. Table 4-13과 같이 5 μ g씩 처리했을때 시약용 NaCl이 26%, 기계염이 19%, 천일염 ; 33%, 생소금 ; 31%, 구운소금 ; 60%, 생금 ; 57%, 죽염 ; 50%의 저해를 보여 소금종류별 차이가 있었고 일반적으로 가공염이 암세포성장억제 효과가 컸었다.

Table 4-12. Effects of various salts(0.4% solution) on the autooxidation(peroxide value) of linoleic acid incubated for 24hr at 50 $^{\circ}$ C

Sample(o.4%)	POV(meg/kg)
Control	632 \pm 64 ^a
NaCl	840 \pm 15 ^{bc}
Purified salt	948 \pm 38 ^c
Chunil salt	764 \pm 90 ^b
Seang salt	767 \pm 7 ^b
Gueun salt	817 \pm 75 ^b
Seang Kum	823 \pm 76 ^b
Bamboo salt	727 \pm 112 ^{ab}

^{a-b} Means with the different letters beside the data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 4-13. Inhibitory effects of various salt on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation at 37 $^{\circ}$ C (cell numbers \times 10⁴/ml)

Concentration per well	1 μ g	5 μ g	10 μ g	20 μ g
NaCl(Reagent grade)	32 \pm 3 (24) ¹	31 \pm 1 (26)	36 \pm 7 (14)	35 \pm 3 (17)
Purified salt ²	34 \pm 6 (19)	34 \pm 6 (19)	30 \pm 6 (29)	40 \pm 7 (5)
Chunil salt	35 \pm 1 (17)	28 \pm 4 (33)	26 \pm 1 (38)	30 \pm 6 (29)
Saeng salt	34 \pm 4 (19)	29 \pm 11 (31)	30 \pm 1 (29)	30 \pm 4 (29)
Gueun salt	32 \pm 5 (24)	17 \pm 3 (60)	18 \pm 5 (57)	12 \pm 7 (71)
Saeng Kum	20 \pm 0 (52)	18 \pm 7 (57)	15 \pm 7 (64)	13 \pm 5 (69)
Bamboo salt	24 \pm 2 (43)	21 \pm 8 (50)	21 \pm 8 (50)	21 \pm 12 (50)

Control cell numbers/well was 42 \pm 6 \times 10⁴/well

¹ Inhibition rate(%)

² Hanju salt

나) HT-29 암세포를 이용한 DNA 합성 저해효과

같은 농도인 1, 5, 10, 20 μ g/well를 처리한 후 24시간 후 암세포의 DNA합성 저해 효과를 본 결과, 역시 5 μ g에서 시약용 NaCl이 12%, 기계염 ; 12%, 천일염 ; 8%, 생소금 ; 12%, 구운소금 ; 32%, 생금 ; 33%, 죽염 ; 36%의 저해를 보여 가공염이 암세포의 DNA합성을 억제하는 효과가 크게 나타나 소금종류별 차이가 있었다(Table 4-14).

Table 4-14. [³H] thymidine incorporation at different concentration of various salts in HT-29 human colon carcinoma cells

Concentration per well	1 µg	5 µg	10 µg	20 µg
NaCl(Reagent grade)	1.65 ± 0.06 (20)	1.80 ± 0.09 (12)	1.48 ± 0.44 (28)	1.86 ± 0.33 (10)
Purified salt ¹	2.00 ± 0.67 (3)	1.82 ± 0.29 (12)	1.22 ± 0.17 (40)	2.17 ± 0.04 (-5)
Chunil salt	2.03 ± 0.96 (1)	1.89 ± 0.12 (8)	1.13 ± 0.23 (45)	1.82 ± 0.02 (12)
Saeng salt	1.91 ± 0.17 (7)	1.81 ± 0.17 (12)	1.44 ± 0.23 (30)	1.55 ± 0.31 (25)
Gueun salt	2.08 ± 0.51 (1)	1.40 ± 0.19 (32)	0.37 ± 0.08 (82)	0.42 ± 0.02 (79)
Saeng Kum	1.92 ± 0.68 (7)	1.38 ± 0.05 (33)	0.35 ± 0.10 (83)	0.30 ± 0.01 (85)
Bamboo salt	1.65 ± 0.75 (20)	1.31 ± 0.20 (36)	0.81 ± 0.14 (61)	0.66 ± 0.30 (68)

Control cell thymidines/well is $2.06 \pm 0.36 \times 10^3$

¹ Hanju salt

다) SRB assay를 이용한 HT-29 결장암 및 AGS위암세포의 세포 독성효과

SRB assay를 이용한 실험에서 NaCl에 대해 HT-29 cell의 dose response 실험을 행한 결과 각 well당 12.5~400µg까지는 거의 차이가 없어 대조구의 O.D. 값이 0.263인데 대해 NaCl처리구는 0.260~0.288까지 보였으나 400~600µg처리시 약간의 감소를 보이고 1600µg에서 급격히 줄어 들었다. 한편 각각의 소금을 200, 400, 600, 800µg처리하여 실험에 이용한 결과 800µg/well처리시 시약용 NaCl은 31%, 기계염; 23%, 천일염; 44%, 생소금; 33%, 구운소금; 71%, 생금; 64%, 죽염; 68%의 저해를 보였으며 200µg/well 처리시 죽염만이 50%이상 저해시켰다(결과 생략). 소금종류별 AGS위암세포에 대한 세포독성 실험에서도 결과에서도 가공염이 정제염이나 천일염보다는 암세포성장을 억제하는 효과가 컸었다. 결국 소금은 가공염이 주로 암세포 성장 및 DNA합성을 억제하는 효과가 컸지만 일반적으로 발암물질로 인한 comutagenicity와는 달리 암세포 성장을 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 차이는 소금사용농도, 소금의 종류와 다른 주위 환경들에 의해 영향을 받게되는 것이라고 사료된다. 이 실험결과에서 가공염은 발암물질에 의한 발암성을 돕는 역할을 감소시키며 암세포의 성장을 억제하는 특이한 생리적 역할을 하는 것으로 나타났다.

5)소금종류별 소핵유발 촉진/억제 효과

In vitro 돌연변이유발 실험계에서 정제염인 한주소금보다 가공염인 구운소금과 죽염이 유리한 것으로 나타나 이를 *in vivo*에서 확인하기 위해 마우스의 말초혈을 이용한 micronucleus assay를 하였다. MMC 1mg/kg을 복강투여하기 6시간 전에 한주소금, 구운소금, 죽염을 각각 1000mg/kg, 2000mg/kg, 3000mg/kg을 경구로 투여하여 소금이 소핵유발에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 4-2). 한주소금은 모든 농도에서 소핵유발을 크게(p<0.05)촉진하였다. 반면 구운소금과 죽염은 1000mg/kg에서는 대조군과 비슷한 소핵유발 빈도를 보였고 2000mg/kg에서는 유의성있는 소핵유발 억제효과를 보여

적당한 농도에서는 종류에 따라 달라질 수는 있으나 소금이 유리하게 작용할 수 있음을 확인하였다. 3000mg/kg 농도에서도 구운소금과 죽염은 한주소금보다는 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮은 소핵유발빈도를 나타내어 돌연변이유발 억제 측면에서 정제염보다는 가공염이 식탁염 및 김치 절임염으로 유리할 것으로 생각된다. 가공염 특히 죽염이 암을 예방하는 효과가 가장 컸기에 관련된 연구결과를 “항암성 죽염”이라는 명칭으로 특허출원을 하였다(출원번호: 99-36372).

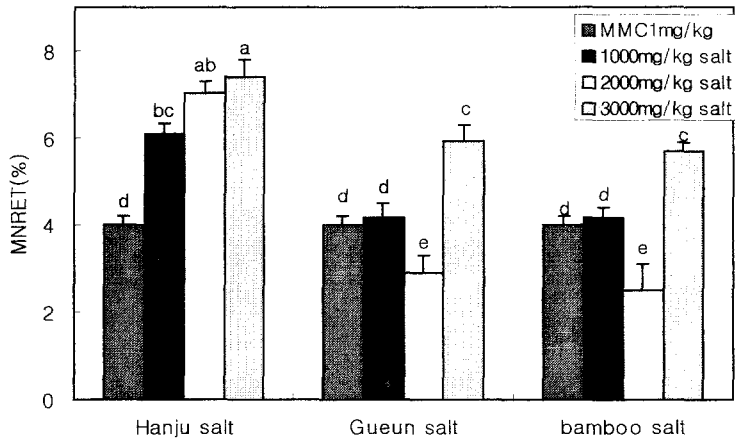


Fig. 4-2. Micronucleated reticulocyte(MNRET) frequency in the mouse peripheral blood micronucleus test after administration of various salt followed by MMC
^{a,d} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2. 젓갈의 안전성 연구

김치재료 중 직접 사용하는 소금을 제외하고 젓갈은 소금을 20~25% 정도 함유하고 있기에 간접적으로 소금의 주요 source가 된다. 그리고 젓갈은 2급 아민의 source 및 heteroamine의 source 등으로 그 안전성의 연구가 필요하다.

멸치젓갈은 멸치에 소금을 첨가하여 12-18개월간 실온에서 발효시켜 제조되며 김치 발효에서 맛과 염도를 맞추어 주는 매우 중요한 김치재료이다. 원료인 멸치에 소금을 첨가하여 제조하므로 소금첨가에 따른 돌연변이 유발성이 유도될 수 있으며 발효과정에서 생성될 수 있는 여러 가지 불활성 아민에 의해 돌연변이가 유발될 수 있다. 멸치젓 원료 및 발효된 멸치젓의 돌연변이 유도 여부를 관찰하기 위하여 생멸치, 생멸치에 소금을 첨가한 것, 6개월간 발효된 멸치젓 건더기 및 액 그리고 12개월간 발효된 멸치젓 등을 동결건조한 후 메탄을 추출하여 돌연변이성을 검토하였다. 또한 젓갈을 다렸을 때의 돌연변이성을 살펴보기 위하여 12개월간 발효된 멸치젓 원액을 다린 것도 함께 돌연변이성 실험을 하였다.

가. Ames 실험계에서 멸치젓추출물의 돌연변이 및 보돌연변이 유발효과

Ames 실험계에서 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 생멸치 및 멸치젓갈 메탄올 추출물 자체의 돌연변이 유발성을 농도별로 검토한 결과는 Table 4-15와 같다. 시료 0.125~0.5 mg/plate 첨가농도에서는 모든 시료가 돌연변이 유발성을 보이지 않았다. 자연복귀돌연변이수 126 ± 12 개에 비해 생멸치 메탄올추출물은 1.25 mg/plate첨가농도 부터 돌연변이성이 높아지기 시작하여 5 mg/plate첨가농도에서는 311 ± 13 개의 복귀돌연변이 수를 나타내었다. 생멸치에 20%의 소금을 첨가한 시료의 경우는 2.5 mg/plate 와 5 mg/plate 첨가농도에서 각각 생멸치 메탄올추출물보다 2배 이상 많은 556 ± 21 , 665 ± 29 개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 생멸치에 소금이 첨가되면 유의적으로 돌연변이가 더 많이 유발됨을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 5 mg/plate 첨가농도에서 소금에 절인 멸치는 665 ± 29 , 6개월간 발효된 멸치젓의 건더기는 458 ± 20 , 6개월액은 271 ± 13 , 12개월액은 321 ± 33 개의 복귀돌연변이수를 나타내어 발효되면서 돌연변이 유발성이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

Table 4-15. Effect of methanol extracts from anchovy and fermented anchovy on the mutagenicity in the *Salmonella typhimurium* TA100

Sample(mg/plate)	Revertants/plate					
	0.125	0.25	0.5	1.25	2.5	5
Spon	126 ± 12^{bc}	126 ± 12^c	126 ± 12^c	126 ± 12^d	126 ± 12^c	126 ± 12^e
Raw anchovy	160 ± 15^a	171 ± 8^a	191 ± 18^a	231 ± 19^b	259 ± 21^{cd}	311 ± 13^c
Raw anchovy + salt ¹⁾	125 ± 3^{bcd}	130 ± 4^c	154 ± 13^b	278 ± 6^a	556 ± 21^a	665 ± 29^a
6 months FAS ²⁾	115 ± 6^{cd}	115 ± 8^c	129 ± 2^c	235 ± 20^b	356 ± 30^b	458 ± 20^b
6 months FAL ³⁾	133 ± 6^d	153 ± 4^b	156 ± 10^b	180 ± 6^c	224 ± 29^d	271 ± 13^d
12 months FAJ ⁴⁾	108 ± 9^d	124 ± 8^c	135 ± 8^{bc}	171 ± 10^c	270 ± 16^c	321 ± 33^c

¹⁾Raw anchovy : salt = 80 : 20

²⁾Fermented anchovy solid

³⁾Fermented anchovy liquid

⁴⁾Fermented anchovy juice

^{a-f} Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

멸치 및 멸치젓 메탄올 추출물을 0.625~2.5 mg/plate로 처리하여 Ames test에서 보돌연변이 유발실험을 한 결과는 Table 4-16과 같다. 생멸치 메탄올 추출물은 0.625 mg/plate와 1.25 mg/plate 첨가농도에서 각각 427 ± 23 , 484 ± 20 개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 항돌연변이 효과를 나타내었다. 생멸치 메탄올추출물은 2.5 mg/plate를 첨가했을 때 대조군보다 유의적으로 많은 804 ± 16 개의 복귀돌연변이수를 나타내었다 ($p < 0.05$). 소금에 절인 멸치 메탄올추출물은 0.625mg/plate 첨가농도에서는 512 ± 18 개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 보돌연변이성을 나타내지 않았으나, 2.5 mg/plate 첨가농도에서는 981 ± 44 개의 많은 복귀돌연변이수를 나타내어 생멸치에 소금을 첨가

했을 때 유의적으로 보들연변이 유발이 촉진됨을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 모든 첨가농도에서 발효된 멸치젓이 생멸치나 소금에 절인 멸치보다 높은 보들연변이 유발성을 보였으나, 12개월간 발효시킨 멸치젓같이 6개월간 발효시킨 멸치젓같보다 유의적으로 낮은 보들연변이성을 나타내었다 ($p < 0.05$).

Table 4-16. Comutagenic effect of methanol extracts from anchovy and fermented anchovy on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine(MNNG; 0.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate		
	0. 625mg/plate	1. 25mg/plate	2. 5mg/plate
Spontaneous	90 ± 11	90 ± 11	90 ± 11
Control	606 ± 28 ^c	606 ± 28 ^e	606 ± 28 ^f
Raw anchovy	427 ± 23 ^e	484 ± 20 ^f	804 ± 16 ^g
Raw anchovy + salt ¹⁾	512 ± 18 ^d	660 ± 30 ^d	981 ± 44 ^d
6 months FAS ²⁾	975 ± 47 ^b	1184 ± 21 ^b	1327 ± 20 ^b
6 months FAL ³⁾	1136 ± 22 ^a	1260 ± 32 ^a	1490 ± 18 ^a
12 months FAJ ⁴⁾	957 ± 31 ^b	1051 ± 40 ^c	1187 ± 26 ^c

1) Raw anchovy : salt = 80 : 20

2) Fermented anchovy solid

3) Fermented anchovy liquid

4) Fermented anchovy juice

^{a~f} Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Ames test에서 histidine첨가량을 높이면 돌연변이 유발이 증진되는데 멸치젓같은 histidine함량이 높으므로 histidine이 복귀돌연변이수를 증가시켰을 가능성이 있다. 따라서 12개월간 발효시킨 멸치젓같은 histidine함량을 측정된 결과 12개월간 발효시킨 멸치젓같은 메탄올추출물 5000 μg 에는 16 μg 의 histidine이 함유되어 있었다. Ames test에서 histidine이 돌연변이유발에 미치는 영향을 살펴본 결과 (Table 4-17), histidine 자체로도 농도 의존적으로 돌연변이를 증가시켜 32 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서는 자연복귀돌연변이수의 2배정도의 복귀돌연변이수를 나타내었다. 또한 histidine을 MNNG와 함께 처리하였을 때 12개월간 발효시킨 멸치젓같은 것보다 낮은 보들연변이 유발성이 있었다 ($p < 0.05$). 12개월간 발효시킨 멸치젓같은 것을 동결건조하여 메탄올추출물을 제조하였으므로 많은 양의 소금을 함유하고 있다. MNNG에 의한 돌연변이 실험에서 소금과 histidine을 함께 첨가해 본 결과(Table 4-18), 12개월간 발효시킨 멸치액젓 2.5 mg에 함유된 천일염 1.4 mg과 histidine 8 μg 은 2310 ± 17개의 복귀돌연변이수를 나타내어 12개월간 발효시킨 멸치액젓 (1140 ± 29개)보다 2배 이상 높은 보들연변이성을 보였다. 따라서 histidine의 함량이 높은 멸치젓같은 것의 안전성을 Ames test로만 판정하는 것은 바람직하지 못한 것으로 생각된다.

Table 4-17. Effect of methanol extracts from fermented anchovy and histidine on the mutagenicity without or with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG ; 0.2 μ g/plate) in the *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Concentration (μ g/plate)	Revertants/plate	
		MNNG -	MNNG +
Spontaneous Control (MNNG)		108 \pm 10 ^d	108 \pm 10 621 \pm 34 ^e
12 months FAJ ¹⁾	2500	308 \pm 18 ^a	1103 \pm 34 ^a
Histidine	4	126 \pm 12 ^d	681 \pm 29 ^d
	8 ²⁾	134 \pm 20 ^{cd}	752 \pm 34 ^c
	16	153 \pm 12 ^c	798 \pm 37 ^{bc}
	32	189 \pm 9 ^b	832 \pm 19 ^b

¹⁾ Fermented anchovy juice

²⁾ 2500 μ g of methanol extract from fermented anchovy juice contains 8 μ g of histidine

^{a-e} Means with the different letters in the same column are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test

Table 4-18. Comutagenic effect of methanol extracts from fermented anchovy, salt, histidine and histidine+salt on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG ; 0.2 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate
Spontaneous Control	127 \pm 9 793 \pm 33 ^e
12 months FAJ ¹⁾ 2.5mg	1140 \pm 29 ^e
Chunil salt 0.7mg	937 \pm 32 ⁱ
1.4mg	1617 \pm 54 ^d
Chunil salt 1.4mg+ histidine 4 μ g	2239 \pm 16 ^c
8 μ g ²⁾	2310 \pm 17 ^b
16 μ g	2369 \pm 20 ^a

¹⁾ Fermented anchovy juice

²⁾ 2.5mg of methanol extract from fermented anchovy juice contains chunil salt 1.4mg and 8 μ g of histidine

^{a-f} Means with the different letters in the same column are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test

나. SOS Chromotest

시료에 함유된 histidine에 의해 영향을 받지 않는 SOS chromotest에서의 보돌연변이 효과를 살펴보기 위해 *E. coli*의 변이주인 PQ37을 이용하여 MNNG에 대한 보돌연변이 실험을 하였다. 먼저 멸치 및 멸치젓 메탄올추출물 자체의 돌연변이 유발성을 검토한 결과는 Table 4-19와 같다. Ames test에서와는 달리 모든 시료가 돌연변이 유발성을 나타내지 않았다. MNNG와 함께 멸치 및 멸치젓의 메탄올추출물을 각 well 당 25-100 μ g을 처리한 결과 (Table 4-20), 25, 100 μ g 처리시 생멸치 메탄올추출물은 각각 13, 35%의 돌연변이 유발 저해효과를 보였다. 그러나 소금을 첨가한 생멸치 메탄올추출물은 25 μ g의 낮은 농도에서도 대조군과 같은 2.97의 SOS induction factor

Table 4-19. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy in *E. coli* PQ37

Sample	β-Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit		
Spontaneous	0.523±0.01	17.4	0.424±0.02	14.1	1.23	1.00
25μg/plate						
Raw anchovy	0.537±0.02	17.9	0.447±0.01	14.9	1.20	0.98
Raw anchovy+salt ¹⁾	0.512±0.03	17.1	0.453±0.01	15.1	1.13	0.91
6 months FAS ²⁾	0.534±0.02	17.8	0.436±0.02	14.5	1.23	1.00
6 months FAL ³⁾	0.519±0.01	17.3	0.448±0.03	14.9	1.16	0.91
12 months FAJ ⁴⁾	0.510±0.01	17.0	0.465±0.01	15.5	1.10	0.89
100μg/plate						
Raw anchovy	0.526±0.01	17.5	0.441±0.02	14.7	1.19	0.97
Raw anchovy+salt ¹⁾	0.543±0.01	18.1	0.425±0.01	14.2	1.27	1.03
6 months FAS ²⁾	0.524±0.05	17.5	0.431±0.01	14.4	1.22	0.99
6 months FAL ³⁾	0.538±0.07	17.9	0.435±0.01	14.5	1.17	0.95
12 months FAJ ⁴⁾	0.533±0.01	17.8	0.426±0.01	14.2	1.25	1.06

¹⁾Raw anchovy : salt = 80 : 20 ²⁾Fermented anchovy solid ³⁾Fermented anchovy liquid

⁴⁾Fermented anchovy juice

Table 4-20. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy against N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample	β-Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit			
Spontaneous	0.490±0.01	16.3	0.424±0.02	14.1	1.16	1	
Control	1.498±0.04	49.9	0.436±0.01	14.5	3.44	2.97	
25μg/plate							
Raw anchovy	1.500±0.02	50	0.471±0.01	15.7	3.15	2.71	13
Raw anchovy+salt ¹⁾	1.641±0.03	54.7	0.475±0.01	15.7	3.45	2.97	-
6 months FAS ²⁾	1.439±0.02	48.0	0.455±0.02	15.2	3.16	2.72	13
6 months FAL ³⁾	1.437±0.01	47.9	0.466±0.03	15.5	3.08	2.65	16
12 months FAJ ⁴⁾	1.411±0.01	47.0	0.465±0.01	15.5	3.03	2.61	18
100μg/plate							
Raw anchovy	1.173±0.01	39.1	0.441±0.02	14.7	2.66	2.29	35
Raw anchovy+salt ¹⁾	1.736±0.1	57.9	0.408±0.01	13.6	4.26	3.67	-
6 months FAS ²⁾	1.271±0.05	42.4	0.381±0.01	12.7	3.34	2.88	5
6 months FAL ³⁾	1.282±0.07	42.7	0.394±0.01	13.1	3.25	2.80	9
12 months FAJ ⁴⁾	1.284±0.01	42.8	0.413±0.01	13.8	3.11	2.68	15

¹⁾Raw anchovy : salt = 80 : 20 ²⁾Fermented anchovy solid ³⁾Fermented anchovy liquid

⁴⁾Fermented anchovy juice

를 나타냈고 100 μg첨가농도에서는 3.67의 높은 SOS induction factor를 나타내어 소금의 첨가로 보들연변이성이 높아짐을 확인할 수 있었다. 발효된 멸치젓 메탄올추출물은 25 μg첨가시 13-18%의 항들연변이 효과를 보였으나 첨가농도가 100 μg으로 높아

지면서 5-15%로 오히려 돌연변이 억제효과가 감소되었고, 또한 생멸치 (35%)보다 낮은 돌연변이 유발 억제효과를 보였다. 따라서 첨가되는 소금 농도가 높아지면 β -galactosidase의 활성이 높아져 보돌연변이를 유발한 것으로 보인다.

멸치젓갈에서 돌연변이 유발물질 및 활성물질을 찾기 위해서 멸치젓갈의 메탄올추출물을 hexane추출물과 methanol soluble fraction (MSF)으로 나누어 SOS chromotest를 하였다. 이 경우 젓갈에 사용되는 주요 침장원인 소금은 수용성물질로 MSF에 존재하며 hexane 추출물에는 지방산을 포함한 지용성 물질들이 남게된다. 50 μ g/well과 100 μ g/well 첨가농도에서 모두 소금에 절인 멸치의 MSF는 메탄올추출물보다 보돌연변이성이 높았다(Table 4-21). 12개월간 발효시킨 멸치젓갈 역시 메탄올추출물은 항돌연변이 효과를 나타낸 반면 MSF는 항돌연변이효과를 나타내지 못했다.

따라서 멸치젓갈 제조시 멸치에 소금이 첨가되어(생젓갈) 돌연변이 유발이 일어날 수 있지만 숙성기간이 길어지면(12개월, 익은 젓갈) 오히려 항돌연변이 효과가 있는 것으로 나타났다. 충분히 발효된 젓갈은 김치나 그 외 음식물에 첨가, 사용되어도 그 안전성에는 문제가 없을 것으로 보인다.

Table 4-21. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy against N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Conc. (μ g/well)	Sample	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		$(\beta)/(p)$	SOS induction factor	Inhibition rate(%)	
		OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit				
	Spon Control(MNNG)	0.656 \pm 0.01	21.9	0.457 \pm 0.01	15.2	1.43	1.00		
		1.300 \pm 0.01	43.3	0.456 \pm 0.01	15.2	2.85	1.99		
50	Raw anchovy	MeOH ext.	1.191 \pm 0.01	39.7	0.449 \pm 0.01	15.0	2.65	1.85	14
		Hexane ext.	1.245 \pm 0.01	41.5	0.455 \pm 0.01	15.2	2.73	1.90	9
		MSF	1.083 \pm 0.01	36.1	0.433 \pm 0.01	14.4	2.50	1.74	25
	Raw anchovy +Chunil salt ¹⁾	MeOH ext.	1.288 \pm 0.01	42.9	0.429 \pm 0.01	14.3	3.04	2.13	-14
		Hexane ext.	1.207 \pm 0.01	47.0	0.442 \pm 0.01	14.7	2.73	1.90	9
		MSF	1.339 \pm 0.01	44.6	0.421 \pm 0.01	14.0	3.18	2.22	-23
	Chunil salt ²⁾	1.478 \pm 0.01	49.3	0.525 \pm 0.01	17.5	2.82	1.97	1	
12 months FAJ ³⁾	MeOH ext.	1.237 \pm 0.01	41.2	0.477 \pm 0.01	15.9	2.59	1.81	17	
		MSF	1.340 \pm 0.01	44.7	0.483 \pm 0.01	16.1	2.77	1.93	5
100	Raw anchovy	MeOH ext.	1.077 \pm 0.01	35.9	0.445 \pm 0.01	14.8	2.42	1.69	30
		Hexane ext.	1.151 \pm 0.01	38.4	0.460 \pm 0.01	15.3	2.50	1.75	24
		MSF	1.017 \pm 0.01	33.9	0.440 \pm 0.01	14.7	2.31	1.61	38
	Raw anchovy +Chunil salt	MeOH ext.	1.414 \pm 0.01	47.1	0.446 \pm 0.01	14.9	3.17	2.21	-22
		Hexane ext.	1.175 \pm 0.01	39.2	0.445 \pm 0.01	14.9	2.64	1.85	14
		MSF	1.464 \pm 0.01	59.4	0.447 \pm 0.01	14.8	3.27	2.29	-30
		Chunil salt ⁴⁾	1.600 \pm 0.05	53.3	0.543 \pm 0.01	18.1	2.95	2.06	-8
	12 months FAJ	MeOH ext.	1.265 \pm 0.01	42.2	0.483 \pm 0.01	16.1	2.61	1.83	15
			MSF	1.412 \pm 0.01	47.1	0.500 \pm 0.01	16.7	2.82	1.97

¹⁾Raw anchovy : salt = 80 : 20, ²⁾25 μ g/well, ³⁾Fermented anchovy juice, ⁴⁾50 μ g/well

다. 젓갈의 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity 억제 및 항발암효과

멸치, 소금에 절인 멸치, 12개월간 발효된 멸치액젓의 메탄올추출물은 MCA의 C3H/10T1/2 cell에 대한 cytotoxicity를 억제하는 것으로 나타났다(Table 4-22). 생멸치는 0.05mg, 소금에 절인 멸치는 0.1mg, 12개월 멸치액젓은 0.25mg을 첨가했을 때 MCA에 의한 cytotoxicity를 억제하는 효과가 가장 높았으며 그 이상의 첨가농도에서는 억제효과가 감소되고 오히려 0.5mg과 1.0mg을 첨가한 경우 cocarcinogenic effect를 나타내었다. 소금에 절인 멸치는 생멸치보다 낮은 cytotoxicity 억제효과를 보였고, 앞의 결과에서 NaCl은 모든 농도에서 cytotoxicity를 억제하였으나 소금에 절인 멸치는 1.0mg의 농도에서 0.588의 cytotoxicity를 보여 소금은 그 자체의 보발암성보다 다른 보발암원의 작용을 돕는 역할이 큰 것으로 보인다. 발효된 12개월 멸치젓은 소금에 절인 멸치보다 더 높은 cytotoxicity 억제효과를 보여 발효생성물 중에 MCA의 cytotoxicity를 억제하는 물질이 존재하는 것으로 보이나 농도에 따라 효과가 다르게 나타났다.

Table 4-22. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 μ g/ml), raw, salted and fermented anchovy

	Cell colony(level of sample, mg/assay)					
	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0
MCA(control)	69 \pm 5(1.00)					
Raw anchovy	73 \pm 3(1.04)	96 \pm 2(1.39)	86 \pm 4(1.25)	84 \pm 5(1.22)	68 \pm 1(0.99)	49 \pm 4(0.71)
Salted anchovy	65 \pm 2(0.94)	75 \pm 2(1.09)	84 \pm 2(1.21)	67 \pm 3(0.97)	53 \pm 3(0.77)	40 \pm 2(0.58)
12 FAJ ²	67 \pm 3(0.97)	71 \pm 3(1.03)	86 \pm 5(1.25)	96 \pm 5(1.39)	67 \pm 4(0.97)	66 \pm 4(0.96)

¹The values in parentheses are cytotoxicity ²Fermented anchovy juice

라. *In vivo Drosophila wing test*에서 멸치젓갈의 보/항돌연변이 효과

멸치젓 원료 및 발효된 멸치젓갈의 안전성을 *in vivo* 실험에서 확인하기 위해 초파리 체세포 돌연변이 검출계를 이용하였다. 생멸치, 20% 소금이 첨가된 생멸치, 6개월 숙성 멸치젓갈 건더기 및 액, 12개월 숙성 멸치액젓 메탄올추출물이 초파리의 wing hairs spots 검출계에서 변이원들에 의한 체세포 염색체 돌연변이 유발에 미치는 영향을 조사하기 위해 발생 단계상의 독성효과가 없는 범위에서 먼저 각 시료들 단독 처리에 대한 돌연변이 유발 정도를 조사하였다(Fig. 4-3). 모든시료가 자연발생 빈도와 유사하게 나타났는데, 이는 멸치 및 멸치젓갈이 체세포 염색체상의 결실, 불분리 현상, 체세포 염색체 조환 등을 포함한 어떠한 돌연변이도 유도하지 않았다는 것을 의미한다. 초파리의 wing spots test 시스템에서 멸치 및 멸치젓갈 추출물이 MNNG의 체세포

포 돌연변이 유발에 미치는 영향을 살펴본 결과 생멸치, 6개월간 숙성된 멸치 및 12개월간 숙성된 멸치액젓은 small *mwh* spots의 출현빈도에 대해 각각 16%, 35%, 45%의 항돌연변이 효과를 보였고, large *mwh* spots의 출현빈도는 MNG 단독처리군과 비슷하였다. 반면 소금에 절인 멸치는 small *mwh* spots와 large *mwh* spots의 출현빈도에 대해 각각 16%와 74%의 보돌연변이 효과를 보였다(Fig. 4-4).

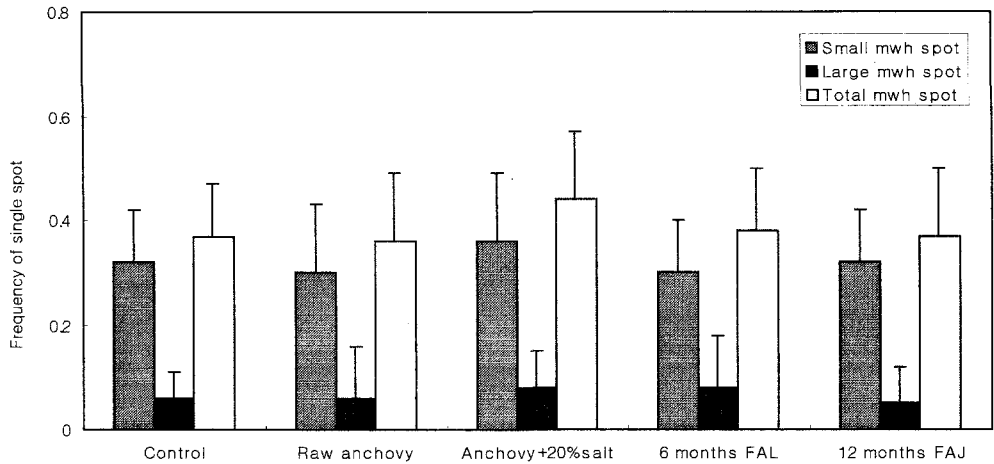


Fig. 4-3. Somatic mutation and recombination detected as two types of spots in the *Drosophila* wing hairs spot system(*mwh/+*) after 3rd instar larval (72 ± 4 hr) treatment with methanol extracts from anchovy and fermented anchovy
FAL: fermented anchovy liquid, FAJ: fermented anchovy juice

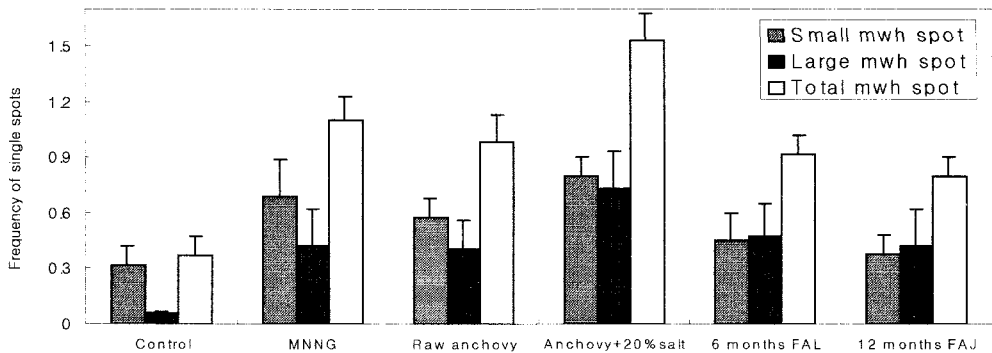


Fig. 4-4. Effects of the methanol extracts from anchovy and fermented anchovy on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 3mg/ml) in the *Drosophila melanogaster* wing spot system(*mwh/+*)
FAL: fermented anchovy liquid, FAJ: fermented anchovy juice

멸치젓갈에서 돌연변이를 유발하는 물질이 소금임을 확인하기 위해서 멸치젓갈 메탄올추출물을 헥산으로 탈지한 methanol soluble fraction(MSF)이 돌연변이 및 보돌연변이 유발에 미치는 영향을 살펴보았다. 이때 멸치젓갈 제조에 이용되는 천일염을 생멸치 MSF에 함유된 소금 농도인 0.1%와 12개월간 발효된 멸치젓갈에 함유된 양인 0.5% 수용액으로 만들어 함께 비교하였다. 소금은 생멸치 자체에 함유된 양인 0.1%의 낮은 농도에서도 약간의 돌연변이 유발성을 보였으며, 0.5% 농도에서는 약간의 독성을 보였다(Fig. 4-5).

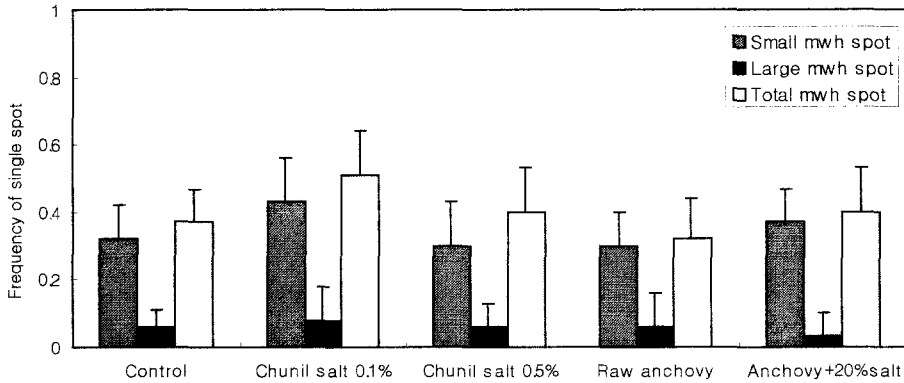


Fig. 4-5. Somatic mutation and recombination detected as two types of spots in the *Drosophila* wing hairs spot system(*mwh/+*) after 3rd instar larval (72 ± 4 hr) treatment with methanol soluble fraction from anchovy and fermented anchovy. FAL: fermented anchovy liquid, FAJ: fermented anchovy juice

또한 MNNG를 이용한 체세포 돌연변이 실험에서도 0.1%와 0.5% 소금은 모두 small *mwh* spots와 large *mwh* spots의 출현빈도를 급격히 증가시켜 200% 이상의 보돌연변이성을 나타내었다(Fig. 4-6). 생멸치와 20% 소금이 첨가된 멸치도 소금과 비슷한 보돌연변이성을 나타내었으나 12개월간 발효된 멸치젓갈은 보돌연변이 유발성이 140%이하로 크게 낮아졌다. 12개월간 발효된 멸치젓갈 MSF는 염도가 0.58%로 20% 소금이 첨가된 멸치(0.25%) MSF보다 2배이상 높고, 12개월간 발효된 멸치젓갈의 메탄올추출물이 total *mwh* spots에 대해 30% 정도의 항돌연변이성을 나타낸 것으로 보아 발효산물 중에 소금의 보돌연변이성을 억제하는 물질이 존재하며, 헥산층에 있는 지방산 계열일 것으로 추측된다.

이상의 결과로 볼 때 젓갈 제조시 생멸치에 소금을 첨가하면 보돌연변이 효과를 나타낼 수 있으나 숙성기간이 길어지면(12개월)서 MNNG에 의한 돌연변이 유발이 억제 효과 형태로 높아짐이 *in vivo*에서 확인되어, 김치에 첨가하는 12개월간 발효된 멸치액젓은 암예방 측면에서 어느 정도는 안전한 것으로 생각된다.

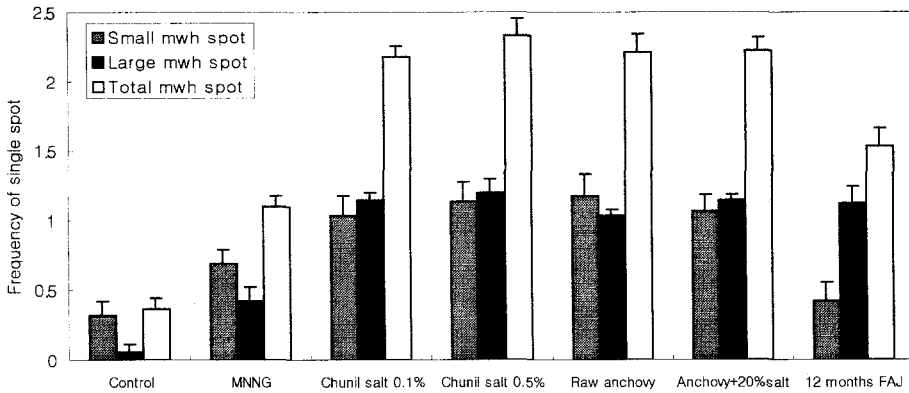


Fig. 4-6. Effects of the methanol soluble fraction from anchovy and fermented anchovy on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 3mg/ml) in the *Drosophilla melanogaster* wing spot system(mwh/+) (FAJ: fermented anchovy liquid, FAJ: fermented anchovy juice)

3. 소금을 이용한 암예방/항암김치 개발

가. 배추 염절임 특성 및 염도, 무기질 변화

1) 배추의 염절임 특성

일반배추를 20°C에서 10%소금물에 절이는 동안 소금종류에 따른 절임시간을 측정하였다(Table 4-23). 배추절임시간동안 구운소금이 가장 절임속도가 빨랐으며(p < 0.05) 다음이 정제염 및 천일염순이었다. 이는 열가공처리를 받은 구운소금이 배추조직에 침투하는 속도가 현저히 상승됨을 알 수 있었고 가공처리를 받지않은 소금에서는 정제염이 천일염보다 염절임속도가 빨랐다. 소금절임속도가 빠르면 배추의 당의 유출이 적게되고 젖산균의 유출이 낮은 등 발효에 유익하다고 할 수 있다.

Table 4-23. Changes of salt content in Chinese cabbage during soaking the Chinese cabbage in 10% brine at 20°C

Salting time(hr)	2	4	6	8
Chunil salt	1.27±0.07 ^a	1.48±0.04 ^a	2.11±0.06 ^a	2.61±0.04 ^a
Purified salt	1.35±0.03 ^b	1.75±0.09 ^b	2.26±0.21 ^b	2.83±0.05 ^b
Gueun salt	1.48±0.07 ^c	1.95±0.08 ^c	2.62±0.07 ^c	3.10±0.15 ^c

The different letters are significantly different at the p<0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3)

Instron을 사용하여 배추조직의 단단함을 cutting test 및 puncture test(경도)로 측정된 결과는 Table 4-24, 4-25과 같다. 소금의 절임도가 증가되는대로 단단함(아삭

아삭한 맛)이 증가되었는데 배추의 조직은 구운소금이 가장 단단하였고 정제염 및 천일염 순이었다. 이로서 배추절임시 구운소금의 사용은 소금절임속도도 빠르게 하며 배추조직도 단단한 것으로 나타났다.

Table 4-24. Cutting test of Chinese cabbage during salting with different salt

Salting time(hr)	2	4	6
Chunil salt	1.18±0.03 ^a	1.24±0.05 ^a	1.33±0.05 ^a
Purified salt	1.18±0.05 ^{ab}	1.30±0.04 ^{ab}	1.40±0.08 ^{ab}
Gueun salt	1.25±0.06 ^b	1.34±0.05 ^b	1.58±0.10 ^b

*raw chinese cabbage 1.15±0.06

The different letters are significantly different at the p<0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3)

Table 4-25. Puncture test of Chinese cabbage during salting with different salt

Salting time(hr)	2	4	6
Chunil salt	2.60±0.05 ^a	2.90±0.05 ^a	3.28±0.10 ^a
Purified salt	2.73±0.12 ^{ab}	3.02±0.10 ^{ab}	3.40±0.03 ^{ab}
Gueun salt	2.77±0.12 ^b	3.23±0.06 ^b	3.70±0.10 ^b

*raw chinese cabbage 2.57±0.06

The different letters are significantly different at the p<0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test (n=3)

2) 소금종류를 달리하여 절인 배추의 염도변화

소금의 종류에 따라 절임양상을 비교하여 산업적으로 생산할 때 사용하기 위한 기술 개발로 소금 종류에 따른 절임배추의 염도를 측정하였다. 배추는 앞부분에 비해 상대적으로 줄기부분의 양이 많은 편이고 조직이 더 강하기 때문에 같은 염수에서 배추를 절이게 되면 앞부분이 너무 많이 절여져 김치가 완성되었을 때 잔부분과 싱거운 부분이 생기게 된다. 그러므로 전체적인 김치의 염도가 맞지않아 상품성이나 식미를 저하시키게 된다.

이러한 이유로 여름배추의 소금종류별 절임속도를 알아보기 위하여 상온(20℃)에서 염수농도 10%를 기준으로 소금종류별로 염수, 50%소금을 켜켜뿌린 배추 + 5% 염수 및 30%소금을 켜켜뿌린 배추 + 7% 염수의 3가지 조건으로 배추를 절인 다음 2시간 단위로 3회 Washing 후 3시간 탈수하여 염도계를 이용하여 각 부분별 및 전체 염도를 측정하였다.

소금 종류별 여름배추의 시간에 따른 절임 속도를 10%소금용액에서 살펴본 결과는 Fig. 4-7와 같다. 즉 소금을 켜켜 뿌리지 않고 각 소금종류별 10%염수에서 절인 배추

의 부위별 염도는 잎 부분에서 구운 소금이 가장 빨리 절여지는 양상을 보였으나 6시간을 기준으로 한주소금과 천일염의 절임속도가 빨라져 10시간째에는 한주소금과 천일염이 가장 높은 염도를 나타내었다. 줄기부분에서는 잎부분에 비해 상대적으로 조직이 두껍고 치밀하기 때문에 절임 속도 역시 서서히 증가하는 경향을 보였다. 대부분의 소금들은 비슷한 경향을 보인 반면 죽염의 침투속도가 좀더 빠르게 나타났다. 전체부위에서의 절임 속도는 전체적으로는 비슷한 경향을 나타내었으나 구운 소금과 죽염이 빠른 절임 속도를 보였으며, 한주 소금은 초기에서 서서히 절여지다가 절임 후 6시간이 지나면서 빠른 속도를 나타내었다.

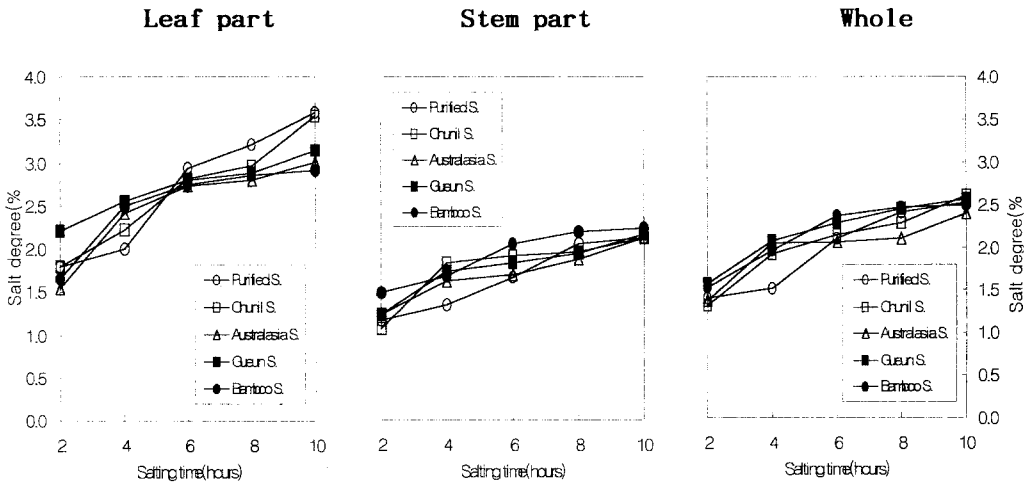


Fig. 4-7. Salt concentration changes of each part of summer chinese cabbage by brine types.

전체 소금의 30%를 켜켜 뿌린 후 절임시험을 수행한 결과는 Fig. 4-8에 나타내었다. 먼저 잎 부분의 경우 50%와는 달리 죽염의 절임 속도가 처음부터 가장 빠르게 나타났고 구운 소금은 그다지 빠른 양상을 보이지 않았다. 한주소금과 천일염이 호주산 염이나 구운 소금의 경우보다 좀 더 빠른 경향이였다. 줄기부분 역시 죽염의 절임 속도가 나머지 소금에 비해 현저히 빨랐고 구운 소금이 그 다음으로 빠르게 나타났으며, 천일염과 호주산 염은 줄기부분에서는 느린 속도로 진행되다가 8시간 이후에 급속히 절여지는 경향을 보였는데 이는 배추조직의 개체차에 의한 것이라고 생각된다. 각 소금 30%를 켜켜뿌린 배추김치의 전체적인 염도는 초기부터 후기까지 계속해서 죽염의 절임속도가 가장 빠르게 나타났고, 한주 소금과 구운 소금 및 천일염은 거의 비슷한 경향이였으며, 호주산 염은 가장 느린 속도의 절임 양상을 보였다. 죽염이 가장 속도가 빠른 것은 소량으로도 배추의 조직에 빠르게 침투할 수 있고 입자가 곱고 염

도 자체가 가장 높기 때문이라고 생각된다.

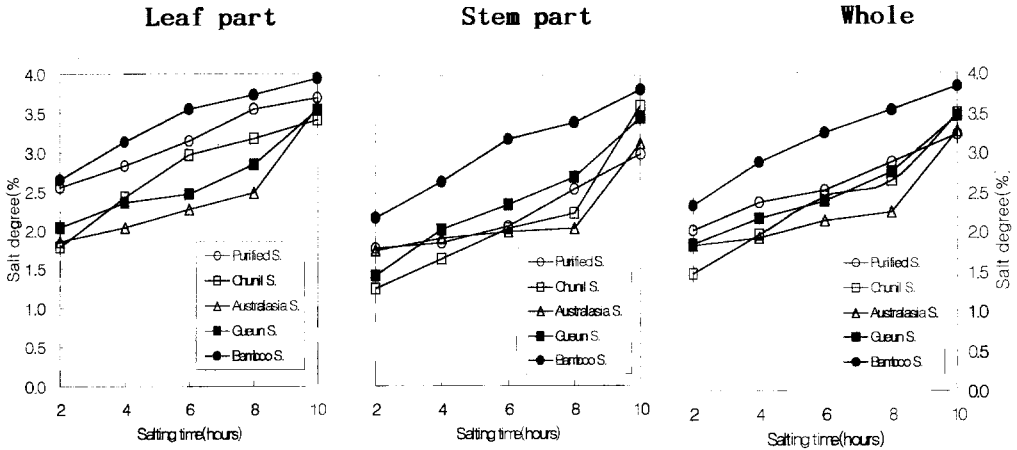


Fig. 4-8. Salt concentration changes of each part of summer chinese cabbage by brine types. 30% of the salt in the cabbage was separately added to the cabbage

전체 소금의 50%를 켜켜 뿌린 후 절임 시험을 수행한 결과는 Fig. 4-9에 나타난바와 같다. 먼저 잎 부분의 경우 호주산 염을 제외한 나머지 4종류의 소금은 거의 비슷한 경향을 나타내었으나 구운 소금과 죽염의 절임 속도가 조금 더 빠르게 나타났고 호주산 염의 경우는 매우 느린 경향이었다. 줄기부분 역시 구운 소금과 죽염의 절임 속도가 나머지 소금에 비해 현저히 빨랐고 호주산 염은 잎 부분과 마찬가지로 줄기부분에서도 가장 느린 속도를 보여주었다. 각 소금 50%를 켜켜 뿌린 배추김치의 전체적인 염도는 초기부터 후기까지 계속해서 구운 소금과 죽염의 절임 속도가 가장 빠르게 나타났고, 한주 소금과 천일염은 거의 비슷한 경향이었으며, 호주산 염은 가장 느린 속도와 완만한 절임 양상을 보였다.

결론적으로 각 계절별 및 품종별 배추가 각각 다른 가공특성을 가지기 때문에 이번 실험에서는 여름배추 1종으로만 실험을 행하였다. 그 결과 소금 농도 2.5%를 기준으로 살펴볼 때 켜켜 뿌리지 않은 10% 염수일 경우 한주 소금, 구운 소금 및 죽염은 20℃에서 8시간의 절임이 가장 적당하였고, 천일염과 호주산 염은 10시간이 적당한 절임 시간 이었다.

전체 소금의 30%를 켜켜 뿌린 배추는 죽염만 3시간만에 도달하였고 구운 소금, 한주 소금 및 천일염은 6시간 그리고 호주산 염은 8시간 정도가 가장 적당한 염도에 도달하는 시간으로 나타났으며, 전체 소금의 50%를 켜켜 뿌린 후 절임 시험을 수행한 결과는 구운 소금 및 죽염은 2시간만에 2.5%에 도달하였고 한주 소금 및 천일염은 4시간, 그리고 호주산 염은 8시간이 적당한 것으로 나타났다.

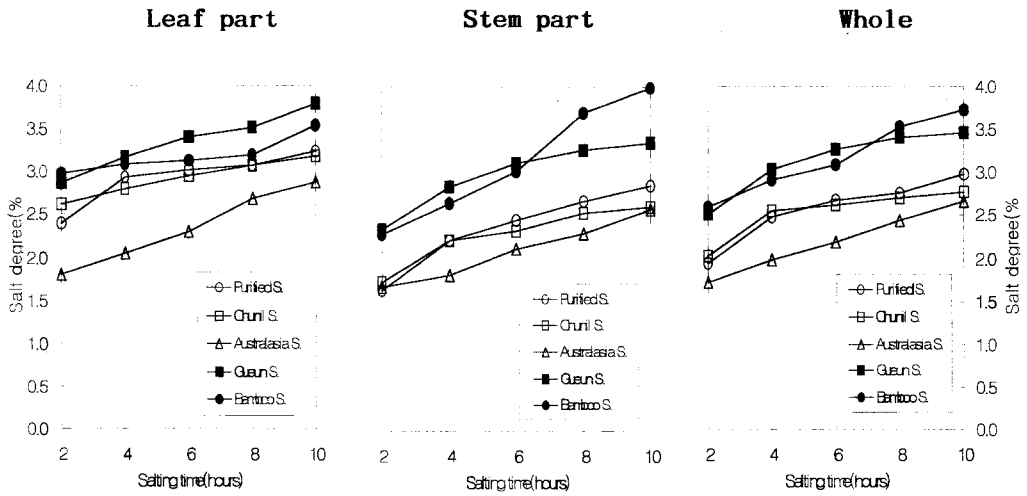


Fig. 4-9. Salt concentration changes of each part of summer chinese cabbage by brine types.

50% of the salt in the cabbage was separately added to the cabbage

상기의 결과를 토대로 결론을 내려보면 구운소금과 죽염을 사용하여 50% 켜켜부리기한 경우가 잎부분과 줄기부분의 염도차가 가장 작고 가장 빠른시간(약 2시간 내외)에 적당한 농도의 염도로 절여져서 가장 적당하다고 판단되었다.

3) 소금 종류를 달리하여 절인 배추의 무기질 함량 연구

소금에 의해 절여지는 동안 무기질, 특히 배추내의 중금속의 제거효과에 대한 또는 무기질 함량 변화에 대한 소금 종류의 차이를 측정해 보았다. 절이지 않은 생배추는 Fe, K, P, Zn이 많이 함유되어 있었는데 이들 무기질은 배추를 물에 10시간 담궈 두기만 해도 크게 감소하였으며, 소금물에 절인 배추에는 더 적은 양이 함유되어 있었다. 특히 한주소금으로 절인 배추는 Na의 함량은 높고, 생리기능성을 나타내는 무기질인 Fe, Ca, K, P, Zn의 함량이 낮았다. 또한 천일염으로 절인 배추는 구운소금이나 생금으로 절인 배추와 다른 무기질 함량은 비슷하였으나 Pb, Cd의 함량이 높아 배추를 천일염으로 절일 경우 배추의 중금속이 거의 제거되지 못하는 것으로 나타났다 (Table 4-26). 따라서 배추의 절임에 사용하는 소금은 절임 과정에서 배추에서 무기질이 빠져나가는 것을 방지하면서 중금속의 함량을 낮춰주는 가공염이 적당한 것으로 보인다.

Table 4-26. Mineral contents of various kinds of salts and Chinese cabbage soaked in various kinds of salt solution analyzed with ICP-AES and ICP-MS

Variety	Mineral														
	Pb	As	Cd	Zn	Mn	Si	Cu	P	S	K	Ca	Mg	Fe	Na	
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	%	%	%	%	%	%	
Raw chinese cabbage(CC)	0.7	0.1	0.2	34.5	191.8	27.1	6.4	0.84	0.62	7.58	0.87	0.22	88.7	0.09	
CC soaked in water	0.6	0.1	0.1	32.3	400.3	12.5	7.2	0.78	0.77	6.88	0.90	0.21	64.6	0.25	
CC soaked in Chunil salt solution	0.6	0.4	0.2	27.3	143.3	87.2	8.3	0.62	0.56	5.29	0.54	0.20	50.6	11.48	
CC soaked in Hanju salt solution	0.2	0.5	0.1	18.4	61.1	125.0	5.7	0.44	0.34	3.74	0.40	0.11	3.1	18.29	
CC soaked in Gueun salt solution	0.3	0.4	0.1	28.2	107.0	41.5	10.1	0.63	0.51	4.83	0.53	0.22	59.3	86	
CC soaked in Seangkeum solution	0.1	0.6	0.1	28.9	137.4	68.3	9.6	0.67	0.52	5.61	0.59	0.15	58.4	9.96	
Gueun salt	0.2	<0.1	<0.1	1.1	3.2	<2	0.4	<2	4061	2221	958	5579	58.3	37.2	
Seangkeum	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5	<0.2	<2	<0.2	<2	101	917	191	19	0.7	39.1	

나. 소금종류별로 제조한 김치의 특성

1) 소금종류별로 제조한 김치의 이화학적 특성과 항돌연변이효과

가) 소금 종류별 제조한 김치의 이화학적 특성

시약용 NaCl, 기계염, 천일염, 생소금, 구운소금, 생금으로 소금용액을 만들어 배추재료를 침지시키고 소금종류별로 염도를 맞추어 제조한 김치를 15°C에서 발효시킨 결과 3일째 천일염, 생금, 구운소금이 초기에 발효가 빠르게 진행되었고 그 다음으로 시약용 NaCl, 생소금 그리고 기계염이 가장 발효가 느리게 진행되어 항균성실험에서와 같은 결과를 나타내었다. 소금은 미생물의 발육을 막고 발효를 억제하는 작용이 있으나 다른 가공염과 천일염은 자체에 혼입되어 있는 여러 가지 종류의 무기질이 미생물의 생장에 관여하였으리라 생각된다.

Pectin 물질은 세포나 세포막 사이에 존재하는 middle lamella 구조에 주로 존재하는데 일차 세포벽의 건조물의 1/3을 차지할 정도로 많고 인접한 cellulose가 수소결합을 형성해 pectin질을 지지해주며 pectin분자내에도 K, Mg, 이온이 가교결합하고 있다. 펙틴사슬은 carboxyl group 사이의 hydrogen bonding, polyhydroxyl compounds에 의한 결합, calcium bonding, hydroxyl group에 의한 hydrogen bonding에 의한 수소결합, carboxyl group과 polyhydroxy alcohol과의 ester결합, formaldehyde를 통한 ether결합 등의 가능한 결합방식으로 연결되어 있다. 이러한 구조 중 특히 Ca과 Mg, K 결합은 pectin분자를 가교결합하여 과채류의 견고성에 관여하며 절임후 Na과 치환 반응한다. 내부 수분이 세포막을 통해 빠져나가고 Na가 세포내로 침투하게 되어 가교결합 상태의 Ca와 Mg이 치환되어 low methoxyl pectin의 carboxyl기에 Na이 결합되어 pectin과 cellulose 사이의 수소결합이 해체되어 이를 지지하는 힘이 약화되어 견고성이 감소되고 유연성을 가지게 된다. 그러므로 다른 Ca, Mg, K이 함유되어 있는 소금을 사용할 경우 pectin분자 사이의 가교결합을 어느 정도는 유지할 수 있으리라

생각된다. 6일째는 대체로 비슷하여 pH 4.2~4.4 사이였으나 그 중 기계염이 가장 pH가 높았고 발효 9일째 기계염, 시약용NaCl, 생금, 구운소금, 천일염 생소금순이었으나 발효 말기에는 큰 차이가 없었다. 식염의 종류에 따라 김치의 숙성도는 천일염이 가장 빠르고 정제염이 가장 늦은 것으로 나타났다.

한편 구운소금, 천일염, 기계염을 사용하여 김치재료의 조성을 다르게 하여 15°C에서 발효패턴을 본 결과는 Table 4-27과 같다. pH는 적숙기까지 구운소금이 급격히 낮아졌지만 그 후 익는 속도는 가장 늦게 일어났다. 이는 항균실험에서 본 바와 같이 김치발효 후기에 나타나는 산패균인 *Lac. plantarum*의 성장은 구운소금이 가장 크게 저해했다는 것과 일치하였다. 발효 6일째 9점 평점법으로 관능검사를 행한 결과 정제염과 천일염이 기호도가 낮았는데 천일염은 배추의 색이 상대적으로 어두워 보였다(결과 생략). 그러나 전체적인 맛과 선호도에 있어서는 정제염이 가장 낮았고 다음이 천일염이었고 구운소금으로 담은 김치가 모든 면에서 선호도가 가장 높았다. 구운소금으로 담은 김치는 숙성은 빠르게 되고 부패는 느리게 되며 맛도 가장 뛰어났으므로 이 실험결과 소금의 종류로는 구운소금이 배추김치 절임에 가장 적당한 소금으로 나타났다.

Table 4-27. pH changes in kimchi that fermented with different kinds of salt at 15°C

Fermentation period(days)	Salt kinds		
	Chunil salt	Purified salt	Gueun salt
0	5.47±0.02	5.46±0.03	5.50±0.02
4	4.31±0.01	4.26±0.01	4.21±0.01
8	3.95±0.01	3.92±0.01	4.01±0.01

¹Ingredient ratio : 100 Chinese cabbage, 3.5 red pepper powder, 1.4 crushed garlic, 0.6 crushed ginger, 2.2 fermented anchovy, 13 radish, 2.0 spring onion, 1.0 sugar. Final salt con : 2.5%

나) 소금 종류별로 제조한 김치의 항돌연변이 효과

(1) Ames 실험계

Ames 실험계에서 *Sal. typhimurium* TA100균주를 이용하여 AFB1에 대한 김치즙액(200 μ l)의 항돌연변이 효과를 살펴 본 결과는 Table 4-28과 같다. 발효 6일째 구운소금으로 제조한 김치의 항돌연변이 효과가 가장 컸었고 반면 정제염으로 제조된 김치의 효과가 가장 낮았다. 그러나 과숙된 발효 9일째 김치들은 소금종류에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면에 MNNG에 대해 0일째 김치들은 모두 보돌연변이성을 나타내었는데, MNNG만을 처리한 대조군이 688±30개의 복귀돌연변이수를 나타냈고 NaCl, 기계염, 천일염, 생소금, 구운소금, 생금으로 담은 김치는 829~900개로 모두 보돌연변이성을 나타내었다. 그렇지만 잘 익은 6일째와 9일째김치는 50% 이하이긴 하였지만 항돌연변이효과를 나타내었고 소금종류에 따라서는 큰 차이가 없었다(Table

4-29). 구운소금으로 담은 김치를 0, 6, 12일간 15°C에서 발효시킨 후 동결 건조하여 메탄올로 추출하여 AFB1에 대한 항돌연변이 효과를 비교 실험한 결과 6일간 발효된 김치에서 특히 강한 항돌연변이효과를 보였는데 1.25%, 2.5%, 5%에서 각각 41, 50, 72%의 높은 저해율을 보였다. MNNG의 경우에는는 효과가 미약했는데 6일째 김치에서 12~17%의 저해효과를 보였다(data생략).

Table 4-28. Antimutagenic effect of kimchi juice(200 μ l, 0, 6, 9 days fermentation 15°C) prepared with various salts on mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁; 0.75 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	0 day		6 day		9 day	
	Revertant /plate	Inhibition rate(%)	Revertant /plate	Inhibition rate(%)	Revertant /plate	Inhibition rate(%)
Spon.	122 ± 14					
Control	673 ± 12					
NaCl	536 ± 68	25	460 ± 51	56	438 ± 27	51
Purified salt	446 ± 22	41	632 ± 38	33	411 ± 4	55
Chunil salt	528 ± 45	26	431 ± 65	56	347 ± 4	65
Saeng salt	452 ± 7	40	634 ± 42	33	344 ± 34	65
Gueun salt	469 ± 68	37	348 ± 49	70	352 ± 180	64
Saeng Kum	413 ± 13	47	476 ± 64	53	432 ± 11	51

Table 4-29. Antimutagenic effect of kimchi juice(200 μ l, 0, 6, 9 days fermentation 15°C) prepared with various salts on mutagenicity induced by N- methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG; 0.43 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	0 day		6 day		9 day	
	Revertant	Inhibition rate(%)	Revertant	Inhibition rate(%)	Revertant	Inhibition rate(%)
Spon.	166 ± 10					
Control	688 ± 30					
NaCl	882 ± 142	—	307 ± 20	35	313 ± 16	33
Purified salt	829 ± 4	—	301 ± 50	37	320 ± 41	31
Chunil salt	900 ± 55	—	305 ± 6	36	308 ± 52	35
Saeng salt	872 ± 53	—	286 ± 25	42	342 ± 26	34
Gueun salt	862 ± 50	—	301 ± 29	37	316 ± 2	32
Saeng Kum	844 ± 25	—	265 ± 19	49	360 ± 10	18

다른 연구에서도 김치의 메탄올추출물은 생김치와 과숙한 김치보다 적당히 익은 김치가 가장 큰 효과가 있었는데 이는 적당히 익은 경우 비타민 B복합체, 비타민 C등

여러 영양소 합성이 가장 많고 김치내의 여러 생리활성물질이 가장 많이 관여한다고 추정하였다.

(2) SOS chromotest

SOS chromotest를 이용한 실험계에서 소금의 농도에 의해 *E. coli* PQ37이 영향을 받지않는 범위로 시료 5 μ l와 증류수 5 μ l를 혼합하여 반으로 희석하여 사용하였다. 시료는 0일째 김치의 경우 구운소금과 생소금으로 제조한 김치를 제외하고 모든 시료에서 MNNG에 대한 보돌연변이 효과를 보였으나 6일 발효된 경우 모든 균에서 항돌연변이 효과를 나타내었으며 특히 가공염인 구운소금과 생금이 그 중 효과가 가장 컸고 그 다음이 천일염과 생소금이었고 기계염이 가장 효과가 적었다(Table 4-30). 이것은 천일염과 가공염이 기계염에 비해 여러 가지 미네랄이 함유되어 각종 미생물의 생장 요소로 작용하여 생체활성효과가 있는 젖산균의 함량이 상대적으로 많아졌거나 또는 이들에 의한 다른 발효산물 생성때문이 아니었나 생각된다.

Table 4-30. SOS response of kimchi(15°C, 6 day fermentation) juice(5 μ l) prepared with various salts against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 20ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(p)		(β)/(p)*	SOS induction factor
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit		
Spon.	0.731 \pm 0.013	36.6	0.336 \pm 0.087	16.8	2.2	1.0
Control	1.707 \pm 0.067	85.4	0.296 \pm 0.070	14.8	5.8	2.6
NaCl kimchi	1.021 \pm 0.025	51.1	0.297 \pm 0.013	14.9	3.4	1.5
Purifiedsalt kimchi	1.241 \pm 0.051	62.1	0.342 \pm 0.076	17.1	3.6	1.6
Chunil salt kimchi	0.891 \pm 0.025	44.6	0.290 \pm 0.003	14.5	3.1	1.4
Saeng salt kimchi	0.951 \pm 0.092	47.6	0.301 \pm 0.069	15.1	3.2	1.5
Gueun salt kimchi	0.764 \pm 0.133	38.2	0.300 \pm 0.004	15.0	2.5	1.1
Saeng Kum kimchi	0.871 \pm 0.134	43.6	0.319 \pm 0.029	16.0	2.7	1.2

* β -Galactosidase/Alkaline phosphatase

3) 죽염으로 제조한 김치의 이화학적 특성 및 암예방 효과

죽염(2회)과 구운 소금으로 각각 10%염용액을 만들어 A와 B는 죽염에 그리고 C는 구운 소금에 10시간 염절임한 후 염도 2.0%를 확인하고 Table 4-31과 같은 비율로 김치를 담고 최종 염도는 A는 죽염, B는 염화칼륨(KCl), C는 구운 소금으로 2.5%를 맞추었다. 15°C에서 발효시키면서 2일마다 이화학적 특성을 측정하였다.

가) 이화학적 특성

김치의 이화학적 특성인 pH, 산도, 환원당 및 젖산균을 측정한 결과 pH는 처음에는 세종류의 김치간에 차이가 없었으나 4일째에 KCl을 첨가한 김치는 4.28로 죽염이나 구운 소금으로 담은김치보다 높았고 6일째, 8일째에도 KCl을 첨가한 김치가 pH가

높았다. KCl이 김치의 발효진행을 억제하여 pH가 천천히 떨어지는 것으로 나타났다. 산도도 KCl첨가 김치가 죽염이나 구운 소금으로 담은 김치보다 낮았으나 환원당에서는 세종류의 김치간에 큰 차이가 없이 발효가 진행되면서 감소하는 경향이였다(Table 4-32).

Table 4-31. The ingredients ratio of various chinese cabbage kimchi

Ingredients	A	B	C
Chinesecabbage	100	100	100
Red pepper powder	3.5	3.5	3.5
Crushed garlic	1.4	1.4	1.4
crushed ginger	0.6	0.6	0.6
Anchovy juice	2.2	2.2	2.2
Sugar	1.0	1.0	1.0
Radish	13.0	13.0	13.0
Grddn onion	2.0	2.0	2.0
Final salt concentration	2.5(Bamboo salt)	2.5(KCl)	2.5(Gueun salt)

Table 4-32. Changes of pH, acidity, reducing sugar contents(RS) in various chinese cabbage kimchi fermentation at 15°C

Fermentation day	Variety	pH	Acidity(%)	RS(g%)
0	A	5.65	0.32	2.7
	B	5.60	0.32	2.7
	C	5.56	0.34	2.7
2	A	4.50	0.63	2.3
	B	4.56	0.59	2.4
	C	4.40	0.69	2.2
4	A	4.19	0.74	1.5
	B	4.28	0.65	1.6
	C	4.19	0.74	1.4
6	A	3.87	0.99	1.3
	B	4.01	0.81	1.4
	C	3.88	1.00	1.3
8	A	3.70	1.10	1.2
	B	3.92	0.95	1.3
	C	3.70	1.10	1.3

A: Bamboo salt+Bamboo salt added kimchi B: Bamboo salt+KCl added kimchi C: Gueun salt+Gueun salt added kimchi

나) 젖산균의 변화

김치의 향미와 시원한 맛을 부여하는 젖산균인 *Leuconostoc* sp. 와 과숙기의 신맛을 내는 젖산균인 *Lactobacillus* sp. 양을 측정하였다. *Leuconostoc* sp.는 발효가 진행

되면서 점차적으로 증가하다가 8일째는 감소하였다. *Lactobacillus* sp.는 처음에는 *Leuconostoc* sp.보다 낮았으나 발효가 진행되면서 점차 증가하였다. KCl을 첨가한 김치가 *Leuconostoc* sp.과 *Leuconostoc* sp. 둘 다 죽염이나 구운 소금으로 담은 김치보다 적게 나타났다(Table 4-33). 이것은 앞의 결과인 pH와 산도의 결과와 관계가 있었다.

Table 4-33. Changes of *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. in various chinese cabbage kimchi fermentation at 15°C

Fermentation day	Variety	<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.
0	A	3.9×10^4	5.3×10^2
	B	3.2×10^4	4.7×10^2
	C	3.2×10^4	4.9×10^2
2	A	5.1×10^6	7.9×10^4
	B	3.5×10^6	6.7×10^4
	C	3.1×10^6	6.4×10^4
4	A	1.7×10^7	3.2×10^6
	B	5.4×10^6	2.2×10^5
	C	1.3×10^7	3.5×10^6
6	A	1.2×10^8	1.7×10^8
	B	4.3×10^7	2.5×10^7
	C	1.1×10^8	1.0×10^8
8	A	7.9×10^7	2.4×10^8
	B	1.2×10^7	3.5×10^7
	C	8.2×10^7	2.1×10^8

A: Bamboo salt+Bamboo salt added kimchi B: Bamboo salt+KCl added kimchi C: Gueun salt+Gueun salt added kimchi

다) 색도 변화

이렇게 발효되었을 때 색도의 변화를 측정해 보았다. 김치액 자체의 색깔이 진하므로 증류수로 5배 희석한 후 측정하였는데 L은 명도를 a는 붉은 정도를 나타내고 b는 노란 정도를 나타낸다. 구운 소금으로 담은 김치가 죽염이나 죽염에 KCl을 첨가한 김치보다 a값이 높았고 b값은 낮았다. 발효가 진행되면서 a값은 낮아지는 경향이었고 b값은 변화가 없었다(Table 4-34). 관능적인 면에서 죽염김치는 조직이 구운 소금김치보다 무른 느낌이었고 김치색이 탁한 붉은 색이었다. 구운 소금으로 담은 김치는 조직이 죽염으로 담은 김치보다 단단한 느낌이었고 색도 밝은 붉은 색이었다.

라) 항돌연변이 결과

SOS chromotest를 이용하여 MNNG에 의한 세종류김치의 SOS반응억제효과를 살펴보았

Table 4-34. Changes of color in various chinese cabbage kimchi fermented at 15°C

Fermentation day	Variety	L	a	b
0	A	19.10	18.08	29.31
	B	18.73	18.83	32.07
	C	17.62	17.62	28.37
2	A	20.45	18.53	32.52
	B	18.72	18.98	32.86
	C	17.69	19.19	30.14
4	A	20.51	17.75	31.87
	B	19.01	18.31	32.59
	C	18.02	18.73	29.10
6	A	21.22	17.52	29.04
	B	19.24	17.87	29.09
	C	18.24	18.48	28.51
8	A	20.98	17.21	28.42
	B	19.78	17.01	28.11
	C	18.44	17.20	28.82

A: Bamboo salt+Bamboo salt added kimchi B: Bamboo salt+KCl added kimchi C: Gueun salt+Gueun salt added kimchi

다. 구운 소금으로 담은 김치와 죽염으로 담은 김치의 SOS반응억제효과는 각각 40%, 42%였고 죽염으로 절인 김치에 KCl을 첨가한 김치는 70%의 높은 억제효과를 나타내었다. KCl은 쓴맛을 내지만 소량 첨가하면 쓴맛은 감지되지 않으며 이와 같이 항돌연변이 효과를 높이는 효과가 있었다(Table 4-35). 이 실험결과도 앞의 항암 기능성김치 II를 이용한 실험결과와 비슷하게 나타났다. 즉 가공염(구운소금)에 KCl을 첨가하는 것이 절임조건, 보존성, 색도, 조직감 및 암예방성 모든 면에서 유리한 것으로 확인되었다.

Table 4-35. SOS response of various kinds of kimchi juice(10 μ l) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	β -Galactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD420	Unit	OD420	Unit			
Spontaneous	0.312	10.4	0.271	9.0	1.15	1.00	
Control	0.666	22.0	0.262	8.7	2.53	2.20	
A	0.569	19.0	0.290	9.7	1.96	1.70	42
B	0.456	15.2	0.291	9.7	1.57	1.36	70
C	0.575	19.2	0.292	9.7	1.98	1.72	40

A: Bamboo salt+Bamboo salt added kimchi B: Bamboo salt+KCl added kimchi C: Gueun salt+Gueun salt added kimchi

4. 저염김치 개발

가. 초피 첨가김치의 개발

김치제조시 소금의 농도를 줄이기 위해 KCl김치의 생리활성을 검토하였지만 고혈압 환자 등을 위한 KCl대신 소금양을 감소시키는 저염김치를 초피를 이용하여 개발하였다.

1) 초피의 항균성

초피의 메탄올추출물의 *Leu. mesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Pichia membranefaciens* 그리고 *E. coli*에 대한 항균실험결과는 Fig. 4-10과 같다. 초피 메탄올추출물 0.05~0.2%농도에서 *Leu. mesenteroides*, *Lac. plantarum*에 대해 최적조건에서 비슷한 항균력(11.5~45.7%)을 보이는데 특히 *Pichia membranefaciens*에 대해 0.05%농도에서 28%, 0.1%에서 26%, 0.2%에서 67%의 높은 저해율을 보였으며 *E. coli*에 대해서는 0.05%에서도 43.2%의 높은 저해율을 보였고 0.1, 0.2%농도에서 각각 49%, 50%의 항균력을 보였다. 초피 메탄올추출물 0.2%농도에서 배추즙을 이용한 배지에서 시간별로 항균력을 측정된 결과 역시 12시간에서 *Pichia membranefaciens*가 가장 큰 저해(100%)를 보였고 그 다음이 *Lac. plantarum*(95%), *Leu. mesenteroides*(82%)의 순으로 저해시켰다.

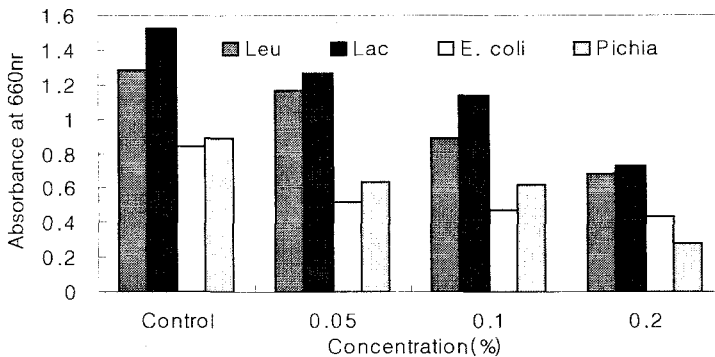


Fig. 4-10. Antimicrobial effects of methanol extracts from Chinese pepper(CP) at optimum condition.

(Leu.; *Leuconostoc mesenteroides*, LAC.; *Lactobacillus plantarum*)

2) 초피 첨가김치의 이화학적 특성

초피분말을 1.7%절임 배추무계당 0.1, 0.2, 0.5, 1% 첨가한 배추의 발효시 pH, 산도, 환원당의 변화는 다음과 같다. 발효 3일째 1.7%NaCl김치가 pH 4.61로 감소되었으나 1%초피김치(pH 5.26), 0.5%초피김치(pH 5.25)가 2.5%NaCl김치(pH 5.24)보다 오히려 pH의 감소가 적었고 0.2%는 pH 5.2로써 보존력이 있었으나 0.1%초피첨가김치는 1.7%NaCl(pH 4.6)와 큰 차이가 없었다. 발효 6일째 2.5%NaCl김치(pH 4.26)와 0.2%초

피김치(pH 4.36), 0.5%초피김치(pH 4.36), 1%초피김치(pH 4.36)는 비슷한 발효양상을 보였으나 1.7%NaCl김치와 0.1%초피김치는 pH 4.12, pH 4.16의 수치를 보였다. 산도에서도 유사한 결과를 보였다. 초기 환원당은 초피의 첨가량에 따라 차이가 났는데 대조김치인 1.7%와 2.5%NaCl김치는 2.25%인데 반해 초피 0.1%는 2.25g%정도이나 0.2~1% 첨가시 2.37~2.52g%까지 증가되었다. 환원당의 함량에서도 1.7%NaCl김치와 0.1%초피김치는 비슷한 양상으로 발효가 가장 빨리 진행되어 각각 6일째 0.91g%과 1.00g%이었다. 2.5%NaCl김치와 0.2%초피김치김치는 1.26g%로 비슷했고 0.5, 1%첨가김치는 각각 1.39, 1.45g%로 발효가 가장 느리게 진행되었다(data 생략).

3) 젖산균수

MRS plate를 이용하여 젖산균을 계수한 결과 발효 3일째 2.5%NaCl이 가장 많았고 다음이 0.1%, 0.2%, 0.5%초피김치 순이었고 1%의 초피첨가김치는 1.7%NaCl보다 낮았다. 발효 6일째는 0.5%, 0.2% 순이었고 그 다음이 2.5%NaCl김치와 1%가 많았고 0.1%초피김치와 1.7%NaCl김치가 가장 적었다. 특이하게 1%초피김치는 9일까지 계속적인 상향곡선을 그려 가장 높은 수치를 보였다. 이러한 결과로 2.5%NaCl김치의 발효 패턴과 유사했던 0.2%초피김치와 1.7%, 2.5%NaCl김치의 총균수와 젖산균의 변화를 측정한다. 결과 0.2%초피첨가김치는 초기 총균수가 대조군(1.7%, 2.5%NaCl김치, 4.2~4.3)보다 낮은 2.3×10^8 CFU/ml이었다. 발효 3일째 역시 초피첨가김치가 낮았다. *Lactobacillus* sp.의 성장도 1.7%NaCl김치에 비해 다소 저해되었다. 발효 6일째 *Leuconostoc* sp.의 경우 0.2%초피김치의 경우 2.5%NaCl김치보다는 적었으나 1.7%NaCl김치보다 약간 많았으며 9일째에도 비슷한 경향을 보였다(data 생략).

4) 관능 검사

15°C 발효 6일째 0.2%, 0.5%초피첨가김치가 1.7%NaCl김치에 비해 외관과 전체적인 맛에서 좋은 결과를 보였으며 1%에서는 군덕맛이나 신맛에서 현저한 감소를 보였으나 전체적인 맛과 외관에서 좋지 않았다. 0.5%보다 0.2%가 탄산미(새콤한 내와 맛)에서 높은 수치를 보였으며 외관에서 더 좋았다. 1.7%NaCl김치는 발효 6일째부터 과숙현상이 일어나서 9일째는 변패 현상이 일어났다. 이로서 1.7%NaCl+0.2%초피첨가김치는 NaCl 2.5%의 보통소금농도의 김치와 큰 차이가 없어 본 연구를 통해 이를 저소금김치로 개발하였다.

나. 다시마 첨가김치의 개발

Alginate는 이온교환 반응을 일으켜 Na의 흡수를 저해한다고 알려져 있으며 다시마에 20%정도 함유되어 있다. 이 연구에서는 Na 흡착에 의한 저염효과와 암예방 기능 증진을 위해 다시마 첨가김치의 개발을 시도하였다. 기초연구로 다시마의 첨가형태 및 첨가량을 결정하였고, 김치에서 다시마의 역할을 살펴보기 위해 젖갈을 첨가하지 않은 대조김치, 다시마를 첨가한 김치, 다시마와 젖갈을 첨가한 김치를 제조하여 1

5°C에서 9일간 발효시키면서 이화학적 변화와 관능검사 등을 연구하였다.

1) 다시마의 alginate 추출물과 alginate의 Na흡착효과 시험

Alginate와 sodium alginate, 그리고 다시마에서 추출한 alginate는 Na흡착효과가 컸는데 sodium alginate는 용해가 되기 쉬운 상태로 위장의 pH 조건에서도 Na를 29.9% 흡착하였고, 소장의 pH조건에서는 33.8%의 흡착효과를 나타내었다. Alginate는 소장의 알칼리 상태에서 소금을 35.3% 흡착하고 다시마에서 추출한 alginate도 소장의 pH 조건에서 27.4%의 흡착효과를 보여 Na의 흡수를 저해시켰다(Table 4-36).

Table 4-36. Na-binding capacity of various kinds of dietary fiber by equilibrium dialysis method

Dietary fiber	pH 2.0 (Stomach cond.)		pH 7.0 (Small intestine cond.)	
	Dialysis of Na(ppm)	Na-binding capacity(%)	Dialysis of Na(ppm)	Na-binding capacity(%)
IDF ¹				
Control			164.0 ± 11.3	
Cellulose	149.0 ± 1.4	—	172.7 ± 6.6	—
	176.0 ± 33.9			
SDF ²				
Control	72.0 ± 0.0		228.9 ± 10.0	
Pectin	100.0 ± 39.6	—	239.8 ± 21.3	—
	176.8 ± 5.9		349.4 ± 8.5	
Control	184.4 ± 44.2	—	227.5 ± 61.0	34.9
Gua gum				
	264.7 ± 33.0		597.5 ± 38.9	
Control	193.7 ± 31.0	26.8	577.8 ± 7.8	3.3
Carageenan				

¹ Insoluble dietary fiber, ² Soluble dietary fiber

2) 다시마의 첨가형태 및 첨가량

세척된 열장다시마를 powder, 3×3, 0.5×3, 0.2×5cm로 절단하여 10, 30, 50%로 첨가하여 외관검사를 행한 결과는 Table 4-37과 같다. 10%에서는 3×3이 가장 점수가 높았으나 30%에서는 0.5×3cm로 가장 좋은 점수를 얻었다. 이후 다시마 첨가형태 및 첨가수준은 기호도가 높은 최대 첨가량인 0.5×3cm 형태로 30% 첨가하였다.

Table 4-37. Means of appearance analysis data of sea tangle added kimchi

Levels of addition(%)	Additive types			
	Powder	3 × 3 cm	0.5 × 3 cm	0.2 × 5 cm
10	2.1 ± 1.1 ¹	3.8 ± 1.0	3.2 ± 0.7	3.0 ± 1.0
30	1.4 ± 0.5	3.0 ± 1.4	3.9 ± 0.9	2.8 ± 0.8
50	1.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1	2.2 ± 0.8	1.9 ± 1.1

¹ As the value increases from 1 to 5, the intensity of favorite characteristics increases

3) 다시마첨가 김치의 이화학적특성

다시마첨가김치는 초기발효가 빨리 진행되어 대조김치(pH 5.1)나 다시마젓갈첨가김치(pH 5.1)보다 약간 낮은 pH 4.9로 나타났는데, 이는 다시마가 김치내에서도 소금을 일부 흡수하였기 때문으로 생각되며 젓갈첨가의 경우 젓갈의 완충 작용으로 급격한 pH의 감소는 일어나지 않았다. 산도에서는 6일째 젓산의 생성이 대조김치에 비해 다시마첨가김치(0.81%)와 다시마젓갈첨가김치(0.84%)가 더 컸다. 환원당의 경우 다시마젓갈첨가김치, 다시마첨가김치, 대조김치의 순이었으며 발효과정 중에도 이러한 경향을 유지했다(Fig. 4-11). 총균수와 젓산균의 변화를 살펴보면(Fig. 4-12), 발효기간 중 3일째 *Leuconostoc* sp.의 경우 다시마 첨가김치는 6.6×10^8 CFU/ml로 가장 많았으며, 6일째는 젓갈다시마가 6.0×10^8 CFU/ml로 가장 많았다. *Lactobacillus* sp.의 경우 발효 6일째 대조김치에 비해 다시마첨가김치와 다시마젓갈첨가김치가 많았다. 이는 김치에 다시마를 첨가하였으므로 환원당의 함량이 증가하여 미생물의 증식이 촉진된 것으로 사료된다.

4) 다시마첨가김치의 식이섬유 함량

다시마첨가김치의 경우 대조김치에 비해 SDF가 증가되어 일반배추의 경우 건조물당 $6.2 \pm 0.9\%$ 에서 $9.2 \pm 0.9\%$ 로 크게 증가되었으나 IDF는 $17.2 \pm 0.1\%$ 에서 $14.9 \pm 0.1\%$ 로 감소하여 TDF는 $23.4 \pm 0.8\%$ 에서 $24.6 \pm 0.9\%$ 로 약간 증가되었다(Table 4-38).

5) 관능검사

대조김치와 다시마 첨가김치 그리고 다시마 젓갈첨가김치를 15°C에서 6일간 발효시킨 후 관능검사를 행하였다(Fig. 4-13). 다시마 첨가김치 그리고 다시마 젓갈첨가김치가 외관과 전체적인 맛과 탄산미(새콤한 내와 맛)에서 훨씬 좋았다. 젓갈첨가 유무에 따른 차이점으로 젓갈을 사용하지 않은 다시마첨가김치의 경우가 군덕맛에서 훨씬 적었고 탄산미가 조금 많았다.

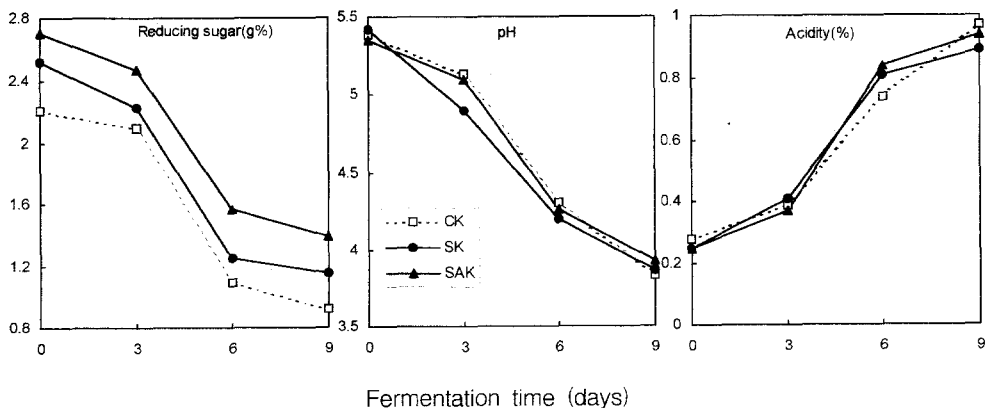


Fig. 4-11. Changes in reducing sugar, pH and total acidity of control kimchi(CK), sea tangle added kimchi(SK), sea tangle and anchovy added kimchi(SAK) during fermentation at 15°C

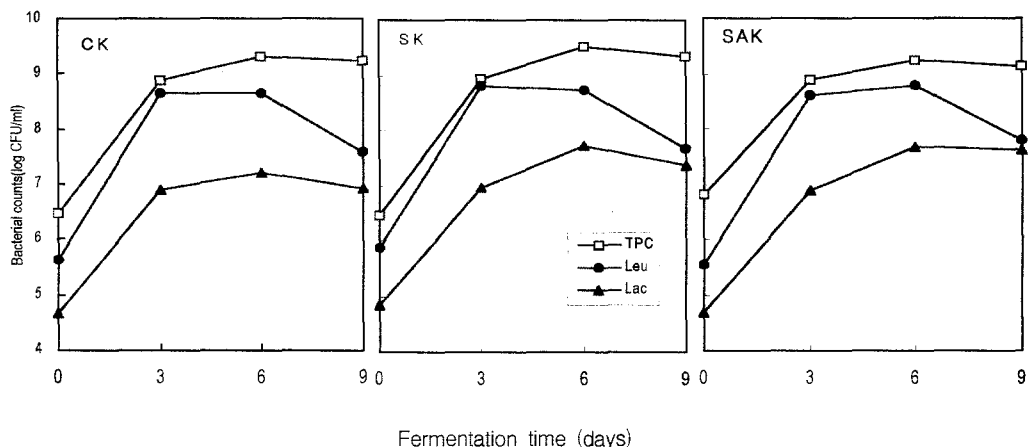


Fig. 4-12. Microbial changes of control kimchi(CK), sea tangle added kimchi(SK), sea tangle and anchovy added kimchi(SAK) during fermentation at 15°C.
 TPC; Total plate count Leu; *Leuconostoc sp.* Lac; *Lactobacillus sp.*

Table 4-38. Contents of soluble dietary fiber(SDF), insoluble dietary fiber(IDF) and total dietary fiber(TDF) in control kimchi and sea tangle added kimchi (%)

Sample	Moisture content	Soluble dietary fiber (SDF)	Insoluble dietary fiber (IDF)	Total dietary fiber (TDF)
Control kimchi	92.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1 (6.2 ± 0.9)	1.3 ± 0.2 (17.2 ± 0.1)	1.8 ± 0.1 (23.4 ± 0.8)
Sea tangle added kimchi	92.7 ± 0.4	0.7 ± 0.0** (9.2 ± 0.9)**	1.1 ± 0.3 (14.9 ± 0.1)	1.8 ± 0.1 (24.6 ± 0.9)

The data in the paranthesis are expressed as dry basis
 ** Significantly different at the p<0.01 level by Student's t-test

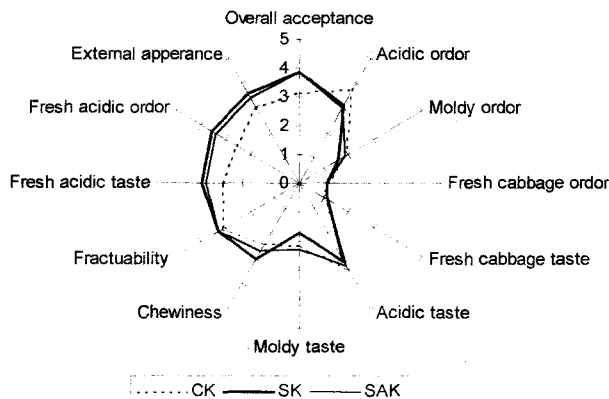


Fig. 4-13. QDA(quantitative discriptive analysis) of control kimchi(CK), sea tangle added kimchi(SK), sea tangle and anchovy added kimchi(SAK) fermented after 6 days at 15°C.

이와 같이 개발된 다시마 김치는 저염김치의 일종으로 소금을 포획제거하는 김치로 개발되었으며 다시마가 가지는 기능성이 또한 강조되는 김치로 이용될 수 있다.

다. KCl 대체 암예방증진 김치 개발

1) 대체염에 대한 농도별 관능검사

대체염으로서의 이용 가능성이 큰 몇가지 염(calcium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, potassium sulfate)을 선택하여 0.25%, 0.75%, 2.5%에서 관능검사를 행하였다. 0.75%농도에서 짠맛을 비교해 보았을 때 NaCl이 4.1인데 대해 KCl은 3.0이며 다른 대체염은 1.2~1.7이었으며 쓴맛은 NaCl이 1.2인데 대해 KCl은 1.9이며 다른 대체염인 K_2SO_4 는 1.3 이었으나 $MgCl_2$ 는 3.5, $CaCl_2$ 는 3.3으로 나타나, 짠맛이 강하고 짠 맛이 적은 potassium chloride를 대체염으로 선정하였다.

그리하여 KCl을 NaCl에 대해 0, 10, 20, 30, 50, 100%로 대체시켜 관능 검사를 행한 후, 짠맛이 가장 강하며 다른 이미(쓴맛, 짠맛, 금속성맛)가 급격히 증가되지 않는 범위인 30% 선정하였는데, 차 등의 연구에서 KCl을 소금의 50%까지 대체하여 담근 것같은 재래식 것갈에 비해 별 손색이 없었고 식염 4%, KCl 4%, lactic acid 0.5%, sorbitol 6% 및 고춧가루, 알코올 추출물 4%(w/v) 첨가하여 담근 경우 것의 품질이 가장 좋았으며 염농도는 4%에 불과했다. 이외에도 대체염으로 NaCl에 대해 KCl을 50% 대체한 염을 많이 이용하고 있다. 본 실험에서도 염도 0.75%에서 다른 대체염은 짠맛의 5점 평점법을 행하였을 때 1.2~1.7이었으나 NaCl이 4.1인데 비해 KCl은 3.0이어서 짠맛이 가장 컸다. 염도 2.5%에서 역시 KCl이 가장 짠맛이 커서 NaCl이 4.7인데 비해 KCl이 3.7이었고 $CaCl_2$ 가 3.3이었으나 쓴맛에서 KCl이 2.7인데 반해 $CaCl_2$ 는 3.8로 쓴맛이 컸다. NaCl에 대해 30% KCl 대체염은 짠맛에서도 2.5%와 비교하여 충분히 대체염의 기능을 할 수 있었다.

2) 대체염의 항균성

NaCl과 KCl로 30% 대체시킨 소금에 대한 항균실험을 하였다. 최적의 배양조건인 배지와 배양온도에서 시간별로 배양시킨 경우에 두 군간에 차이를 보이지 않았으며 배추즙액을 이용한 배지에서도 12, 24, 36시간별로 *Leu. mesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Pichia membranefaciens*에 대한 항균 실험을 행하였으나 소금과 30% 대체염 사이에 거의 차이점을 보이지 않아 식품의 보존성 측면에서도 대체염의 이용이 기대된다(결과 생략).

3) NaCl과 KCl의 생리활성 비교연구

NaCl의 30%를 KCl로 대체시켜 제조한 KCl김치는 기능적으로 발효측면에서 크게 문

제가 없었으므로 KCl과 NaCl 자체의 생리적 기능성 비교 중 암과 관련되어 peroxide value, 보들연변이 및 위암세포성장저해효과를 측정하였다.

가) NaCl과 KCl의 과산화 촉진 비교

NaCl과 KCl을 0.2, 0.4, 0.6%농도로 linoleic acid mixture에 첨가하여 자동산화시킨후 POV가를 측정하였다(Fig. 4-14). NaCl은 농도가 증가함에 따라 증가되어 0.6%에서는 POV가가 크게 증가하였으나 KCl은 대조구와 비슷한 수치로 거의 증가하지 않았다.

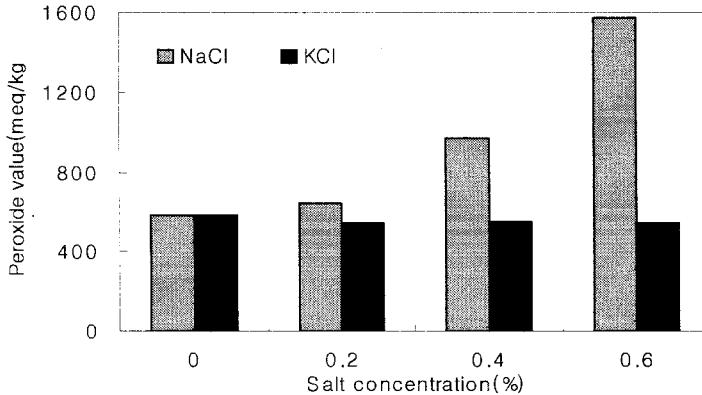


Fig. 4-14. Effects of NaCl and KCl on the autooxidation(peroxide value) of linoleic acid incubated at 50°C for 24 hr.

나) NaCl과 KCl의 보들연변이성 비교실험

NaCl과 KCl을 3, 7, 15, 25%농도로 MNNG와 함께 TA100균주에 처리한 결과 3%처리시 대조구는 복귀돌연변이수가 695 ± 27 였으나 NaCl은 1445 ± 136 로 보들연변이성이 증가하였으나 KCl은 798 ± 35 로써 크게 증가하지는 않았으며 7%처리시 복귀돌연변이수가 NaCl은 2215 ± 204 개를 보였으나 KCl은 892 ± 86 이고 그 보들연변이성에 큰 차이를 보였으며 15, 25%에서도 같은 경향을 보였다. 이것으로 Na이 보들연변이 유발에 주로 관여하나 Cl도 어느 정도는 관여할 것으로 생각된다(data 생략).

다) NaCl과 KCl의 위암세포 성장저해효과 비교실험

SRB assay에서 NaCl보다 KCl이 전구간 AGS와 HT 인체암세포에 대한 세포독성효과가 컸다. 특히 AGS 세포에서 KCl이 8%($1600 \mu\text{g}/\text{well}$)인 경우 1.073M로 NaCl은 6.27%($1254 \mu\text{g}/\text{well}$)가 같은 M농도로 저해율에서 KCl이 높았다. AGS 인체위암세포를 이용한 실험에서 $12.5 \sim 800 \mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 NaCl과 KCl을 처리한 결과 $12.5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{well}$ 과 $200 \sim 400 \mu\text{g}/\text{well}$ 에서 NaCl처리군은 대조군($50 \times 10^4/\text{ml}$) 보다 세포수가 많았으나 ($55 \sim 67 \times 10^4/\text{ml}$) KCl처리군은 모든 농도에서 대조군보다 적었다($28 \sim 24 \times 10^4/\text{ml}$). 50과 $100 \mu\text{g}/\text{well}$

에서 NaCl과 KCl모두 AGS 인체위암세포가 사멸되는 경향을 보였다(data 생략).

4) NaCl과 KCl의 C3H10T1/2 cell에서 MCA에 대한 cytotoxicity억제 및 항발암효과

NaCl과 KCl이 발암물질의 세포독성작용과 발암과정에 어떤 영향을 미치는지를 살펴보기 위해 C3H/10T1/2 cell을 이용하여 cytotoxicity test와 transformation assay를 하였다. NaCl과 KCl은 모든 첨가농도에서 MCA의 C3H/10T1/2 cell에 대한 cytotoxicity를 억제하는 것으로 나타났다(Table 4-39). KCl은 NaCl보다 더 높은 cytotoxicity억제효과를 보였으며 30% NaCl을 첨가했을 때 cytotoxicity억제효과가 급격하게 낮아져 고농도의 소금이 cocarcinogenic effect를 나타낼 가능성이 있음을 보여주었다. MCA에 의한 transformation foci 형성 촉진/억제 효과를 검토하기 위해 Type I, Type II, Type III로 구분하여 foci를 계수한 결과는 Table 4-40과 같다. 대조군의 경우 Type II(50%발암성)와 Type III(85%발암성)를 합친 것이 35개인데 비해 KCl은 20%와 30%의 농도에서 각각 10.7, 26.3개로 MCA에 의한 transformation foci형성을 저해시켜 KCl이 암발생억제효과를 보임을 관찰할 수 있었다. 그러나 NaCl은 Type I foci형성은 감소시켰으나 Type II + Type III foci형성은 증가시켜 고농도의 소금이 암발생 촉진인자로 작용할 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 사용했던 김치 제조시 KCl 대체김치는 암의 예방면에서는 유리하리라고 생각된다.

Table 4-39. Cytotoxicity of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 μ g/ml), NaCl and KCl

	Cell colony(level of sample, %)				
	1	5	10	20	30
MCA(control)	108 \pm 4(1.00) ¹				
NaCl	115 \pm 3(1.06)	124 \pm 3(1.15)	139 \pm 2(1.29)	144 \pm 4(1.33)	119 \pm 2(1.10)
KCl	130 \pm 3(1.20)	151 \pm 4(1.40)	159 \pm 6(1.47)	163 \pm 3(1.51)	165 \pm 1(1.53)

¹The values in parentheses are cytotoxicity

Table 4-40. Inhibitory effect of NaCl and KCl on the transformation of C3H/10T1/2 cells treated with 3-methyl cholanthracene (MCA, 10 μ g/ml)

Sample(%)	Total number			
	Type I foci	Type II foci	Type III foci	Type II + III foci
MCA (control)	28 \pm 3	25 \pm 2	10 \pm 2	35 \pm 2
MCA + NaCl				
20	23 \pm 3	25 \pm 3	15 \pm 3	40 \pm 3
30	23 \pm 2	20 \pm 2	16 \pm 2	37 \pm 3
MCA + KCl				
20	35 \pm 2	16 \pm 2	4 \pm 4	20 \pm 4
30	31 \pm 3	17 \pm 4	8 \pm 2	26 \pm 4

5) 대조김치(NaCl 1.7%와 2.5%김치)와 KCl대체김치의 비교

가) 이화학적 특성

소금으로 1.7%로 절여진 배추에 각각 0.8%의 NaCl과 KCl을 첨가하여 최종염도 1.7%NaCl, 2.5%NaCl김치 그리고 KCl대체김치(1.7%NaCl+0.8%KCl)를 담구었다. 발효 3일째 1.7%NaCl김치가 pH 4.6로 급격히 떨어졌으나 2.5%NaCl김치 그리고 KCl대체김치는 각각 pH 5.2와 pH 5.24로 거의 차이가 없었고 6일째 1.7%NaCl김치는 pH 4.2였으나 2.5%NaCl김치 그리고 KCl대체김치(1.7%NaCl+0.8%KCl)는 각각 pH 4.2와 pH 4.3으로 나타나 KCl대체김치는 저장성이 있는 것으로 밝혀졌다(결과 생략). 산도는 비슷한 양상을 보였으나 pH의 차이만큼 크지는 않았다. 환원당에서 1.7%NaCl김치는 발효 3일째 1.7g%로 환원당의 감소가 현저했으나 2.5%NaCl김치는 2.1g% 그리고 KCl대체김치는 2.0g%로 나타났다. 발효 6일째 1.7%NaCl김치는 0.9g%로 1.0g% 이하로 떨어졌으나 2.5%NaCl김치는 1.3g% 그리고 KCl대체김치는 1.2g%로 나타나서 대체염의 사용으로 발효의 지연효과와 저장성을 높일 수 있었다. 깍두기를 이용한 실험에서 소금의 50%를 KCl로 대체한 깍두기는 소금만을 첨가한 깍두기와 비교할 때 압축실험(compression test)으로 경도를 측정할 경우 차이를 나타내지 않았고 20℃에서 발효 4일째 pH와 산도에서도 차이를 나타내지 않았다. 또한 맛에서 신맛, 짠맛에 큰 차이가 없고 쓴맛과 불쾌한 향미는 비교적 적어 그 사용 가능성이 있었다(결과 생략).

나) 젖산균수

젖산균의 수를 MRS plate로 계수한 결과 발효 3일째 1.7%NaCl김치는 3.4×10^8 CFU/ml이었으나, KCl대체김치와 2.5%NaCl김치는 각각 8.0×10^8 , 7.2×10^8 CFU/ml로 KCl대체김치가 오히려 젖산균수가 많았고 발효 6일째 1.7%NaCl김치는 4.0×10^8 CFU/ml였으나 2.5%NaCl김치가 다소 높았으나 1.7%NaCl김치에 비해 두 균은 모두 높아 KCl대체김치와 2.5%NaCl김치는 각각 8.6×10^8 , 9.6×10^8 CFU/ml으로 나타났다. 김치의 발효과정 중 변화하는 젖산균의 변화를 측정할 결과 실험에서 총균수 역시 1.7%NaCl김치보다 KCl대체김치와 2.5%NaCl김치가 높았는데 이는 대부분이 젖산균으로 생각된다. *Leuconostoc* sp.의 경우 발효 초기인 3일째 1.7%NaCl김치는 2.5×10^8 CFU/ml이었으나, KCl대체김치와 2.5% NaCl 김치는 각각 6.4×10^8 , 7.0×10^8 CFU/ml를 나타내어 발효 9일째 KCl대체김치와 2.5%NaCl김치는 여전히 각각 2.8×10^8 , 3.6×10^8 CFU/ml를 나타내었으나 1.7%NaCl김치는 1.7×10^8 CFU/ml로 감소를 보이기 시작했고 *Lactobacillus* sp.의 생성이 증가해 발효 9일째 3.7×10^8 CFU/ml으로 성장했으나 KCl대체김치와 2.5% NaCl 김치는 1.3×10^7 CFU/ml와 3.7×10^6 CFU/ml로 KCl대체김치와 2.5%NaCl김치는 여전히 *Leuconostoc* sp.가 우위 균체였다.

다) 관능검사

1.7%NaCl김치, KCl대체김치와 2.5%NaCl김치를 15℃에서 6일간 발효한 후 관능검사를 한 결과를 보면, KCl대체김치와 2.5%NaCl김치가 1.7%NaCl김치의 경우보다 신맛과 균

덕맛, 신내, 군덕내에서 현저하게 적었으며 질감과 외관에서도 우세했다. 그러나 2.5%NaCl김치가 KCl대체김치에 비해 질감과 탄산미인 새콤한 맛, 그리고 외관에서 조금 나았다. KCl대체김치는 2.5% NaCl 김치와 짠맛, 쓴맛, 땀은 맛에서 전혀 차이를 보이지 않아 대체염으로서의 가능성이 크게 나타났다(data생략). 다른 연구에서도 KCl을 소금의 50% 이하로 대체한 깍두기는 소금만을 첨가한 깍두기와 비교할때 맛에서 신맛, 짠맛에 큰 차이가 없고 쓴맛과 불쾌한 향미는 비교적 적어 그 사용 가능성이 있었다고 하였다. KCl 또는 NaCl과 이들로 제조된 김치에 대한 생리적인 차이점이 계속 연구되어야 하며 이로부터 건강에 유리한 기능성 김치의 개발도 가능하다고 하겠다.

6) 소금종류(NaCl+KCl, 구운소금, 한주소금)를 달리하여 발효한 김치식이 본태성고혈압취(SHR)의 혈압과 혈액성상에 미치는 효과

이 연구는 제 2세부 과제와 연계한 연구로 KCl김치 등 소금종류를 달리하여 제조된 김치식이 본태성고혈압취(SHR)의 혈압과 혈액성상에 미치는 효과를 살펴보기 위해 기계염(한주소금, HA), 가공염(구운소금, GU), 대체염인 KCl로 제조된 김치(NaCl+KCl 김치, KC)를 식이에 첨가하여 혈압을 측정하고 혈액과 간의 지질함량을 측정하였다. 대조군에는 김치 및 NaCl을 첨가하지 않았으며 김치에 함유된 소금의 양인 1.6%의 NaCl을 첨가한 군도 함께 비교하였다.

실험동물의 혈압의 변화는 Fig. 4-15에 나타내었다. 혈압의 변화는 Table 4-41에서 보는 바와 같이 NaCl을 첨가하지 않은군(RE)은 혈압이 계속적으로 증가추세를 보였으며, NaCl 첨가군(CO, 대조군)은 처음 2주동안은 변화를 보이지 않다가 식이에 적응한 후로는 김치첨가군과 같이 혈압 감소추세를 보였다. 따라서 1.6%의 NaCl을 식이에 첨가한 군은 오히려 혈압을 낮추는 것으로 보아 저농도의 소금은 혈압을 감소시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 김치군들간에는 유의적인 차이는 나지않았으나 대체염인 KCl로 제조된 김치가 다소 혈압을 내리는 효과가 있었으며 구운소금군에서 혈압 강하가 가장 크게 나타났다.

혈액의 콜레스테롤은 구운소금군과 KCl군이 유의적($p < 0.05$)으로 낮게 나타났고, NaCl을 첨가하지 않은군(RE)이 가장 높게 나타났으며, 중성지방은 유의적인 차이가 없었으나 구운소금군이 다소 낮은 것으로 나타났다. 또한 NaCl을 첨가한 군(Co)은 소금 종류별로 제조된 김치를 첨가한 군보다는 높지만 NaCl을 첨가하지 않은군(RE) 보다는 cholesterol 수치가 낮아 낮은 농도의 NaCl은 혈중 cholesterol을 저하시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이 연구는 NaCl이 암생성을 억제하였다는 앞의 결과와 비슷한 결과라 하겠다.

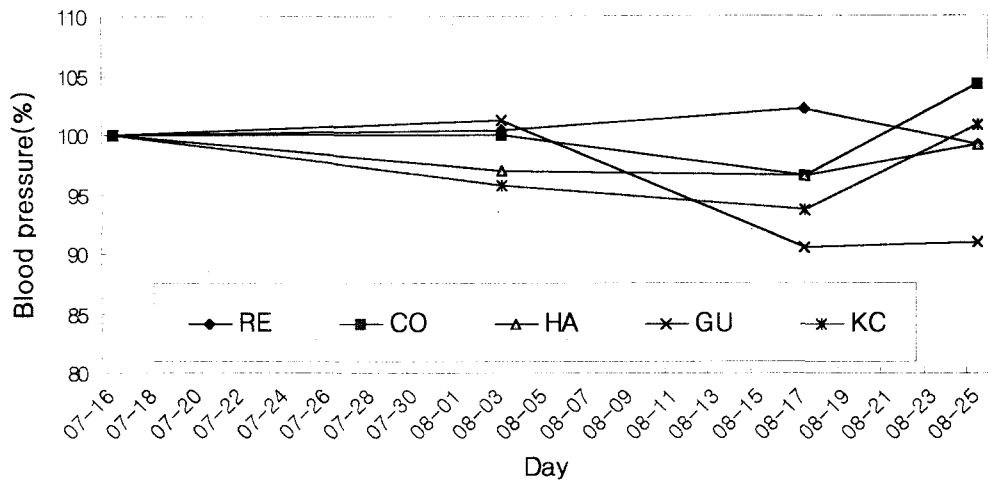


Fig. 4-15. Effect of Kimchi on the change of blood pressure in SHR
*data are expressed as the mean

Table 4-41. Effect of kimchi on the variations of blood pressure in SHR

	8/3BP-7/16BP	8/17BP-7/16BP
RE	+1.7±24.7	+11.8±29.1
CO	+0.0±20.3	-8.0±15.1
HA	-6.3±28.9	-7.5±27.5
GU	+3.7±17.2	-23.0±16.6
KC1	-10.2±27.5	-11.8±8.4

Table 4-42. Effect of kimchi on the cholesterol and triglyceride concentrations in plasma of SHR(mg/dl)

	Cholesterol	Triglyceride
RE	132.2±35.5 ^b	21.3±8.2
CO	104.0±12.3 ^{ab}	36.6±9.5
HA	97.1±27.7 ^{ab}	33.4±16.5
GU	90.2±16.9 ^a	26.6±9.8
KC	90.0±11.5 ^a	39.9±19.9

^{ab}Values with different superscript are significantly different at p<0.05 level by one-way ANOVA test

간의 지질 중 총지질의 양은 각 군간에 유의적인 차이가 없었으나 구운소금군에서 다소 높게 나타났으며, 간의 콜레스테롤 농도도 구운소금군에서 다소 높게 나타났다. KCl로 제조된 김치를 첨가한 군은 cholesterol 함량을 감소시키는 효과를 보였다. 그

러나 NaCl을 첨가한 군(Co)은 총지질함량이 NaCl을 첨가하지 않은군(RE)이나 소금 종류별로 제조된 김치를 첨가한 군보다 낮아 역시 저농도의 NaCl은 혈압을 낮추며 혈액 cholesterol 및 간의 총지질 함량을 낮추어 주어 생체에서 유익하게 작용함을 확인할 수 있었다.

Table 4-43. Effect of kimchi on the total lipid and cholesterol concentrations of liver in SHR

	Total lipid(%)	Cholesterol(mg/g Liver)
RE	24.0±5.5	35.6±8.4
CO	21.7±3.4	34.0±7.1
HA	24.0±4.2	34.5±4.8
GU	27.7±6.4	37.2±9.0
KC	23.6±5.2	30.9±7.0

7) KCl을 이용한 배추김치의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암성 증진효과

김치에서 가장 문제가 되는 소금의 함량을 줄이기 위해 소금첨가량의 30%를 KCl로 대체한 김치를 제조하였다. 4차년도에서는 표준화김치와 암예방기능성 증진 레시피에 소금첨가량의 30%를 KCl로 대체한 김치를 제조하여 15°C에서 1일간 전 발효시킨 후 5°C에서 발효시키면서 이화학적 변화를 살펴보고 적숙기 김치를 동결건조한 후 메탄올로 추출하여 암예방 및 항암성 증진효과를 살펴보았다.

가) KCl 대체 김치의 이화학적 특성 및 관능성

표준레시피에 KCl을 대체한 표준화김치Ⅱ(1.7%천일염 + 0.8%KCl), 표준화김치Ⅲ(1.7%구운소금 + 0.8%KCl)와 표준화김치Ⅳ(1.7%한주소금 + 0.8%KCl)는 표준화김치Ⅰ(2.5%천일염)에 비해 발효가 천천히 진행되었는데 표준화김치Ⅰ(2.5%천일염)은 4주째 pH가 3.99인 반면 표준화김치Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ는 5주째에도 pH가 4.0이상이었다. 암예방기능성 증진김치Ⅰ과Ⅱ는 5주째 pH가 각각 4.23, 4.38로 표준화 김치보다 발효가 더디게 진행되었다. 산도 역시 KCl을 대체한 표준화김치Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ가 표준화김치Ⅰ(2.5%천일염)보다 낮았으며 발효 전기간 동안 암예방 기능성 증진김치Ⅱ의 산도가 가장 낮았다(Fig. 4-16). 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp. 젖산균은 발효 1주째에는 표준화김치Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ가 표준화김치Ⅰ(2.5%천일염)보다 많았으나 그 후에는 큰 차이를 보이지 않았다. 표준화김치Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ는 3주째까지 *Leuconostoc* sp. 젖산균 수가 증가하다가 그 후에 감소하였고 암예방 기능성 증진김치Ⅰ,Ⅱ는 5주 이후에 감소하였는데 암예방 기능성 증진 레시피로 담근 김치가 표준화 레시피로 담근 김치보다 *Leuconostoc* sp. 젖산균 수가 다소 낮았다. 표준화김치Ⅱ,Ⅲ,Ⅳ는 발효 전기간동안 표준화김치Ⅰ보다 *Lactobacillus* sp. 속 젖산균의 수가 적었다(Fig. 4-17).

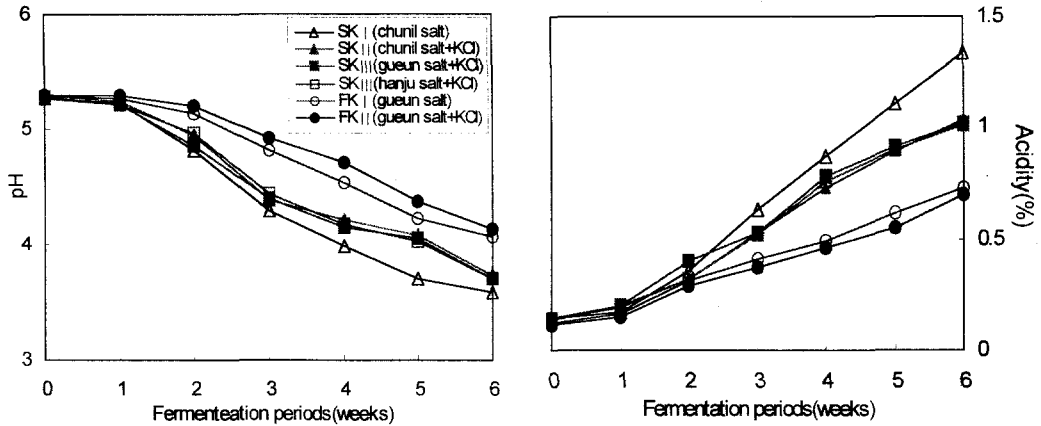


Fig. 4-16. Changes of pH and acidity in various kinds of chinese cabbage kimchi fermented at 15°C for 1 day and then 5°C (SK ; standardized kimchi, FK ; functional kimchi)

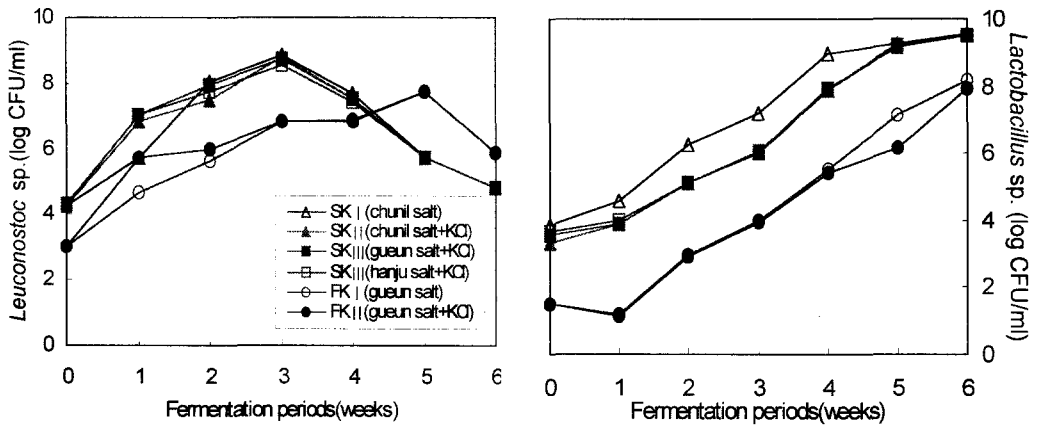


Fig. 4-17. Changes of *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. counts in various kinds of chinese cabbage kimchi fermented at 15°C for 1 day and then 5°C (SK ; standardized kimchi, FK ; functional kimchi)

관능검사 결과 KCl 대체김치인 표준화김치 II, III, IV는 약간의 쓴맛이 있어 표준화김치 I 보다 종합적인 평가는 좋지 못했다(Fig. 4-18).

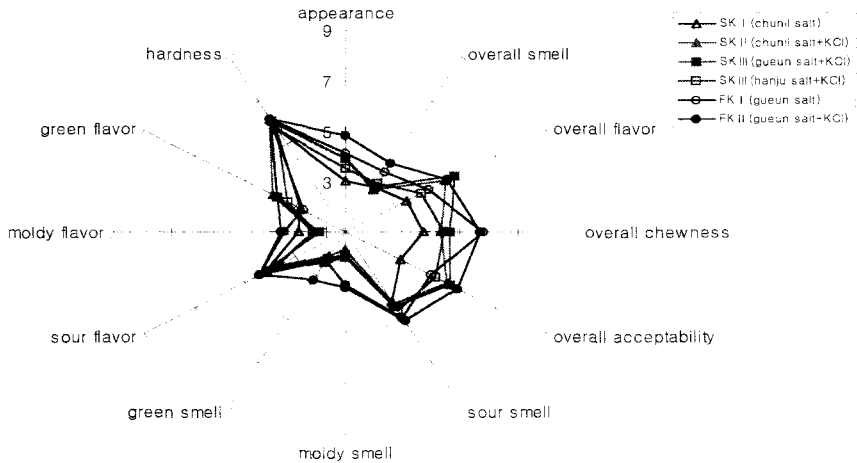


Fig. 4-18. QDA profile¹⁾ of various kinds of standardized kimchi(SK) fermented at 15°C for 1 day and then 5°C after 3 weeks and functional kimchi(FK) fermented at 15°C for 1 day and then 5°C after 5 weeks

¹⁾ Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely good, 9-extremely bad in subjective evaluations(appearance, overall smell, overall flavor, overall chewiness and overall acceptability), and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluations(sour smell, moldy smell, green smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor and hardness)

나) KCl 대체 김치의 *in vitro* 항암성 증진효과

표준레시피와 암예방기능성 증진 레시피에 KCl을 대체하여 담근 6종류의 배추김치 메탄올추출물의 AGS 인체 위암세포에 대한 *in vitro* 항암 활성을 검토하였다. AGS 인체 위암세포를 이용하여 MTT assay와 암세포 성장저해 효과를 검토해 본 결과를 Table 4-44에 나타내었다. 100µg/assay에서 표준화김치 I (2.5%천일염)는 45%의 위암 세포 증식억제효과를 보인 반면 표준레시피에 KCl을 대체한 표준화김치 II (1.7%천일염 + 0.8%KCl), 표준화김치 III (1.7%구운소금 + 0.8%KCl)와 표준화김치 IV (1.7%한주소금 + 0.8%KCl)는 54-58%, 암예방 기능성김치 II는 75%의 암세포증식억제효과를 보였다. 김치시료를 처리하면서 6일간 배양한 후 AGS 인체 위암세포의 성장억제 효과(Table 4-45)를 검토한 결과에서도 KCl 대체김치인 암예방 기능성김치 II는 표준화김치 I (2.5%천일염)보다 30%이상 높은 위암세포의 성장억제효과를 보였다.

다) *In vivo*에서 KCl 대체김치의 항암효과 및 면역활성 증강효과

In vivo 항암실험계에서 NaCl과 KCl의 작용을 검토하기 위해 마우스 sarcoma-180 종양세포를 이용하여 마우스에서 고형암성장 저지효과, 간, 비장 등의 장기 중량변화, 비장면역기능의 변화, 간에 존재하는 glutathione-S-transferase활성 변화를 살펴보았다.

Table 4-44. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment($\mu\text{g}/\text{assay}$)	OD ₅₄₀	
	100	200
Control	0.621 \pm 0.020 ^a	0.621 \pm 0.020 ^a
Standardized kimchi I (Chunil salt)	0.339 \pm 0.010 ^b (45) ¹⁾	0.115 \pm 0.010 ^b (82)
Standardized kimchi II (Chunil salt+KCl)	0.283 \pm 0.010 ^c (54)	0.055 \pm 0.010 ^c (91)
Standardized kimchi III (Gueun salt+KCl)	0.263 \pm 0.010 ^{cd} (58)	0.039 \pm 0.010 ^c (94)
Standardized kimchi IV (Hanju salt)	0.281 \pm 0.010 ^{cd} (55)	0.049 \pm 0.010 ^c (92)
Functional kimchi I (Gueun salt)	0.259 \pm 0.010 ^d (58)	0.049 \pm 0.010 ^c (92)
Functional kimchi II (Gueun salt+KCl)	0.158 \pm 0.010 ^e (75)	0.012 \pm 0.010 ^d (98)

$$1) \text{ Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}}{\text{OD}_{540} \text{ of control}} \times 100$$

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 4-45. Growth inhibitory effect of methanol extracts from various kinds of ingredient added chinese cabbage kimchi against AGS human gastric adenocarcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C

Treatment(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell number($\times 10^4/\text{ml}$)	Inhibition rate(%)
Control	70 \pm 4 ^a	
Standardized kimchi ¹⁾ I (Chunil salt)	35 \pm 2 ^b	50
Standardized kimchi II (Chunil salt+KCl)	20 \pm 3 ^c	71
Standardized kimchi III (Gueun salt+KCl)	19 \pm 1 ^c	73
Standardized kimchi IV (Hanju salt)	22 \pm 2 ^c	69
Functional kimchi ²⁾ I (Gueun salt)	19 \pm 2 ^c	73
Functional kimchi II (Gueun salt+KCl)	10 \pm 2 ^d	86

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(1) 세포 독성 실험(Viability test)

*In vitro*에서 시료가 sarcoma-180 세포에 직접적인 독성을 나타내지 않는 시료의 농도를 찾아 마우스에 투여하기 위해 sarcoma-180 세포가 seeding된 24well에 여러 농도의 시료를 첨가한 후 종양세포의 생존율과 총세포수를 관찰하였다(Table 4-46). Viability test를 한 결과 모든 시료가 1.0mg/ml까지 독성이 없었으므로 1.0mg/kg의 시료를 마우스 복강에 투여하여 고형암성장저지효과를 살펴보았다.

Table 4-46. Viability of sarcoma-180 cells in a culture medium containing the methanol extracts from various kinds of kimchi

Sample	Final conc. (mg/ml)	Total cell numbers ($\times 10^4$)	Viability of cell(%)
Control		23.7 \pm 1.2	98
Standardized kimchi ¹⁾ I (Chunil salt)	0.1	23.3 \pm 0.9	97
	0.5	22.0 \pm 0.8	92
	1.0	20.0 \pm 0.8	83
	1.5	19.3 \pm 0.9	79
Standardized kimchi II (Chunil salt+KCl)	0.1	24.0 \pm 0.8	96
	0.5	23.0 \pm 0.8	94
	1.0	21.0 \pm 0.8	86
	1.5	19.7 \pm 0.9	80
Standardized kimchi III (Gueun salt+KCl)	0.1	23.7 \pm 0.5	98
	0.5	22.0 \pm 0.8	92
	1.0	21.7 \pm 1.2	89
	1.5	18.3 \pm 0.5	76
Functional kimchi ²⁾ (Gueun salt+KCl)	0.1	23.7 \pm 0.5	98
	0.5	21.7 \pm 0.5	89
	1.0	21.0 \pm 0.8	86
	1.5	18.3 \pm 0.9	73

¹⁾The values in parentheses are viability of cell(%)

(2) 각 장기의 증량변화

표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군은 종양세포만 이식한 대조군과 체중이 비슷했으나 표준화김치 II (1.7%천일염 + 0.8%KCl)와 표준화김치 III (1.7%구운소금 + 0.8%KCl)를 투여한 군은 종양세포 이식군보다 체중이 증가하였다. 종양세포만 이식한 대조군은 정상마우스보다 비장, 간, 신장의 증량비가 크게 증가하였고 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군은 이들의 증량비가 종양세포이식군과 비슷하였으나 표준화김치 II (1.7%천일염 + 0.8%KCl), 표준화김치 III (1.7%구운소금 + 0.8%KCl)와 기능성김치를 투여한 군은 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군보다 간, 신장, 비장의 증량비가 감소하였다(Table 4-47).

(3) 고형암 성장 저지 효과

종양세포만 이식한 대조군은 종양의 무게가 6.1g이었으나 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군은 종양의 무게가 4.7g으로 감소하여 23%의 종양생성억제효과를 나타내었다. 표준화김치 II (1.7%천일염+0.8%KCl) 김치 투여군은 표준화김치 I 보다 높은 39%의 종양형성억제효과를 보여 김치제조시 소금(NaCl)의 일부를 KCl로 대체할 경우 고형암성장저제효과가 높아짐을 관찰할 수 있었다. 기능성 김치 투여군은 종양의 무게가 3.0g으로 52%의 종양형성억제효과를 보여 표준화 김치 I 투여군의 2배 이상의

Table 4-47. Effects of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the spleen, liver, heart, kidney weight of Balb/c mouse the methanol extracts from various kinds of kimchi

Sample	Dose (mg/kg)	Body wt. (g)	Spleen/body wt. (%)	Liver/body wt. (%)	Heart/body wt. (%)	Kidney/body wt. (%)
Control		30.1±0.9	0.3±0.1	6.3±0.6	0.5±0.0	1.5±0.1
S-180+PBS		28.6±0.7	1.5±0.1	8.4±0.5	0.3±0.0	1.9±0.1
S-180+SK ¹ I (Chunil salt)	1.0	28.0±1.2	1.5±0.1	7.9±0.3	0.5±0.1	1.9±0.1
S-180+SKII (Chunil salt+KCl)	1.0	29.6±0.8	1.2±0.1	7.7±0.5	0.5±0.0	1.7±0.1
S-180+SKIII (Gueun salt+KCl)	1.0	29.5±0.1	1.2±0.1	7.1±0.5	0.5±0.1	1.6±0.1
S-180+FK ² (Gueun salt+KCl)	1.0	28.9±0.5	1.2±0.1	6.6±0.2	0.5±0.0	1.7±0.1

¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

고형암 성장저지효과를 보였다(Table 4-48). 즉 절임 또는 김치의 소금의 종류에 따라 항암성이 차이가 있음을 알 수 있다.

Table 4-48. Antitumor activities of the methanol extracts from various kinds of kimchi in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Sample	Dose(mg/kg)	Tumor wt. (g)	Inhibition rate(%)
S-180+PBS		6.1±0.1	
S-180+SK ¹ I (Chunil salt)	1.0	4.7±0.3	23
S-180+SKII (Chunil salt+KCl)	1.0	3.8±0.3	39
S-180+SKIII (Gueun salt+KCl)	1.0	4.1±0.1	33
S-180+FK ² (Gueun salt+KCl)	1.0	3.0±0.3	52

¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

(4) Glutathione S-transferase(GST)활성 변화

GST는 환원된 glutathione을 이용하여 체내독성물질과 과산화물질의 전이, 배설에 관여하는 효소로 이 실험에서 GST활성은 종양세포를 이식하지 않은 정상군이 가장 높아 613.5nmol/mgprotein/min이었으며, 종양세포를 이식한 대조군은 290.0nmol/mg protein/min로 감소하였다. 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군은 406.3nmol/mg protein/min로 종양세포이식군보다 GST의 활성이 높아졌으며 표준화김치II(1.7%천일염+0.8%KCl)와 표준화김치III(1.7%구운소금+0.8%KCl)를 투여한 군은 각각 447.9nmol/mg protein/min, 451.4nmol/ mgprotein/min로 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군보다 높아졌다. 기능성김치 투여군의 GST활성은 477.9nmol/mg protein/min로 표준화김치 II (1.7%천일염+0.8%KCl)와 표준화김치 III(1.7%구운소금 + 0.8%KCl)를 투여한 군보다 높았다(Fig. 4-19).

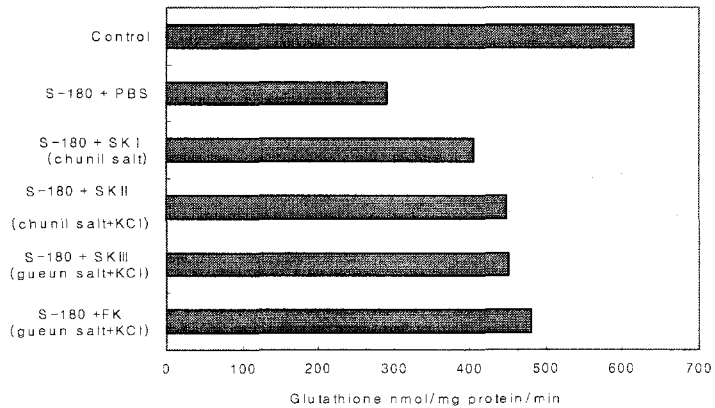


Fig. 4-19. Effect of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the activities of hepatic cytosolic glutathione-S-transferase in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice. ¹Standardized kimchi ²Functional kimchi

(5) *In vivo* 면역활성 증강효과

Yac-1 세포에 대한 세포파괴 활성이 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군은 41%, 표준화김치 II (1.7%천일염 + 0.8%KCl)와 표준화김치 III (1.7%구운소금 + 0.8%KCl)를 투여한 군은 각각 47%와 49%로 KCl 대체김치 투여군이 표준화김치 I (2.5%천일염) 투여군보다 NK cell의 면역활성이 높았다. 또한 기능성김치 투여군은 55%의 높은 세포파괴 활성을 보여 암예방 기능성증진 레시피에 KCl을 대체하면 표준화김치 I (2.5%천일염)보다 마우스비장내 자연살해세포의 Yac-1 cell에 대한 세포파괴활성이 높아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 4-20).

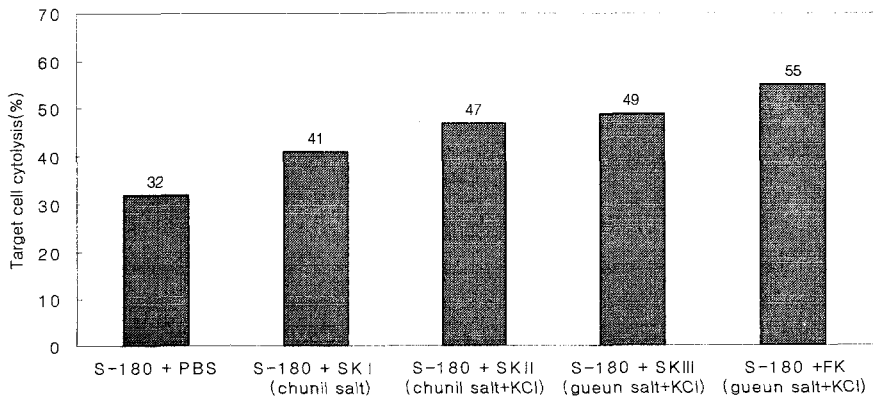


Fig. 4-20. The influence of the methanol extracts from various kinds of kimchi on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes. (SK : Standardized kimchi, FK : Functional kimchi)

5. 암예방성 KCl 혼합죽염개발

가공염 중 죽염이 *in vitro*와 *in vivo*에서 돌연변이유발을 크게 억제하였다. 또한 KCl 혼합염이 김치에서 암예방효과 및 항암효과를 증진시켰다. 이 연구에서는 죽염의 원료로 천일염의 일부를 KCl로 혼합한 KCl 혼합죽염을 제조하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 암예방효과를 살펴보고 이 소금을 이용한 김치를 제조하여 이화학적 특성 및 *in vitro* 암예방효과를 살펴보았다.

가. KCl 혼합죽염의 돌연변이 유발 촉진/억제 효과

Ames 실험계에서 KCl 혼합 죽염의 항돌연변이 효과를 검토한 결과 모든 처리군에서 MNNG에 대해 보돌연변이성이 관찰되었으나 구운소금과 KCl 혼합 죽염은 다소 낮은 보돌연변이 효과를 보였다(Table 4-49). KCl은 가장 낮은 보돌연변이성을 보여 10mg/plate의 농도에서도 1020±44개의 복귀돌연변이수를 나타내었으나 정제염인 한주소금은 1.5mg/plate의 농도에서도 1407±17개의 복귀돌연변이수를 나타내어 높은 보돌연변이성을 보였다. KCl 혼합죽염은 원료소금에 혼합한 KCl의 양이 많을수록 보돌연변이 효과가 낮았는데 NaCl과 KCl의 비를 3:7로 하여 1회 구운 죽염이 낮은 복귀돌연변이수를 나타내었다. 1회 구운 죽염과 2회 구운 죽염은 보돌연변이성에 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 4-49. Effect of various kinds of salt on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG ; 0.4µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate		
	1.5mg/plate	5mg/plate	10mg/plate
Spontaneous	135 ± 6	135 ± 6	135 ± 6
Control(MNNG)	541 ± 21 ^e	541 ± 21 ⁱ	541 ± 21 ⁱ
KCl	579 ± 13 ^e	857 ± 29 ^h	1020 ± 44 ^h
Purified salt	1407 ± 17 ^a	1859 ± 41 ^a	1932 ± 36 ^a
Gueun salt	958 ± 12 ^c	1307 ± 20 ^{de}	1652 ± 28 ^b
BS1 ¹⁾ (Chunil salt)	845 ± 31 ^d	1270 ± 11 ^{ef}	1475 ± 7 ^d
BS1 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	878 ± 42 ^d	1150 ± 36 ^g	1439 ± 13 ^g
BS1-B(NaCl:KCl=5:5)	973 ± 18 ^c	1272 ± 25 ^{ef}	1495 ± 14 ^f
BS1-C(NaCl:KCl=7:3)	1046 ± 33 ^b	1376 ± 5 ^c	1666 ± 31 ^e
BS2-A(NaCl:KCl=3:7)	843 ± 29 ^d	1242 ± 8 ^f	1442 ± 36 ^d
BS2-B(NaCl:KCl=5:5)	944 ± 29 ^c	1354 ± 25 ^{cd}	1553 ± 35 ^c
BS2-C(NaCl:KCl=7:3)	975 ± 7 ^c	1444 ± 39 ^b	1667 ± 39 ^b

¹⁾ 2×heat treated bamboo salt ²⁾ 1×heat treated bamboo salt

SOS chromotest에서 보돌연변이 효과를 살펴보기 위해 *E. coli*의 변이주인 PQ37을

이용하여 MNNG에 대한 보돌연변이 실험을 하였다(Table 4-50). 정제염인 한주소금은 100, 200 μ g의 첨가농도에서 각각 2.56, 2.55의 높은 SOS induction factor를 나타내어 가장 높은 보돌연변이성을 보였으며, 독성에 의해 alkaline phosphatase의 활성이 크게 낮아진 것을 관찰할 수 있었다. 구운소금과 죽염은 오히려 항돌연변이 효과를 나타내었는데 1회 구운 죽염이 2회 구운 죽염보다 돌연변이 유발억제효과가 높았으며, 100 μ g의 첨가농도에서 NaCl과 KCl의 비를 3:7로 하여 1회 구운 죽염이 가장 높은 항돌연변이효과를 나타내었다.

실험방법 즉, Ames test와 SOS chromotest방법에 따라 소금의 보돌연변이유발성은 다르게 나타났다. Ames test에는 거의가 보돌연변이 활성이 나타났지만 SOS chromotest에서는 항돌연변이 효과가 관찰되었다.

Table 4-50. SOS response of various kinds of salt against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG ; 40ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample concentration	β -Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		SOS (β)/(ρ) induction factor	
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit		
Spontaneous	0.549 \pm 0.01	18.3	0.538 \pm 0.01	17.9	1.02	1.00
Control	1.339 \pm 0.01	44.6	0.562 \pm 0.01	18.7	2.38	2.33
100 μ g/plate						
KCl	1.324 \pm 0.02	44.1	0.586 \pm 0.01	19.5	2.26	2.22
Purified salt	1.318 \pm 0.01	43.9	0.505 \pm 0.01	16.8	2.61	2.56
Gueun salt	1.313 \pm 0.01	43.8	0.588 \pm 0.01	19.6	2.23	2.19
BS2(Chunil salt)	1.279 \pm 0.01	42.6	0.593 \pm 0.01	19.8	2.16	2.12
BS1 ¹⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	1.309 \pm 0.01	43.6	0.624 \pm 0.01	20.8	2.10	2.06
BS1-B(NaCl:KCl=5:5)	1.315 \pm 0.01	43.8	0.592 \pm 0.01	19.7	2.22	2.18
BS1-C(NaCl:KCl=7:3)	1.334 \pm 0.01	44.5	0.551 \pm 0.01	18.4	2.42	2.37
BS2 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	1.276 \pm 0.01	42.5	0.553 \pm 0.02	18.4	2.31	2.26
BS2-B(NaCl:KCl=5:5)	1.320 \pm 0.01	44.0	0.564 \pm 0.01	18.8	2.34	2.29
BS2-C(NaCl:KCl=7:3)	1.332 \pm 0.01	44.4	0.549 \pm 0.01	18.3	2.43	2.38
200 μ g/plate						
KCl	1.356 \pm 0.01	45.2	0.598 \pm 0.01	19.9	2.27	2.23
Purified salt	1.307 \pm 0.01	43.6	0.504 \pm 0.01	16.8	2.60	2.55
Gueun salt	1.357 \pm 0.01	45.2	0.578 \pm 0.01	19.3	2.34	2.29
BS2(Chunil salt)	1.286 \pm 0.01	42.9	0.571 \pm 0.01	19.0	2.26	2.22
BS1 ¹⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	1.320 \pm 0.01	44.0	0.641 \pm 0.01	21.4	2.06	2.02
BS1-B(NaCl:KCl=5:5)	1.282 \pm 0.01	42.7	0.646 \pm 0.01	21.5	1.99	1.95
BS1-C(NaCl:KCl=7:3)	1.329 \pm 0.01	44.3	0.647 \pm 0.01	21.6	2.05	2.01
BS2 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	1.301 \pm 0.01	43.4	0.670 \pm 0.02	22.3	1.95	1.91
BS2-B(NaCl:KCl=5:5)	1.347 \pm 0.01	44.9	0.654 \pm 0.02	21.8	2.06	2.02
BS2-C(NaCl:KCl=7:3)	1.400 \pm 0.02	46.7	0.644 \pm 0.02	21.5	2.17	2.13

¹⁾ 1 \times heat treated bamboo salt ²⁾ 2 \times heat treated bamboo salt

나. KCl 혼합죽염이 고형암의 성장과 면역활성 및 지질과산화에 미치는 영향 (I)

In vivo 항암실험계에서 죽염의 원료로 천일염의 일부를 KCl로 혼합한 KCl 혼합죽염의 작용을 검토하기 sarcoma-180 종양세포를 투여한 Balb/c마우스의 식이에 천일염, 한주소금, 구운소금, 9회 구운죽염, 1회 구운 KCl 혼합죽염A(NaCl:KCl=3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)를 각각 10% 첨가하여 3주간 먹인 후 치사하여 고형암성장저지효과, 비장면역기능의 변화, 신장과 심장에서의 지질과산화의 변화를 측정하였다.

1) 식이섭취량

Balb/c마우스의 서혜부에 sarcoma-180 종양세포를 투여한 다음 날부터 소금이 10% 첨가된 식이를 3주간 섭취시키면서 식이섭취량을 조사한 결과는 Table 4-51과 같다. 하루평균 식이섭취량을 비교했을 때 한주소금군과 구운소금군이 가장 식이섭취량이 낮았으며, 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)군이 유의적으로 식이섭취량이 많았다($p<0.05$).

Table 4-51. Food intake of Balb/c mouse

Group	Food intake(g/day)		
	1 week	2 weeks	3 weeks
Control	20.9±2.0 ^{bc}	21.4±1.8 ^{abcd}	25.5±2.1 ^{bc}
Sarcoma-180	22.7±1.4 ^b	23.3±0.8 ^{bcd}	21.9±3.1 ^{ab}
Sarcoma-180+Chunil salt	19.9±4.4 ^{bc}	24.2±4.2 ^{cd}	20.7±3.4 ^{ab}
Sarcoma-180+Purified salt	15.1±3.9 ^a	17.3±4.1 ^{ab}	19.7±2.7 ^{ab}
Sarcoma-180+Gueun salt	19.8±3.7 ^{bc}	19.1±3.3 ^{abc}	18.7±3.5 ^a
Sarcoma-180+BS9 ¹⁾ (Chunil salt)	21.8±2.0 ^b	17.0±1.0 ^a	24.9±2.3 ^{bc}
Sarcoma-180+BS1 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	29.2±3.7 ^c	31.4±1.2 ^e	28.4±3.0 ^c
Sarcoma-180+BS1-B(NaCl:KCl=5:5)	21.9±3.5 ^b	26.9±2.1 ^{de}	27.6±3.2 ^c

¹⁾ 9×heat treated bamboo salt ²⁾ 1×heat treated bamboo salt

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

2) 각 장기의 중량변화

소금을 첨가한 식이를 섭취한 군은 정상군이나 sarcoma-180세포만 투여한 대조군에 비해서 체중이 유의적으로 낮았는데($p<0.05$) 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)군을 제외한 다른 군은 모두 처음 체중(18.0~19.0g)보다도 낮았다 (Table 4-52). 한주소금과 구운소금 첨가군은 비장의 크기가 정상군의 1/2도 되지 않았다. 간의 중량비에서도 소금첨가군은 정상군이나 sarcoma-180세포만 투여한 대조군 보다 크게 낮았으며 특히 한주소금군, 천일염군, 구운소금군이 낮았다. 심장이나 신장의 중량비는 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 4-52. Effects of various kinds of salt on the spleen, liver, heart, kidney weight of Balb/c mouse

Sample	Body	Spleen/body	Liver/body	Heart/body	Kidney/body
	wt. (g)	wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)
Control	23.6±0.9 ^e	0.4±0.1	6.7±0.2	0.4±0	1.3±0.1
Sarcoma-180	24.3±1.0 ^e	0.8±0.1	8.2±0.2	0.4±0	1.7±0.1
Sarcoma-180+Chunil salt	17.4±1.2 ^c	0.5±0.1	3.2±0.2	0.6±0	1.4±0.1
Sarcoma-180+Purified salt	15.9±0.5 ^{ab}	0.3±0.1	3.1±0.2	0.6±0	1.4±0.1
Sarcoma-180+Gueun salt	14.7±0.9 ^a	0.2±0.1	3.1±0.2	0.7±0	1.2±0.1
Sarcoma-180+BS9 ¹⁾ (Chunil salt)	17.1±0.3 ^{bc}	0.6±0.1	4.7±0.3	0.6±0	1.3±0.1
Sarcoma-180+BS1 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	21.5±0.2 ^d	0.5±0.1	5.8±0.2	0.5±0	1.6±0.1
Sarcoma-180+BS1 ²⁾ -B(NaCl:KCl=5:5)	21.0±0.8 ^d	0.5±0.1	5.7±0.2	0.5±0	1.3±0.1

¹⁾ 9×heat treated bamboo salt ²⁾ 1×heat treated bamboo salt

^{a-e} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3) 고행암 성장 저지 효과

소금첨가식이 섭취군은 모두 sarcoma-180세포만 투여한 대조군(3.9g)보다 고행암의 무게가 유의적으로 작았으며(p<0.05) 한주소금군이 3.3g으로 가장 높았고, 9회죽염군과 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)군이 2.1g으로 고행암의 크기가 가장 작았다(Table 4-53).

Table 4-53. Effects of various kinds of salt in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Group	Tumor wt. (g)	Inhibition rate(%)
Sarcoma-180	3.9±0.5 ^a	
Sarcoma-180+Chunil salt	2.8±0.2 ^{bc}	28
Sarcoma-180+Purified salt	3.3±0.2 ^b	15
Sarcoma-180+Gueun salt	2.7±0.2 ^c	31
Sarcoma-180+BS9 ¹⁾ (Chunil salt)	2.1±0.3 ^d	46
Sarcoma-180+BS1 ²⁾ -A(NaCl:KCl=3:7)	2.1±0.3 ^d	46
Sarcoma-180+BS1 ²⁾ -B(NaCl:KCl=5:5)	2.6±0.2 ^{cd}	33

¹⁾ 9×heat treated bamboo salt ²⁾ 1×heat treated bamboo salt

^{a-e} Means with the different letters are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

4) *In vivo* 면역활성 증강효과

Sarcoma-180세포가 이식된 마우스의 비장에서 NK 세포(자연살해세포)를 분리하여 target cell인 Yac-1 세포에 대한 세포파괴활성을 비교하였다(Fig. 4-21). 한주소금군과 구운소금군은 비장의 중량비가 낮은 만큼 분리된 NK세포의 수가 다른 군의 1/3 정도로 적었으며, Yac-1 세포에 대한 세포파괴활성 역시 30%이하로 낮았다. 반면 9회

죽염군과 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)군은 40%이상의 세포파괴 활성을 보여 오히려 면역활성증강효과를 나타내었다.

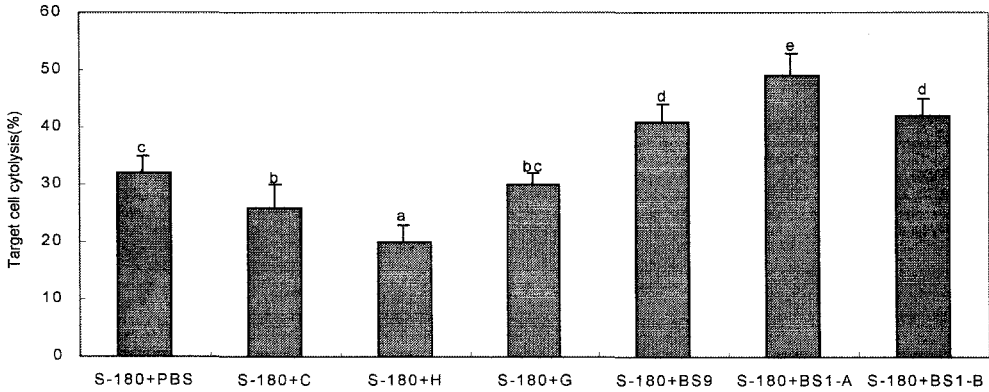


Fig. 4-21. The influence of various kinds of salt on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes.

(C : Chunil salt, P : Purified salt, G : Gueun salt, BS9 : 9×heat treated bamboo salt, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=3:7), BS1-B : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=5:5))

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

5) 신장과 심장에서서의 지질과산화

소금첨가식이 장기의 체내지방산화를 촉진하는 정도를 측정하기 위해서 신장과 신장에서 과산화물가를 측정하였다(Fig. 4-22). 신장의 과산화물가(nmol/g tissue)는 정상군이 61.2로 가장 낮았고 천일염군은 sarcoma-180세포만 이식된 대조군과 비슷한 78.7이었으며, 한주소금군과 구운소금군은 90이상의 높은 값을 나타내었다. 그러나 9회죽염군과 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)군은 모두 sarcoma-180 세포만 이식된 대조군보다 과산화물가가 낮았으며 특히 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)군은 정상군과 비슷한 값을 보여 지질과산화를 촉진하지 않는 것으로 나타났다. 심장에서도 정상군의 과산화물가가 47.4로 가장 낮았으며 천일염군, 한주소금군, 구운소금군은 sarcoma-180세포만 이식된 대조군보다 높은 값을 보여 지질과산화가 이들 소금에 의해 촉진된 것을 볼 수 있었다(Fig. 4-23). 9회죽염군과 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)와 B(NaCl:KCl=5:5)군은 모두 sarcoma-180세포만 이식된 대조군보다 과산화물가가 낮았다.

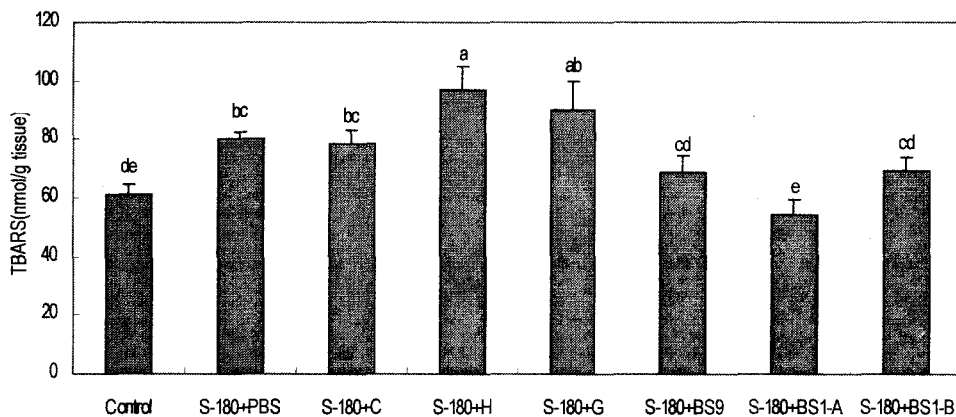


Fig. 4-22. Effect of various kind of salt on the TBARS concentration of kidney in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice.

(C : Chunil salt, P ; Purified salt, G ; Gueun salt, BS9 : 9×heat treated bamboo salt, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=3:7), BS1-B : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=5:5)

*e Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

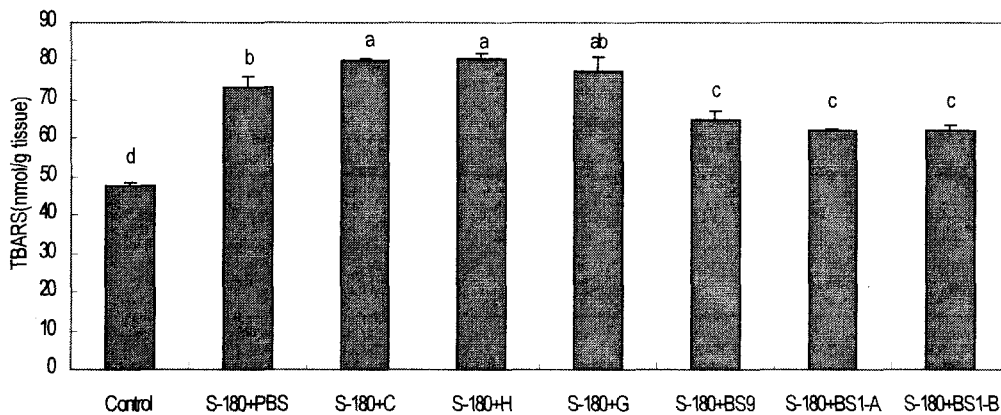


Fig. 4-23. Effect of various kind of salt on the TBARS concentration of heart in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice.

(C : Chunil salt, P ; Purified salt, G ; Gueun salt, BS9 : 9×heat treated bamboo salt, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=3:7), BS1-B : 1×heat treated bamboo salt(NaCl:KCl=5:5)

*e Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

다. KCl 혼합죽염이 고형암의 성장과 자연살해세포의 면역활성 및 지질과산화에 미치는 영향(II)

In vivo 항암실험계에서 죽염의 원료로 천일염의 일부를 KCl로 혼합한 KCl 혼합죽염의 작용을 검토하기 sarcoma-180 종양세포를 투여한 Balb/c마우스의 식이에 정제염(한주소금), KCl, 천일염, 천일염과 KCl의 혼합염1(천일염: KCl=5:5), 천일염과 KCl의 혼합염2(천일염: KCl=3:7), 1회 구운 KCl 혼합죽염A(천일염:KCl=3:7)와 Morton 염(Morton salt, Morton International Inc., USA)을 각각 10% 첨가하여 3주간 먹인 후 치사하여 고형암성장저지효과, 비장면역기능의 변화, 신장과 심장에서의 지질과산화의 변화를 측정하였다.

1) 각 장기의 중량변화

소금을 첨가한 식이를 섭취한 군은 정상군이나 sarcoma-180세포만 투여한 대조군에 비해서 체중이 유의적으로 낮았는데($p < 0.05$) 한주소금군과 천일염군이 가장 낮았고 천일염과 KCl의 혼합염1, 2와 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)군은 높은 체중을 나타내었다(Table 4-54). 비장의 중량비는 모든 소금섭취군에서 정상군과 비슷한 수치를 보였다. 한주소금군과 천일염군은 간의 중량비가 sarcoma-180세포만 투여한 대조군보다 크게 낮았으나 천일염과 KCl의 혼합염1, 2와 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)군은 대조군과 비슷한 간의 중량비를 보였다. 또한 한주소금군은 신장의 중량비가 대조군보다 낮았으나 천일염과 KCl의 혼합염2 와 1회구운죽염 A(NaCl:KCl= 3:7)군은 대조군과 비슷한 신장의 중량비를 나타내었다.

Table 4-54. Effects of various kinds of salt on the spleen, liver, heart, kidney weight of Balb/c mouse

Sample	Body	Spleen/body	Liver/body	Heart/body	Kidney/body
	wt. (g)	wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)	wt. (%)
Control	27.6±0.7 ^a	0.4±0.1	8.0±0.7 ^a	0.4±0	2.0±0.1 ^a
Sarcoma-180+Control	26.0±0.6 ^b	0.8±0.1	7.3±0.7 ^{ab}	0.4±0	2.1±0.1 ^a
Sarcoma-180+Purified salt	20.8±0.3 ^a	0.3±0.1	5.7±0.5 ^c	0.5±0	1.3±0.1 ^d
Sarcoma-180+KCl	22.6±0.2 ^{de}	0.3±0.1	7.1±0.4 ^{ab}	0.4±0	1.8±0.1 ^b
Sarcoma-180+Chunil salt	21.3±0.3 ^{fg}	0.4±0.1	5.6±0.5 ^c	0.5±0	1.9±0.1 ^a
Sarcoma-180+CK1(Chunil salt:KCl=5:5)	23.2±0.7 ^{cd}	0.4±0.1	7.8±0.4 ^a	0.4±0	1.7±0.1 ^{bc}
Sarcoma-180+CK2(Chunil salt:KCl=3:7)	24.0±0.9 ^c	0.4±0.1	7.1±0.4 ^{ab}	0.4±0	1.9±0.1 ^a
Sarcoma-180+BSI ¹⁾ -A(Chunil salt:KCl=3:7)	23.5±0.5 ^{cd}	0.4±0.1	7.2±0.4 ^{ab}	0.4±0	1.9±0.1 ^a
Sarcoma-180+Morton salt	21.8±0.3 ^{ef}	0.4±0.1	6.4±0.4 ^{bc}	0.5±0	1.6±0.1 ^c

¹⁾ 1×heat treated bamboo salt

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

2) 고형암 성장 저지 효과

한주소금 섭취군은 고형암의 무게가 2.8g으로 sarcoma-180세포만 투여한 대조군(2.2g)보다 고형암의 무게가 증가하였고($p < 0.05$) KCl 섭취군은 대조군과 비슷한 고형암 크기를 보였다(Table 4-55). 천일염과 KCl의 혼합염 1, 2와 1회구운죽염 A(천일염:KCl= 3:7)군은 고형암의 무게가 1.2~1.5g으로 감소하여 고형암형성 억제효과를 보였다.

Table 4-55. Effects of various kinds of salt in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Group	Tumor wt. (g)	Inhibition rate(%)
Sarcoma-180+Control	2.2±0.2 ^b	
Sarcoma-180+NaCl	2.8±0.2 ^a	-
Sarcoma-180+KCl	2.2±0.3 ^b	-
Sarcoma-180+Chunil salt	2.0±0.2 ^b	9
Sarcoma-180+CK1(Chunil salt:KCl=5:5)	1.5±0.1 ^c	32
Sarcoma-180+CK2(Chunil salt:KCl=3:7)	1.4±0.2 ^c	34
Sarcoma-180+BS1 ¹⁾ -A(Chunil salt:KCl=3:7)	1.2±0.3 ^c	44
Sarcoma-180+Morton salt	1.2±0.3 ^c	44

¹⁾ 1×heat treated bamboo salt

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

3) *In vivo* 면역활성 증강효과

Sarcoma-180세포가 이식된 마우스의 비장에서 NK 세포(자연살해세포)를 분리하여 target cell인 Yac-1 세포에 대한 세포파괴활성을 비교하였다(Fig. 4-24). 한주소금군과 천일염군은 Yac-1 세포에 대한 세포파괴활성이 30%이하로 낮았다. 반면 천일염과 KCl의 혼합염 1, 2와 1회구운죽염 A(천일염:KCl= 3:7)군은 40%이상의 세포파괴활성을 보여 오히려 면역활성증강효과를 나타내었다.

4) 신장과 심장에서의 지질과산화

소금첨가식이 장기의 체내지방산화를 촉진하는 정도를 측정하기 위해서 신장과 심장에서 과산화물가를 측정하였다. 신장의 과산화물가(nmol/g tissue)는 정상군이 52로 가장 낮았고 천일염군은 sarcoma-180세포만 이식된 대조군(93)과 비슷한 92이었으며, 한주소금군은 110이상의 높은 값을 나타내었다(Fig. 4-25). 그러나 천일염과 KCl의 혼합염 1, 2와 1회구운죽염 A(천일염:KCl= 3:7)군은 모두 sarcoma-180세포만 이식된 대조군보다 과산화물가가 낮았다. 특히 1회구운죽염 A(천일염:KCl= 3:7)군은 과산화물가가 50으로 정상군(52)과 비슷한 값을 보여 지질과산화를 촉진하지 않는 것으로 나타났다. 심장에서도 정상군의 과산화물가가 40으로 가장 낮았으며 한주소금군, 천일염군은 sarcoma-180세포만 이식된 대조군보다 높은 값을 보여 지질과산화가 이들

소금에 의해 촉진된 것을 볼 수 있었다(Fig. 4-26). 천일염과 KCl의 혼합염 1, 2군은 모두 sarcoma-180세포만 이식된 대조군보다 과산화물가가 낮았으며, 1회구운죽염 A (천일염:KCl= 3:7)군이 가장 낮은 과산화물가를 보였다.

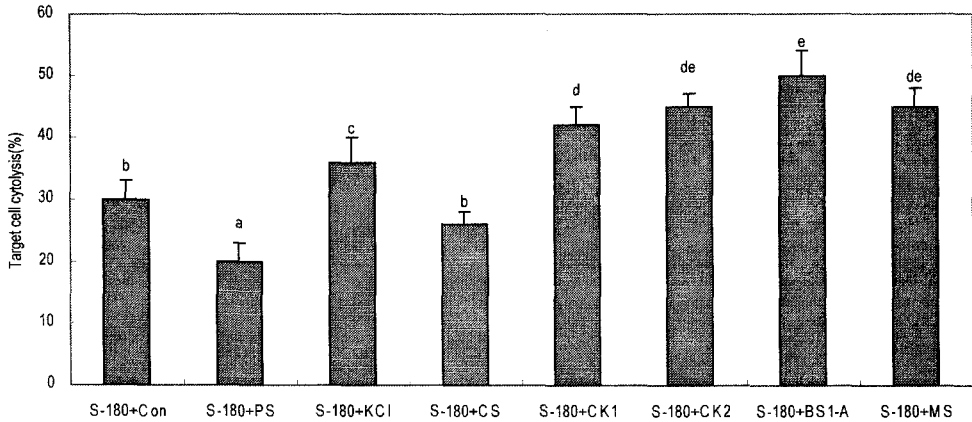


Fig. 4-24. The influence of various kinds of salt on the natural killer(NK) cell activity of mouse splenic lymphocytes.

(Con: Control, PS: Purified salt, CS: Chunil salt, CK1: Chunil salt:KCl=5:5, CK2: Chunil salt:KCl=3:7, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(Chunil salt:KCl=3:7), MS: Morton salt)

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

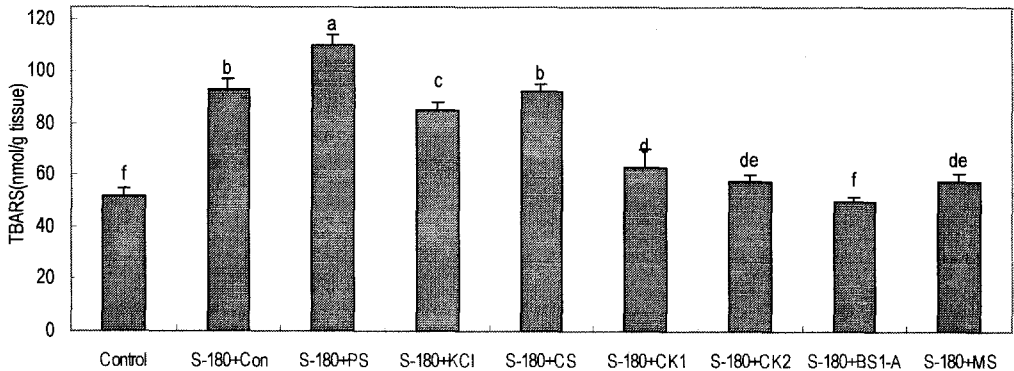


Fig. 4-25. Effect of various kind of salt on the TBARS concentration of kidney in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice.

(Con: Control, PS: Purified salt, CS: Chunil salt, CK1: Chunil salt:KCl=5:5, CK2: Chunil salt:KCl=3:7, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(Chunil salt:KCl=3:7), MS: Morton salt)

^{a-e} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

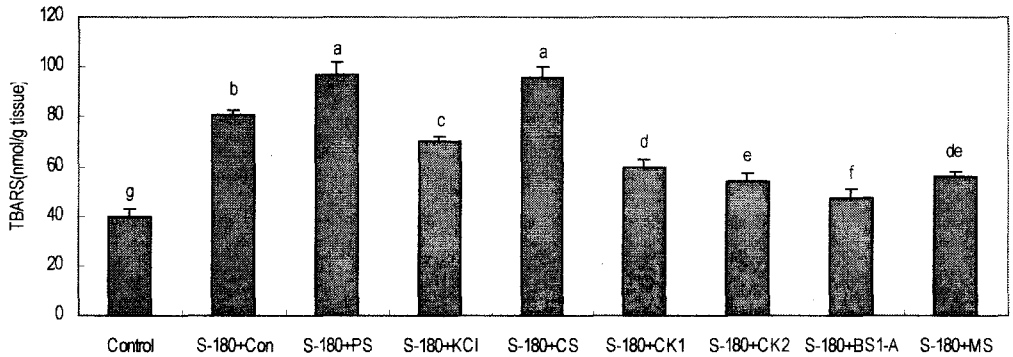


Fig. 4-26. Effect of various kind of salt on the TBARS concentration of heart in normal and sarcoma-180 cell treated Balb/c mice.

(Con: Control, PS: Purified salt, CS: Chunil salt, CK1: Chunil salt:KCl=5:5, CK2: Chunil salt:KCl=3:7, BS1-A : 1×heat treated bamboo salt(Chunil salt:KCl=3:7), MS: Morton salt)

* Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

라. KCl 혼합 죽염을 이용한 배추김치의 항돌연변이 및 *in vitro* 항암성 증진효과
KCl 혼합죽염으로 제조한 김치를 15°C에서 8일간 발효시키면서 이화학적 변화를 살펴보고 적숙기 김치를 동결건조한 후 메탄올로 추출하여 암예방 및 항암성 증진효과를 살펴보았다.

1) KCl 혼합 죽염으로 제조한 이화학적 특성 및 관능성

기능성김치 II(구운소금+KCl)에서 고춧가루함량을 7%에서 5%로 줄인 기능성김치 III 레시피에 KCl혼합죽염을 첨가하여 제조한 김치를 제조하여 이화학적 변화를 살펴보았다. 죽염으로 제조한 김치는 구운소금으로 제조한 김치보다 발효가 빠르게 진행되었다. 그러나 1회 구운 죽염 A(NaCl: KCl=3:7)로 제조한 김치는 15°C에서 발효 8일째에도 4.24의 높은 pH를 나타내어 구운소금+KCl로 제조한 김치보다 저장성이 있었으며, 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)으로 제조한김치는 구운소금+KCl로 제조한 김치와 비슷한 pH 변화를 보였다. 발효 전기간 동안 1회 구운 죽염 A(NaCl: KCl=3:7)로 제조한 김치의 산도가 가장 낮아 저장성이 있음을 보여주었다(Fig. 4-27). 맛에 관여하는 *Leuconostoc* sp. 젖산균수는 KCl혼합죽염으로 제조한 김치와 구운소금+KCl로 제조한 김치가 비슷한 수를 나타내었다. 1회 구운 죽염 A(NaCl: KCl=3:7)로 제조한 김치는 구운소금+KCl로 제조한 김치보다 *Lactobacillus* sp.속 젖산균의 수가 적었다(Fig. 4-27). 관능검사 결과 1회 구운 죽염 B(NaCl: KCl=5:5)으로 제조한 김치가 군덕맛이 적었으며 외관과 종합적인 평가에서 가장 좋은 점수를 얻었다(Table 4-56).

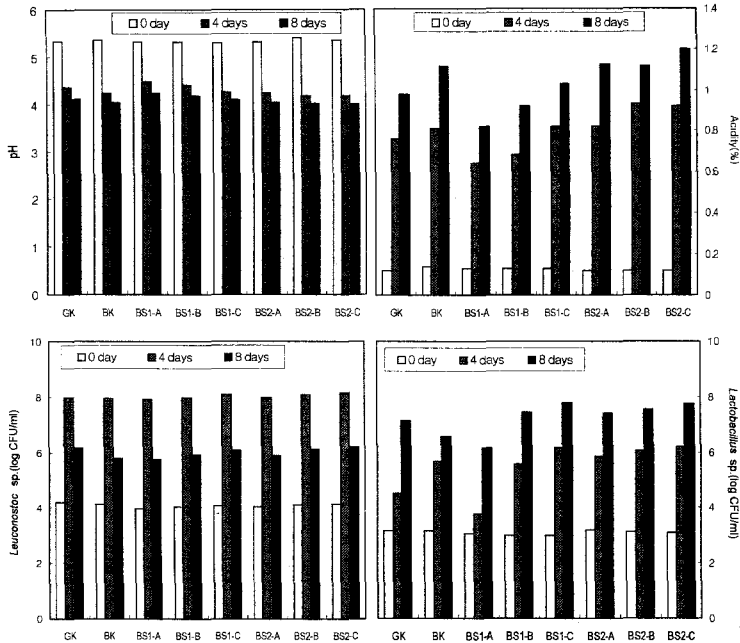


Fig. 4-27. Changes of pH, acidity, *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sp. counts in various kinds of salt added Korean cabbage kimchi fermented at 15°C

GK : gueun salt + KCl, BK : 2×heat treated bamboo salt + KCl
 BS1: 1×heat treated bamboo salt, BS2: 2×heat treated bamboo salt,
 A : NaCl:KCl=3:7, B : NaCl:KCl=5:5, C : NaCl:KCl=7:3

Table 4-56. QDA profile¹⁾ of various kind of Korean cabbage kimchi fermented at 15°C for 4 days

	GK	BK	BS1-A	BS1-B	BS1-C	BS2-A	BS2-B	BS2-C
Appearance	3.8	4.0	4.0	2.6	3.9	3.4	3.6	3.8
Overall smell	4.8	3.7	4.4	3.4	3.9	3.9	4.1	3.7
Overall flavor	3.2	4.3	4.8	3.2	4.1	4.2	3.4	3.7
Overall chewness	3.7	4.1	4.1	3.3	4.1	4.1	4.1	3.8
Overall acceptability	3.5	4.4	4.8	3.2	4.2	4.4	3.9	3.9
Sour smell	4.2	5.1	4.0	4.6	3.4	4.3	4.8	4.0
Moldy smell	2.7	3.0	2.3	1.9	1.7	2.2	2.8	1.9
Green smell	2.1	2.4	2.8	2.4	2.9	1.6	2.7	2.0
Sour flavor	4.9	5.1	4.4	4.8	4.7	4.8	5.2	4.9
Moldy flavor	2.6	2.9	1.9	1.8	1.8	2.0	2.8	2.6
Green flavor	2.1	2.9	2.4	2.2	2.4	2.8	2.4	2.3
Hardness	3.8	5.7	4.7	5.1	5.0	4.4	5.2	4.6

¹⁾ Sensory characteristics rated on 9-point scale : 1-extremely good, 9-extremely bad in subjective evaluations (appearance, overall smell, overall flavor, overall chewness and overall acceptability), and 1-extremely weak, 9-extremely strong in objective evaluations (sour smell, moldy smell, green smell, sour flavor, moldy flavor, green flavor and hardness)

2) KCl 혼합 죽염으로 제조한 김치의 항돌연변이 증진효과

KCl 혼합죽염으로 제조한 김치(pH 4.3) 메탄올추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주의 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 Table 4-57에 나타내었다. 2.5mg/plate 첨가농도에서 구운소금+KCl로 제조한 기능성김치Ⅲ는 MNNG에 대한 돌연변이 유발을 53%억제한 반면 기능성김치Ⅲ-3(1회죽염(NaCl: KCl=5:5)는 73%의 항돌연변이 효과를 나타내었고 기능성김치Ⅲ-2(1회죽염(NaCl: KCl=3:7)는 88%의 항돌연변이 효과를 나타내어 기능성김치Ⅲ(구운소금+KCl)보다 30%이상 항돌연변이 효과가 증진되었다. 죽염 제조시 혼합한 KCl의 양이 많을수록 제조된 김치의 돌연변이 유발억제효과가 높았으며, 1회 구운 죽염과 2회 구운 죽염으로 제조한 김치는 항돌연변이 활성에 차이를 보이지 않았다.

Table 4-57. Effect of the methanol extracts from Korean cabbage kimchi prepared with various kinds of salt on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG ; 0.4 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1. 25mg/plate	2. 5mg/plate
Spontaneous	94 \pm 3	94 \pm 3
Control	905 \pm 32 ^a	905 \pm 32 ^a
FKⅢ(Gueun salt:KCl=7:3)	586 \pm 6 ^b (39)	477 \pm 10 ^b (53)
FKⅢ-1(BS2(Chunil salt:KCl=7:3)	509 \pm 11 ^c (49)	366 \pm 22 ^c (66)
FKⅢ-2(BS1(NaCl:KCl=3:7))	387 \pm 18 ^f (64)	209 \pm 20 ^f (88)
FKⅢ-3(BS1(NaCl:KCl=5:5))	442 \pm 19 ^{de} (57)	317 \pm 11 ^d (73)
FKⅢ-4(BS1(NaCl:KCl=7:3))	469 \pm 15 ^d (54)	380 \pm 12 ^c (63)
FKⅢ-5(BS2(NaCl:KCl=3:7))	397 \pm 20 ^f (63)	206 \pm 8 ^f (86)
FKⅢ-6(BS2(NaCl:KCl=5:5))	419 \pm 14 ^{ef} (60)	268 \pm 7 ^e (79)
FKⅢ-7(BS2(NaCl:KCl=7:3))	476 \pm 15 ^{cd} (53)	319 \pm 28 ^d (72)

BS1: 1 \times heat treated bamboo salt, BS2: 2 \times heat treated bamboo salt

AFB₁의 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과 (Table 4-58) KCl 혼합죽염으로 제조한 김치(기능성김치Ⅲ-2~7)가 구운소금+KCl로 제조한 기능성김치Ⅲ보다 다소 높은 돌연변이 유발억제효과를 나타내었으며 기능성김치Ⅲ-2(1회죽염(NaCl: KCl=3:7) 이 가장 높은 항돌연변이효과를 보였다.

3) KCl 혼합 죽염으로 제조한 김치의 *in vitro* 항암성 증진효과

KCl 혼합죽염으로 제조한 김치 메탄올추출물의 AGS 인체 위암세포에 대한 *in vitro* 항암 활성을 검토하였다. MTT assay를 이용하여 AGS 인체 위암세포에 대한 증식억제 효과를 살펴본 결과(Table 4-59) 200 μ g/assay에서 구운소금+KCl로 제조한 기능성김치Ⅲ는 53%의 위암세포 증식억제효과를 보인 반면 기능성김치Ⅲ-2(1회죽염(NaCl:

KCl=3:7)와 기능성김치Ⅲ-3(1회죽염(NaCl: KCl=5:5)는 AGS 인체 위암세포의 증식을 각각 66%와 76% 억제하였다. 이상의 결과로 볼 때 NaCl과 KCl의 비를 5:5 또는 3:7로 하여 NaCl: KCl=5:51회 구운 죽염을 사용하여 김치를 제조할 경우 김치의 암예방효과 및 항암효과를 증진시킬 수 있을 것으로 보인다.

Table 4-58. Effect of the methanol extracts from Korean cabbage kimchi prepared with various kinds of salt on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Revertants/plate	
	1. 25mg/plate	2. 5mg/plate
Spontaneous	88 ± 5	88 ± 5
Control	1152 ± 35 ^a	1152 ± 35 ^a
FKⅢ(Gueun salt+KCl)	739 ± 22 ^b (39)*	450 ± 16 ^b (66)
FKⅢ-1(BS2(Chunil salt))	703 ± 10 ^{bcd} (42)	430 ± 13 ^{bc} (68)
FKⅢ-2(BS1(NaCl:KCl=3:7))	651 ± 15 ^{ef} (47)	340 ± 19 ^f (76)
FKⅢ-3(BS1(NaCl:KCl=5:5))	691 ± 10 ^{cde} (43)	384 ± 8 ^{de} (72)
FKⅢ-4(BS1(NaCl:KCl=7:3))	730 ± 20 ^{bc} (40)	416 ± 11 ^{bcd} (69)
FKⅢ-5(BS2(NaCl:KCl=3:7))	614 ± 7 ^f (51)	361 ± 12 ^{ef} (74)
FKⅢ-6(BS2(NaCl:KCl=5:5))	638 ± 14 ^f (48)	379 ± 8 ^{de} (73)
FKⅢ-7(BS2(NaCl:KCl=7:3))	686 ± 17 ^{de} (44)	395 ± 7 ^{cde} (71)

BS1: 1×heat treated bamboo salt, BS2: 2×heat treated bamboo salt

*Inhibition rate(%)

Table 4-59. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay of methanol extracts from Korean cabbage kimchi prepared with various kinds of salt against AGS human gastric adenocarcinoma cells

Sample	OD	
	100 µg/assay	200 µg/assay
Control	0.740 ± 0.01	0.740 ± 0.01
FKⅢ(Gueun salt:KCl=7:3)	0.552 ± 0.01 (25)*	0.347 ± 0.02 (53)
FKⅢ-1(BS2(Chunil salt:KCl=7:3))	0.474 ± 0.01 (36)	0.215 ± 0.01 (71)
FKⅢ-2(BS1(NaCl:KCl=3:7))	0.384 ± 0.01 (48)	0.176 ± 0.01 (76)
FKⅢ-3(BS1(NaCl:KCl=5:5))	0.423 ± 0.01 (43)	0.253 ± 0.01 (66)
FKⅢ-4(BS1(NaCl:KCl=7:3))	0.475 ± 0.01 (36)	0.305 ± 0.01 (59)
FKⅢ-5(BS2(NaCl:KCl=3:7))	0.461 ± 0.01 (38)	0.253 ± 0.01 (66)
FKⅢ-6(BS2(NaCl:KCl=5:5))	0.494 ± 0.01 (33)	0.305 ± 0.01 (59)
FKⅢ-7(BS2(NaCl:KCl=7:3))	0.548 ± 0.01 (26)	0.359 ± 0.01 (51)

BS1: 1×heat treated bamboo salt, BS2: 2×heat treated bamboo salt

*Inhibition rate(%)

제 4절 결론

국내에 시판되고 있는 소금을 이용하여 소금 종류에 따른 특성과 생리적 기능의 차이점 등을 검토하고, 김치에서 소금의 함량을 줄이기 위한 저염김치 개발, KCl 대체염 김치개발을 하였다. 또한 본 연구에서는 소금의 암예방 기능을 증진시키기 위해 KCl 혼합 죽염을 제조하였으며 이를 이용하여 암예방/항암 기능성 김치를 개발하였다. 그리고 김치에서 소금의 주요 급원인 젓갈의 안전성도 검토하였다.

위의 일련의 실험을 통해 다음과 같은 결론을 낼 수 있겠다.

- 소금은 종류에 따라 미네랄 함량이 달랐으며 천일염과 가공염 중 구운소금은 Ca, K, Mg, S 등이 많았고, 죽염은 NaCl이 93.6%였고, K와 Fe 함량이 크게 증가되었으며, 정제염은 99.8%가 NaCl이었다.
- 9회 죽염은 횃수가 높아질수록 pb의 함량은 줄고 Cu, Zn, P, K, Fe 함량은 증가하였다. 죽염 제조시 사용되는 진흙은 Cu, K, Fe, P 등의 함량이 높았고 종류에 따라 pb가 다소 오염되어 있었다.
- 소금은 종류에 따라 항균성, 과산화물 축진능, 돌연변이 유발능이 각각 달랐는데 항균성은 정제염이 높았으나 *Leu. mesenteroides* 균에 대해서는 정제염이 항균력이 컸으나 *Lac. plantarum* 부패젓산균에 대해서는 구운소금, 죽염이 항균력이 높았다. 과산화물 축진 및 돌연변이 유발능에 있어서는 정제염이 가장 높았으며 죽염이 가장 낮았고, 이 경우 경제적으로 볼 경우 구운 소금도 좋았다.
- 김치에서 젓갈은 중요 소금원으로 그 안전성에 대해 논란이 많았다. 젓갈을 익히지 않은 상태 (생젓갈)는 소금 때문에 돌연변이 유발성이 있었고 대신 12개월 숙성하여 익은 젓갈은 다소의 항돌연변이 효과가 있어 암예방 측면에서 유리하다고 하겠다.
- 소금의 종류에 따라 배추의 절입속도 등이 달랐으며 죽염이 가장 빠르고 구운소금, 한주소금, 천일염, 호주산염 순이었다. 김치 발효시 구운 소금이 맛, 저장성, 암예방 효과면에서 가장 좋았고, 동맥경화 유발의 경우도 구운 소금을 사용하는 것이 유리하였다.
- 저염김치를 개발하기 위해 소금의 양을 0.8% 감소시키고 초피의 항균성을 이용한 김치를 제조하였다. 이 김치의 특성은 1.7%NaCl과 0.2%초피 첨가김치로

- 2.5%NaCl 첨가 보통김치와 비교해 맛과 발효패턴 등에 큰 차이가 없었다.
- 또 다른 저염김치로 다시마 첨가 김치를 개발 하였다. 다시마는 알긴산을 20% 정도 함유하고 있으며 이 식이섬유소는 Na를 (30%정도) 위, 작은창자 pH 조건 내에서 흡착하는 효과가 있었다. 다시마 김치는 0.5×3 cm flake로 만들어 김치에 30% 첨가하여 제조한 결과 기호도 측면에서 대조김치와 큰 차이를 나타내지 않았고, 기능적인 면에서 우수하였다.
 - 또한 암예방 및 고혈압을 예방하기 위해 김치내의 소금의 양을 줄이는 기술로 KCl 대체염(30%)를 사용하였다. KCl은 NaCl보다 생리적으로 우수하였고, 과산화지질 생성 억제 및 돌연변이 유발억제면에서 우수하였다.
 - KCl 대체염으로 제조한 김치는 다른 소금으로 제조한 것보다 *in vitro* 및 *in vivo*에서 암예방/항암 효과가 우수하게 나타났다.
 - 소금의 특성과 기능성 연구에서 KCl과 NaCl을 3~7 : 7~3의 비율로 혼합하여 1회 또는 2회 구운 죽염은 암예방 활성이 높았다. 이 소금을 이용한 김치는 맛에도 크게 영향을 끼치지 않으며, 암예방/항암 활성이 크게 높아졌다. 이 KCl 혼합 죽염은 특허를 출원하였으며 벤처기업에 기술이전을 할 예정이다.

제 5절 참고문헌

1. Park, K. Y., Baek, K. A., Rhee, S. H. and Cheigh, H. S. : Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotechnology*, 4(3), 141(1995)
2. Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M. and Shirai, T. : Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 101-106(1975)
3. Kim, S. H., Lee, E. H., Kawabata, T., Ishibashi, T., Endo, T. and Matsui, M. : Possibility of N-nitrosamine formation during fermentation of kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 13, 291-306 (1984)
4. Billings, P.C., Uwaifo, A.O. and Heidelberger, C. : Influence of benzoflavone on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity, mutation and transformation of C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.*, 43, 2659 (1983)

5. 이서래, 이경숙: 납의 *in vitro* 흡수에 미치는 식이섬유의 억제효과. 한국식품과 학회지, 21, 63(1989)
6. 양재승, 한성희, 이서래 : 카드뮴의 장내 흡수에 미치는알진산의 억제 효과, 한국영양학회지, 11, 9(1978)
7. Farag, R. S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G.S.A. : Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 792 (1989)
8. A.O.A.C. : *Official methods of analysis*. 14th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D.C., 160 (1984)
9. 신호선 : 식품분석 -이론과 실험-. 신광출판사, 서울 (1983)
10. 이철우, 고창영, 하덕모 : 김치발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지, 20, 102 (1992)
11. 이명기, 박완수, 강국희 : 김치에서 젖산균의 선발 및 계수를 위한 선택배지. 한국식품영양과학회지, 25(5), 754 (1996)
12. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사, 학연사 192 (1989)

제2세부

항노화 기능성 김치무리의 개발연구

여 백

제5장 항산화성 김치 무리의 개발

제 1 절 서설

김치는 우리나라 전통발효식품으로서 채소에 여러 양념류를 혼합하여 발효시켜 제조하므로 다양한 생리활성 물질들을 많이 함유하고 있는데 그 중에서도 항산화 작용과 관련이 있는 chlorophyll, 페놀화합물, 비타민 C, β -carotene 등을 많이 함유하고 있다. 이러한 항산화 물질들은 수소공여체로서 유리기를 소거하는 작용을 가지고 있으므로 항노화성, 항돌연변이성, 항암성 및 항동맥경화성과 관련이 있다. 양념으로 사용되는 고춧가루에는 β -carotene과 비타민 C 함량이 높으며, 마늘과 생강, 파도 강한 항산화효과를 가진 것으로 밝혀지고 있다.

노화는 여러 가지 내적, 외적환경의 영향에 의해 발생하는 복합적인 현상으로 다른 노화 현상과 마찬가지로 유리기(free radical) 이론이 가장 유력한 학설로 인정받고 있다. 유리기는 반응성이 강하기 때문에 세포를 구성하는 단백질 분자와 반응하여 세포의 기능을 상실시켜 피부의 노화를 가져오게 된다. 만성적인 유리기 생성, 항산화계 효소의 활성 감소 등에 의하여 단백질, 지질 및 DNA가 손상을 입게 되기 때문에 관련질병 유발의 원인이 되며 이를 치유하기 위해 비타민 C, β -carotene, α -tocopherol 그리고 glutathione 등의 항산화제와 황산화 효소들이 사용되고 있다.

본 연구는 항노화성을 갖는 기능성 김치무리개발에 관한 일련의 연구를 수행하였다. 즉, 김치의 항산화성물질을 분리조사하고 활성물질을 찾은 후 이 물질의 생성경로를 추적하여 항산화성 김치를 개발하였다. 이때 김치의 항산화성을 증진시킬 수 있는 물질을 부재료를 첨가하여 강화김치를 제조하였다. 또한 이러한 효과를 생체를 이용한 *in vivo*실험에서 이를 확인하고 산업화하는 데 필요한 기초실험을 행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

가. 갓

본 실험에 사용한 돌산갓은 전라남도 여천군 돌산면에서 수확한 돌산 청갓(mustard leaf, *Brassica juncea*)으로 돌산갓 영농조합에서 부산 돌산갓 직판장에 도착한 날 새벽에 바로 구입, 실험에 사용하였으며, 계절별 재료의 차이를 줄이기 위하여 갓은 길이 30~45cm, 무게 25~50g 내외의 것을 사용하였다. 본 실험에 사용한 적갓은 전라남도 완도군 완도읍 장좌리에서 10월에 파종하여 이듬해 3월 중순경에 수확한 적갓(mustard leaf, *Brassica juncea Czerniak et Coss.*)으로 길이 25~35cm, 무게 96g 내외의 것을 사용하였다.

나. 갓김치의 부재료

파는 명지에서 재배된 것, 마늘은 남해에서 재배된 것, 생강은 한국산을 당일 아침 부산 부전시장에서 구입하였고 고춧가루는 충북 제천 봉양농산 박달재 태양초 고춧가루를, 젓갈은 울산 강동 멸치젓, 소금은 천일염을 사용하였으며 설탕은 정제당을 사용하였다.

다. 시약

Linoleic acid(Approx. 99%, capillary GC), 2-thiobarbituric acid 등은 Sigma Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였다. TLC plate는 Merck Korea에서 구입하였으며 항산화 특성을 알아보기 위해 사용된 기타 시약은 시약1급을 사용하였다.

2. 항산화성 갓김치의 설정

가. 갓김치 시료의 이화학적 실험

1) pH 및 산도, 염도

pH의 측정은 pH meter(TM30D, Tokyo, Japan)로, 산도는 pH 8.3이 되도록 0.1N NaOH로 적정하였으며 lactic acid(%) 환산법으로 계산하였으며 김치액의 염도는 염도계(TM30D, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

$$\text{Lactic acid(\%)} = \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 9}{\text{weight of sample (g)}}$$

2) 환원당

환원당은 마쇄한 시료의 즙액을 증류수로 50배 희석 여과한 후 Schoorl법으로 측정하였다.

3) 젖산균수의 측정

젖산균수는 평판계수법(plate count technique)을 이용하여 측정하였다. 갓김치를 homogenizer에서 마쇄한 다음 멸균한 가제로 여과한 김치즙액을 시료액으로 사용하였다. 시료액 1ml를 멸균수로 단계적으로 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 까지 희석하여 각 희석액 중 0.1ml씩을 미리 멸균하여 43~45°C로 냉각한 MRS agar 배지 15ml에 넣고 혼합한 후 petri dish에 평판을 만들고 37°C incubator에서 배양하여 나타난 colony의 수를 계수하여 총젖산균수로 측정하였다.

4) *Leuconostoc* 속 및 *Lactobacillus*속 젖산균의 측정

Leuconostoc sp. 선택배지로는 phenylethyl alcohol과 sucrose를 첨가한

phenylethyl alcohol sucrose agar medium(PES medium)를 사용하여 20°C에서 5일간 평판배양하였다(Table 1). *Lactobacillus sp.* 배지는 Lactobacillus selection medium(LBS medium)에 *Pediococcus*의 생육을 억제하기 위하여 acetic acid와 sodium acetate를 첨가한 modified LBS agar medium(m-LBS medium)를 사용하여 30°C에서 3일간 평판배양하였다(Table 2).

Table 1. Composition of PES medium for *Leuconostoc sp.*

Ingredients	PES medium(g)
Trypticase	5.0
Yeast extract	0.5
Sucrose	20.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.244
KH ₂ PO ₄	1.0
Agar	15.0
phenylethylalcohol	2.5
Water	1000mℓ
pH	9.8

Table 2. Composition of m-LBS medium for *Lactobacillus sp.*

Ingredients	m-LBS medium(%)
Peptone	1.0
Beaf extract	1.0
Yeast extract	0.5
Glucose	2.0
Tween 80	0.1
K ₂ HPO ₄	0.2
Sodium acetate	0.5
Ammonium citrate	0.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
Acetic acid	2.5mℓ/L
Sodium acetate	35g/L

5) 색도

색도는 즙액을 취하여 5배 희석 후 Minolta Chroma Meter (CT-310, Japan)로 L(L : 밝기), a*(+ : 적색, - : 녹색), B*(+ : 황색, - : 청색)을 측정하였다.

6) Texture

Texture의 측정시 3×4cm로 썰어 뿌리에서 5cm의 줄기 부위를 Instron (model 1011, USA)로 puncture test와 cutting test에 의하여 측정하였고 각 시료들은 5회 반복 측정하여 측정치가 비슷한 3개의 평균값으로 하였으며 Instron에 의한 사용조건은 Table 3와 같다.

Table 3. Conditions for texture analysis by Instron

	Puncture test	Cutting test
Maximum force	1Kg, 5Kg	5Kg
Chart speed	20mm/min	20mm/min
Crosshead speed	20mm/min	20mm/min
Probe type	1.2mm, 4mm, rod	Knife
Sample size	3×4cm	3×4cm

나. 관능 검사

반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)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), 군덕내(moldy smell), 풋내(green smell)와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 군덕맛(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 여러차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신내와 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 풋내와 덜익은 맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕내와 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

다. 갓김치의 항산화 실험

1) 가열우육에 대한 항산화성

가열 쇠고기 시료를 조제하기 위해 Fig.1.과 같은 과정을 거쳤다. 한우 우둔육을 구입하여 지방층을 제거한 살코기 부분만을 chopper에서 갈아서 처리한 쇠고기의 수분함량은 75.5%, 조지방질은 1.95%, 조단백질은 20.6%였다. petri dish에 위와 같이 처리한 우육 10g을 취하고 microwave oven(MR-293S, Gold Star Co., 한국)에서 1분간 가열하여 시료별로 model system을 조제하였으며 가열쇠고기에 대한 적갓김치의 항산화성을 살펴보기 위해 model system을 조제하였다. 즉, petri dish에 cooked ground meat(CGM) 10g만을 취한 군과 CGM 10g에 증류수 10ml를 가한 군, CGM 10g에 신선한

적갓을 섞은 군, CGM 10g에 갓김치를 섞은 군 등으로 model system을 조제하였으며 갓김치 model system 제조에 사용한 시료는 15℃에서 4일간 발효시켜 숙성적기에 도달한 돌산갓김치와 갓 담근 적갓김치, 6일 발효시켜 숙성적기에 도달한 적갓김치를 blender로 2분간 마쇄하여 사용하였다. 조제된 각 시료를 4℃에서 4주간 저장하면서 함유지질의 산화양상을 TBA가를 통해 살펴보았다. system 조제시 가열 최고기에 첨가한 김치는 Petri dish에서 model system의 시료를 취하여 blender에서 2분간 마쇄한 후 500ml round flask에 옮겨, 물 47.5ml와 4N 염산 2.5ml를 가하고 소포제인 silicon oil을 입구에 발라준 후 증류장치에 연결하여 증류액 50ml를 취한 후 TBA시액 5ml를 가해 boiling water bath상에서 35분 가열후 얼음물에 식혀 538nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 과산화물가의 측정

과산화물의 측정은 ferric thiocyanate방법으로 측정하였다. 즉 일정농도의 시험액(에탄올)에 용해 2ml과 2.5% linoleic acid(에탄올에 용해)2ml를 vial에 넣고 0.01M phosphate buffer (PH 7.0)4ml과 증류수 2ml를 넣고 혼합한 뒤 빛을 차단한 상태로 37℃의 항온조내에 보관하면서 4일간의 경과 후 생성된 과산화물가를 측정하였다. 이때 측정방법은 산화된 위의 혼합액 0.1ml를 취한 후 여기에 75% 에탄올 4.7ml를 넣고 30% ammonium thiocyanate 0.1ml를 첨가하였다. 이 반응혼합물에 0.02M ferrous chloride(3.5% 염산용액에 용해)0.1ml를 넣고 정확히 3분 후 반복하여 500nm에서 흡광도를 측정하여 과산화물의 생성을 측정하였다. 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

라. 갓김치의 담금과 발효 그리고 조정

실험결과 갓김치의 재료에 따라 향산화성이 달라졌으므로 주재료를 달리한 갓김치를 조제하여 각각의 향산화특성을 살펴보기로 하였으며 모델적갓김치를 제조하였다. 향산화성 모델김치조제를 위해 길이 25~35cm, 무게 96±10g인 적갓을 원료로 하였으며 먼저 잎과 줄기를 나누어 원래 비율에 근사한 잎:줄기(1:1)의 비율로 200g을 취하였다. 이를 흐르는 물에 씻은 후 2×3cm의 크기로 절단하여 망사에 담았다. 이를 15% 소금물 용액에 2시간 동안 절인 후 물로 2회 씻어서 30분간 물기를 뺐다. 이러한 과정을 거친 절인 갓의 염도는 2.5%였으며 앞에서 제시한 나타낸 비율의 양념과 혼합하여 15℃에서 담금직후 발효시켰다. 이때의 레시피는 문헌에 의한 것(Table 13)을 기초로 하였으나 모델레시피는 table 9와 같다. 그리고 실험결과를 바탕으로 레시피를 재조정하였다.

3. 향산화항노화 김치의 특성 연구

가. 갓김치에 함유된 항산화물질의 분석

1) Ascorbic acid 및 총페놀 함량

Ascorbic acid는 hydrazine비색법을 사용하였다. 즉, 산화형 vitamin C가 DNP(2,4-dinitrophenylhydrazine)와 작용하여 적색의 osazone을 형성되도록 한 후 흡광도계(Shimadzu UV-2100, Kyoto, Japan)를 이용하여 520nm에서 비색정량하였다. 시료용액의 제조는 일정량의 김치 시료를 취하여 5배의 5% metaphosphoric acid용액을 가하고 해사를 넣어 마쇄한 뒤 5,000rpm에서 15분간 원심 분리한 상등액을 취하여 행하였으며 L-ascorbic acid 표준용액으로 검량선을 작성하였다.

Total phenol 함량은 Folin-Denis법을 사용하였다. 즉, 동결건조 김치가루 5g을 50 ml methanol에 하룻밤 침지시킨 뒤, 침지에 사용하였던 methanol과 함께 시료를 2분 동안 균질화시키고, 5분 동안 끓인 후 여과하고, 그 잔여물을 뜨거운 methanol로 씻은 뒤 다시 여과하여 불용성 잔여물을 제거하였다. 다음 여과물들을 모아 농축시킨 뒤 methanol에 녹여 100ml로 정용 하였다. 이 여과액 0.1ml에 2% Na₂CO₃ 2ml을 섞고 2분 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.1ml을 가하여 실온에서 30분간 incubation시킨 다음 750nm에서 흡광도를 측정하고 기준물질로 chlorogenic acid를 사용하여 함량을 계산하였다.

2) Total chlorophyll과 Total carotenoids 함량 측정

Chlorophylls의 분석은 White 등의 방법(18)을 송이 일부 수정한 방법으로 행하였다. 추출은 일정량의 마쇄한 김치 시료를 취하여 blender에 넣고, calcium carbonate 나 magnesium carbonate 0.1g과 시료무게 10배 분량의 85% acetone을 가하여 초고속으로 4분간 마쇄한 후 흡입 여과하였다. 색소를 완전히 추출하기 위하여 85% acetone으로 여러번 씻어 주었다. 여과액을 500ml 용량 flask로 옮겨, 85% acetone으로 표준선까지 채웠다. acetone추출액 25ml을 분액여두로 옮기고, 약 30ml의 diethyl ether를 첨가하여 진탕함으로써 지용성 색소인 chlorophylls를 diethyl ether층으로 옮겼다. 아래층 용액을 다른 분액여두로 옮겨, 색이 없어질 때까지 diethyl ether로 재추출하였다. 에테르추출액을 모두 모아서 증류수로 여러번 씻어 acetone을 완전히 제거한 후, 무수 Na₂SO₄를 첨가하여 건조시켰다. 이와 같이 준비된 용액을 diethyl ether를 사용하여 100ml로 정용 하여, chlorophyll a와 chlorophyll b의 최대흡수 파장인 660nm와 642.5nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Cary 13, Australia)로 측정하여 아래와 같이 chlorophylls의 농도를 계산하였다.

$$\text{Total chlorophyll}(\mu\text{l}/\text{ml}) = 7.120\text{D}(660\text{nm}) + 16.80\text{D}(642.5\text{nm})$$

$$\text{Chlorophyll a}(\mu\text{l}/\text{ml}) = 9.930\text{D}(660\text{nm}) - 0.7770\text{D}(642.5\text{nm})$$

$$\text{Chlorophyll b}(\mu\text{l}/\text{ml}) = 17.60\text{D}(642.5\text{nm}) - 2.810\text{D}(660\text{nm})$$

Carotenoids의 함량은 조의 방법에 의해 행하였다. 일정량의 마쇄한 김치시료와 이의 5배 부피에 해당하는 acetone(99.5%)을 가한 후 마쇄기로 4분간 마쇄한 다음 마쇄시료가 acetone에 충분히 잠기도록 하여 냉장고에서 하룻밤 방치하였다. 흡입여과하여 색소를 추출하며 잔사에 색소가 남지 않도록 acetone으로 여러번 세척하였다. 추출액과 세척액을 모두 합하여 chlorophyll과 견화물을 제거하기 위해 냉장고에서 60% KOH로 하룻밤 견화시켰다. 이 견화액을 분액여두에 옮기고 petroleum ether(PE)와 혼합하여 진탕시킴으로서 carotenoids를 PE층으로 이행시켰다. 이때 증류수를 가하여 chlorophyll 등 견화물을 물층으로 침강시킴과 동시에 KOH를 세척시키는 조작을 여러번 행하였다. 이어 PE층을 모두 합하여 500ml로 정용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 carotenoids의 정량은 PE 중 가시부 흡수 spectrum의 λ_{max} 흡광도에 의하여 McBeth법에 따라 흡광계수 $E_{1\%}^{1cm}$ 2500으로 하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{mg\%} = \frac{\text{OD}(\lambda_{\text{max}}) \times \text{volume} \times 100}{E_{1\%}^{1cm} 2500 \times \text{weight of tissue(g)}}$$

나. 갓김치의 일반적인 항산화특성

1) 갓김치 용매추출물의 항산화성

가) 항산화 성분의 분리

건조시료 5g에 50ml의 증류수를 넣고 30분간 boiling water bath에서 3회 반복 추출하여 Whatman filter paper No.42로 여과한 후 추출물을 100ml로 정용함으로써 물 추출물을 얻었으며 갓김치의 메탄올 추출액은 Pratt 등의 방법을 이용하였다. 즉, 건조시료 5g에 50ml의 메탄올을 첨가하여 빛을 차단한 상태에서 상온에서 20시간 교반침출시켰다가 3회반복 추출하였다. 추출액은 모아서 여과시킨후 이를 회전진공농축기를 이용하여 40℃에서 농축한 후 에탄올에 적당한 농도로 희석시켰다. Hexane 추출은 건조시료 5g에 50ml의 hexane을 넣고 soxhlet추출기로 3회 반복추출한 추출물을 모아 회전진공농축기로 농축한 후 에탄올에 녹여 사용하였다.

나) 전자공여작용(electron donating ability)을 통한 항산화능 측정

각 시료 용액 0.2ml에 ethanol에 용해시킨 $4 \times 10^{-4}M$ 의 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH)용액 0.8ml을 첨가한 후 일정 시간후의 515nm에서 흡광도를 측정함으로써 전자공여능을 조사하였다.

4. 갓김치의 항산화기전 탐색 및 항산화항노화 기능성물질 연구

가. 항산화기능성 flavonoids의 분리 및 확인

동결건조시킨 15℃ 5일간 발효시킨 청갓김치, 담금당일 청갓김치 그리고 생청갓 3 종류의 시료를 수분 5% 이내로 동결건조시키고 이것을 분쇄기로 균일하게 분쇄한 후 Retort pouch에 넣고 sealing하여 -20℃이하 냉동 보관하였다. 이 시료(2.23kg)를 jar에 담아 시료의 10배정도의 100% Methanol에 4일동안 침지시킨 후 80℃에서 감압 농축하여 Methanol extract 585.09g을 얻었다. 담금당일 청갓김치(244kg)도 위와 같은 과정을 거쳐 Methanol extract 475.14g을 획득하였다. 또한 신선한 생청갓(1.6kg)을 바로 동결건조시키고 위와 같은 과정을 거쳐 Methanol extract 275.44g을 얻었다. 각 메탄올 추출물은 Hexane, Dichloromethane(CH₂Cl₂), Ethyl acetate(EtOAc), Butanol((BuOH), H₂O순으로 극성이 낮은 용매로부터 극성이 높은 용매순으로 순차적으로 분획하였다. 각 분획별 항산화효과는 DPPH법, ferric-thiocyanate method로 측정하였다.

각 분획물의 항산화성을 측정비교한 후 항산화성이 강한 EtOAc분획물을 택하여 silica gel column chromatography를 행하였다. 용출액은 Ethyl acetate, EM(Ethyl acetate : Metanol) = 30:1(vol/vol), 10:1(vol/vol), 5:1(vol/vol), 2:1(vol/vol), 1:1(vol/vol), Methanol순으로 25ml/min로 250ml beaker에 담아 농축하고 25ml Beaker에 담아 fraction 1-279까지 분획하였다. 이 분획물을 TLC plate로 전개조 (C:M(CH₂Cl₂:MeOH)=10:1)에서 분리하였고 365nm와 254nm에서 UV/vis spectra로 측정한 후 같은 유형별로 모아서 분획별 항산화성을 측정하였다.

나. 적갓 기능성 anthocyanins의 분리 및 확인

1999년 가을에 전라남도 완도군 완도읍에서 수확한 재래종 적갓을 동결건조후 분쇄하였다. 이를 0.1% TFA in 10% MeOH로 추출하여 조색소액을 얻은 후 이를 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chem. Co., Japan), sephadex LH 20, ODS (Sigma Chem. Co., USA)를 이용하여 주된 색소부를 분리한 후 KC18 TLC plate (Whatman, USA) 및 Prep-HPLC (Waters Delta prep 4000, USA)를 이용하여 색소의 분리, 정제를 행하였다(Fig.1).

얻어진 색소들은 UV-vis spectrophotometer; Shinco S-2100 (Seoul, Korea), 1H- and 13C-NMR spectrometer; Varian Unity Plus 500 (California, USA), Fast Atom Bombardment Mass Spectra (FABMS); JEOL JMS-AX-505 WA (Japan Electron and Optics Laboratory Co. Ltd., Tokyo, Japan)등을 통해 구조를 결정하였다.

다. 분리 획득의 기능성 검토

적갓에서 추출한 anthocyanins 획득의 기능성 및 생리활성을 검토하기 위해 Diaion HP-20 column chromatography를 통해 얻은 H₂O, 20%, 40%, 60% 및 100% MeOH 획득의 항산화성 및 수율을 검토한 후 주된 색소 획득인 60% 메탄올 추출물을 다시 sephadex LH-20 column chromatography하여 5개의 획득으로 모아 이들 획득의 생리

활성을 검토하였다. 기타 분리획분에 대하여도 다음과 같은 기능성을 검토하였다.

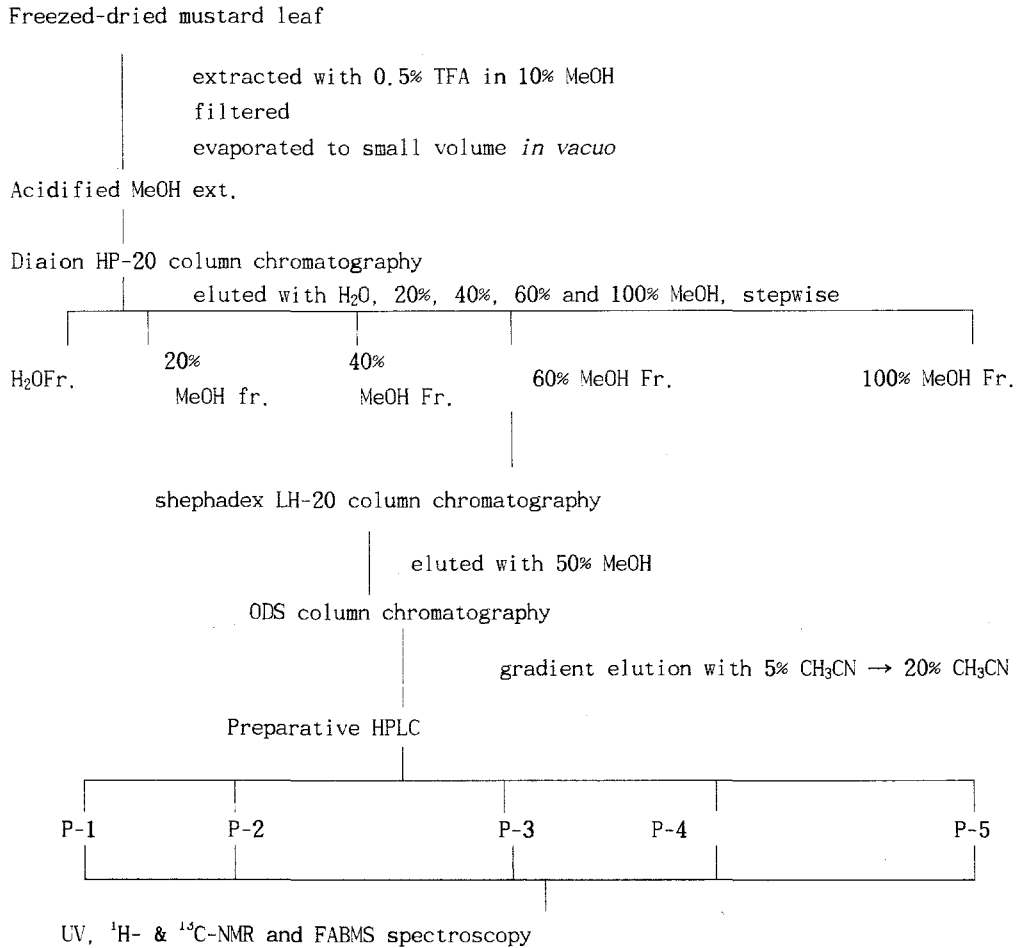


Fig.1 . Schematic procedure for isolation, purification and identification of anthocyanins from mustard leaf.

1) 전자공여작용을 통한 항산화능 측정
앞에서 설명한 DPPH법에 의해 측정하였다.

2) 아질산염 분해능 측정

아질산염은 1mM 아질산 나트륨(NaNO₂) 용액 1ml에 시료를 가하고 0.1 N HCl 과 구연산 완충액을 이용하여 반응용액의 pH를 1.2, 3.0, 4.2, 6.0으로 조절하여 10ml로 정용하였다. 이를 37℃에서 1시간 반응시킨 후 반응액 1ml과 2% acetic acid, Griess 시약 0.4ml을 반응시켜 15분 후의 흡광도를 520nm에서 측정하였으며 아질산염 분해능

은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Nitrate 분해능(\%)} = \left(1 - \frac{A-C}{B}\right) \times 100$$

- A : 1mM NaNO₂ 용액에 시료용액을 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도
B : 1mM NaNO₂ 용액의 흡광도
C : 시료 자체의 흡광도

5. 항산화항노화 기능성 김치의 개발 및 품질개선

가. 갓김치 담금법 개선 및 레시피 선정

1) 문헌조사

문헌, 조리서 및 공장 담금법에 수록된 갓김치 담금법 안내서를 중심으로 재료의 종류와 원료 배합비 및 담금 방법을 통계적으로 정리하였다. 재료의분량에 대한 목측량을 중량으로 환산할 수 있도록 재료에 대한 중량환산표(돌산갓 1단 1944g ; 무 1개 1 kg ; 마늘 1통 30g, 1 Table spoon(TS) 13g ; 생강 1톨 30g ; 고춧가루 1 Cup(C) 105g, 1 Ts 8g, 1 tea spoon(ts) 2g ; 새우젓 1 C 250g, 1 Ts 19g, 1 ts 6g ; 파 1단 500g ; 찹쌀풀 1 C 240g ; 멸치액젓 1 C 210g ; 통깨 1 C 83g, 1 Ts 14g, 1 ts 2.5g ; 설탕 1 Ts 15g, 1 ts 5g ; 굵은 소금 1 C 165g, 1 Ts 14g, 1 ts 4g ; 밤 1개 25g)를 작성하여 각 재료의 분량에 대한 주어진 중량치를 얻었다. 문헌과 조리서에서 주로 사용되는 부재료에 관하여 주재료 1000g에 대한 부재료의 상대적인 중량을 각각 환산하였으며, 사용빈도가 50%이하인 부재료는 문헌에 나타나는 대표적인 갓김치 재료 배합비 결정에서 제외하였다. 또한, 문헌 및 조리서에 명시된 담금 방법을 통합, 분석하여 문헌과 조리서에 명시된 담금 방법과 공장에서의 담금방법 중 사용빈도가 높은 담금법을 정하였다.

2) 설문조사

전라도 지방 갓김치 담금법을 조사하기 위해, 1994~1995년도 광주김치대축제 참가자들에게 설문지를 배부해서 설문응답을 얻었다.(부록 참조) 설문지 회수 후 보다 정확한 정보를 얻기 위해 응답자에게 재차 전화탐방을 하였다.

6. 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험결과를 one way ANOVA로 검사한 후 Duncan's multiple range test로 각군의 평균간의 유의성을 검정하였다. 이와 그 외 필요한 모든 통계처리는 통계 프로그램인 SAS ver 6.12를 이용하여 수행하였다.

< 부록 >

Table-

Code No. :

응답자 성명 :

전화번호 :

안녕하십니까? 본설문은 부산대학교 김치연구소에서 갓김치의 담금법을 표준화하기 위하여 마련한 것입니다. 본 연구소에서는 우리나라의 김치종류를 조사하고 김치담금법의 표준화를 이루기 위해 여러 가지로 노력하고 있습니다. 갓김치는 전라도 지방의 대표적인 김치이며 독특한 향미뿐만 아니라 건강에 유익한 여러 생리활성을 가진 것으로 밝혀지고 있어 이에 관한 많은 연구가 필요하다고 생각합니다.

그러나 아직 갓김치 담금법의 표준화가 이루어져 있지 않아 광주김치대축제에 참가하신 분들을 중심으로 전라도 갓김치의 담금법을 조사하고자 하오니 본설문에 성심껏 대답해주시기 바랍니다.

이 조사에서 얻어진 결과는 우리나라의 김치 연구에 소중한 자료로 사용될 것이며 연구목적에만 사용될 것이오니 아시는대로 성심껏 응답해주시면 대단히 감사하겠습니다.

바쁘시겠지만 가급적 빠른 회송(3월 5일)을 바랍니다. 의문사항이 있으시면 아래로 문의바랍니다.

부산대학교 김치연구소 연구원 현윤애 전화번호: 051-510-2768

1. 갓김치를 담글 때 사용하는 갓의 종류는 어떤 것입니까?

- ① 청갓 ② 적갓

2. 갓의 절이기는 다음 중 어떤 방법을 사용하십니까?

- ① 절이지 않는다 ② 소금을 뿌려둔다 ③ 소금물에 담근다
④ 젖갈에 절인다 ⑤ 기타()

3. 2에서 ②소금을 뿌려둔다고 답한 사람의 경우 소금의 양은 갓1단(g)에 대해 어느 정도이며 절이는 시간은 어느 정도입니까?

소금의 양: ()g 또는 ()용큼, ()국자 등

절이는 시간: ()분

4. 2에서 ③소금물에 담근다고 답한 사람의 경우 소금물의 농도는 갓1단(g) 에 대해 대략 어느정도이며 이때의 절이는 시간은 어느정도입니까?

소금물의 농도: 물의 양 () 리터 또는 눈대중단위 ()

소금의 량: ()g 또는 ()용푼, ()국자 등

소금물의 량: () 리터 또는 눈대중단위 ()

절이는 시간: ()분

4. 2에서 ④젓갈에 절인다고 답한 사람의 경우 사용하는 젓갈의 종류는 무엇입니까? 젓갈의 량은 갓1단(g)에 대해 대략 어느정도이며 이때의 절이는 시간은 어느정도입니까?

사용하는 젓갈의 종류는 무엇입니까?

① 멸치젓 ② 멸치액젓 ③ 새우젓 ④ 까나리젓 ⑤ 기타()

젓갈의 량: ()ml 또는 ()국자 등

절이는 시간: ()분

5. 절인 후 씻는 횟수 및 물빼기의 적당한 시간을 적어주십시오.

씻는 횟수: ()회

물빼는 시간: ()분 또는 ()시간

6. 갓김치는 어떻게 발효숙성시킵니까?

① 실온에서 ② 익힌 후 냉장보관 ③ 바로 냉장보관 ④ 땅에 묻어둠

⑤ 기타()

7. 갓김치는 언제 먹는 것이 가장 맛있습니까?

① 담금직후 ② 담금 1주일 후 ③ 담금 1달 후 ④ 담금 3개월 후

⑤ 기타()

8. 맛있는 갓김치를 담기위해 좋은 청갓을 고르는 요령이 있으면 적어주십시오.

9. 맛있는 갓김치를 담기위한 조언이 있으면 적어주십시오.

10. 갓1단(무게 g)으로 갓김치를 담글 때 첨가하는 모든 부재료들의 종류 와 함량을 적어주십시오. g단위로 정확히 표기해주시면 가장 좋으나 눈대중치도 상관없습니다 (예: 고춧가루 1근, 마늘 1통, 젓갈 1국자 등).

담금방법을 순서대로(①, ② 등으로) 상세히 적어주십시오.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 항산화성 갖김치의 설정 및 항산화성

김치의 기능적 특성 중 항산화성 항노화 특성이 있으며 이들 특성을 증대시키는 항산화성 물질이 있음이 알려지고 있다. 그리고 이러한 항산화성물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되고 있다. 본 연구에서는 지금까지 알려진 이 분야의 연구결과를 바탕으로 하여 바람직한 갖김치모델을 선정하고 모델갖김치의 항산화성을 규명하였다.

갖김치의 항산화성을 다른 김치와 비교하기 위하여 가열우육지방질(CGM)의 모델시스템에 갖김치 등을 일정수준으로 첨가하여 4℃에서 5주간 반응시키면서 TBA가를 측정한 결과는 갖김치(MLK)는 배추김치(CK)나 무김치(RK)보다 지속적으로 항산화성이 높은 것으로 나타났다. 그리고 배추김치는 무김치보다는 높았다. 이러한 사실은 기타재료가 동일한 레시피를 이용하였으므로 김치에 사용된 주재료의 영향이라고 판단되어 갖김치의 항산화성에 대한 연구를 다양하게 실시하였다.

가. 가열우육 지방질의 산화에 대한 갖김치의 항산화성

갖김치의 가열우육 지방질에 대한 항산화작용을 살펴보기 위해 CGM, CGM-W, CGM-B, CGM-MLK의 네 model system을 만들어 4℃에서 5주간 저장하면서 저장기간별 항산화성을 TBA가의 변화와 과산화물가의 변화를 살펴보았을 때 우육과 갖김치를 조합한 CGM-MLK의 TBA가는 저장기간 중 크게 증가하지 않았으나 CGM, CGM-W, CGM-B들은 저장기간 중 계속 산화가 진행되어 5주 경과 후에는 12이상의 TBA가를 나타내었다(Table 4).

Table 4. Changes of peroxide values in model systems of cooked ground meat(CGM) and water(W), brine solution(B), mustard leaf kimchi(MLK) after 5 weeks storage at 4℃

Model system	Peroxide value (meq / kg)	
	Initial	Final
CGM	3.4±1.2	71.3±4.1
CGM-W	3.8±0.8	69.1±3.8
CGM-B	3.5±0.7	70.4±2.4
CGM-K	3.9±1.1	7.3±2.9

*mean ±SD

저장 첫날의 과산화물가는 3.0~4.0의 값을 보였으나 4℃에서 5주간 저장한 후에는 산화가 진행되어 CGM-MLK를 제외하고는 모두 높은 값을 나타내었다. 갖김치를 첨가한 우육의 TBA가 및 과산화물가의 값이 다른 군에 비해서 크게 낮은 것은 갖김치에 함유되어 있는 산화 안정성과 관련된 chlorophylls, carotenoids, ascorbic acid 및

phenol계 화합물이 우육 지방질의 산화를 억제했다고 여겨진다.

나. 가열우육에 대한 발효기간이 다른 갓김치의 첨가농도별 항산화성

발효기간이 다른 김치의 농도를 달리하여 가열우육에 첨가했을때 갓김치의 가열우육에 대한 항산화 효과를 관찰하기 위해 4℃에서 5주간 저장하면서 TBA가를 측정한다. 김치의 첨가 농도가 높을수록 항산화 효과가 높음을 볼 수 있다. 갓김치의 경우 첨가 농도가 높을수록 항산화 작용이 증가하는 것은 전통 발효 식품인 김치가 항산화성을 나타내는 기능성 식품으로서의 의의가 있다고 여겨진다.

다. 갓김치에서 chlorophylls와 carotenoids(CCC) 분획의 항산화성

갓김치의 chlorophylls와 carotenoids가 지방질의 자동산화에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 발효기간별로 갓김치의 crude chlorophylls와 carotenoids(CCC)분획을 0.02%의 농도로 linoleic acid에 첨가하여 암소에서 30℃로 유지된 항온기에 저장하면서 4일 간격으로 과산화물가와 conjugated dienoic acid 함량을 측정하였다. 발효기간에 따른 갓김치의 CCC분획의 항산화성은 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 발효초기의 김치가 말기보다 항산화성이 미미하나마 약간 높았는데 이는 chlorophylls와 carotenoids의 함량에 기인된다고 여겨진다. 갓김치의 CCC분획과 다른 항산화제의 항산화성을 비교한 결과 갓김치의 CCC분획은 BHA에는 못 미치나 α -tocopherol보다 높은 항산화 활성을 나타내었다. 그러나 광선의 조사는 지방질의 산화를 촉진시킨다고 알려져 있으며 CCC분획이 광선의 조사하에서 지방질의 산화에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 1500Lux의 빛의 강도를 나타내는 백열등이 부착된 30℃ 항온기에 CCC분획을 0.02% 농도가 되도록 linoleic acid에 첨가하여 5일 동안 저장하면서 24시간마다 과산화물가와 conjugated dienoic acid 함량변화를 측정하였다. 그 결과 광선조사하에서는 갓김치의 CCC분획이 지방질의 산화를 촉진시키는 것을 볼 수 있었다.

라. 생체모델에서의 항산화 활성

Rat liver homogenate에 산화촉진제인 FeSO₄ 및 ascorbic acid를 첨가하여 지질의 과산화반응을 촉진시킨 후 여기에 갓김치의 CCC분획을 첨가하여 생체 온도인 37℃에서 50분 동안 반응시켰을 때 TBA가의 변화를 살펴보았다. 지방질의 자동산화에 대한 실험에서는 갓김치의 CCC분획이 α -tocopherol보다 항산화성이 높았으나 생체단위인 rat liver homogenate에서는 α -tocopherol보다 TBA가가 높게 나타났다. 갓김치의 주재료인 갓과 부재료인 고추가루의 CCC분획에 대해서 실험하였다. 그 결과 높은 함량의 chlorophylls와 carotenoids를 함유하는 갓의 CCC분획은 α -tocopherol과 거의 비슷한 수준으로 rat liver homogenate의 과산화를 억제하여 낮은 TBA가를 나타내었으

나 carotenoids만을 함유하는 고추가루는 갖의 항산화성과는 큰 차이를 나타내어 높은 TBA가를 나타내었다. 그리고 egg phosphatidyl choline(EPC)으로 EPC liposome을 만들어 갖김치의 CCC분획이 Fe^{2+} 와 H_2O_2 를 가하여 인위적으로 산화시킨 인지질 liposome자체의 산화에 미치는 영향을 살펴보았다. Klein에 의한 산화지수(oxidation index)는 지질 고유 흡수대인 215nm에서의 흡광도에 대한 conjugated diene, hydroperoxide 및 peroxide등의 과산화지질 흡수대인 233nm의 흡광도 비(Abs. 233nm/Abs. 215nm)를 나타낸 것으로써, 5일 동안 반응시킨 후 EPC liposome은 0.87, 갖김치 CCC분획을 첨가한 EPC liposome은 0.5~0.6의 산화지수를 나타내어 신 등에 의해 보고된 α -tocopherol의 경우와 비슷한 항산화 효과를 나타내었다.

마. 유효 성분의 항산화 작용

앞의 실험에서 갖김치 CCC분획의 지방질 자동산화에 대한 항산화성을 연구하였는데 갖김치 담금직후, 발효적기 및 후기의 CCC분획의 주성분인 chlorophyll(CHL) a 와 b, pheophytin(PHY) a 와 b, β -carotene이 지방질의 자동산화에 각각 어떤 양상으로 영향을 미치는가를 알아보기 위해서 0.01%의 농도로 linoleic acid에 첨가하여 암소에서 30℃로 유지된 항온기에 저장하면서 4일 간격으로 과산화물가와 conjugated dienoic acid함량을 측정하였다. CHL a는 폐놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)와 항산화 효력이 비슷하였으며 CHL a,b, PHY a,b, β -carotene의 순으로 항산화성이 높았다.

또한 CHL, PHY 및 β -carotene의 수소 공여성을 분석하였다. CHL a가 다른 것보다 수소 공여성이 높았는데 CHL의 기본적인 항산화 효과는 porphyrin구조에 의한 것이며 CHL은 암소의 조건하에서 DPPH같은 유리기를 감소시키는 hydrogen donor로 작용한다고 알려져 있고 PHY의 항산화 기전은 CHL과 비슷할 것으로 여겨지고 있다. 그리고 철(ferric chloride)을 사용하여 linoleic acid mixture에 CHL, PHY 및 β -carotene을 첨가하여 그 저해 작용을 관찰하였다. CHL a가 가장 강한 금속 봉쇄 작용을 나타내고 있으며 금속이 함유된 linoleic acid mixture에 chlorophyll 유도체를 첨가하였을 때 금속으로 산화가 촉진된 지질용액의 산화를 강하게 저해시키는 것을 볼 수 있었다.

유효성분의 rat liver homogenate 산화에 대한 CHL a의 영향을 살펴보았을 때도 CHL a는 BHA와 유사한 수준으로 강한 항산화 효과를 보였다. CHL a, CHL b, PHY a와 b, β -carotene 및 다른 항산화제들의 항산화 효과를 TBA가 변화를 측정하였을 때 CHL a의 항산화효과가 가장 높았다.

또한 생체막의 복잡한 구조와 특이성 때문에 생체막을 직접 이용하기 어려우므로 EPC liposome을 만들어 CHL a가 liposome 산화에 미치는 영향을 알아보았다. CHL a의 농도가 증가할수록 항산화 효과가 높았으며 0.02%의 농도에서는 BHA보다 더 높았

다. CHL a와 b, PHY a와 b 및 β -carotene 각각의 산화지수를 측정하여 항산화 효과를 비교한 결과 다른 system에서와 마찬가지로 CHL a, CHL b, PHY a, PHY b, β -carotene의 순으로 항산화효과가 높았다.

또한 갓김치에서 분리한 CHL a는 노화의 원인물질 중에 하나인 superoxide anion radical에 대해서도 높은 소거 활성을 나타내었다(Table5). xanthine oxidase(XOX)는 생체내 퓨린 대사에 관여하는 효소로서 xanthine과 XOX반응의 생성물인 uric acid는 통풍의 원인이 되기도 하는데 Table 6의 결과와 같이 CHL a가 XOX에 대한 저해 활성이 높았다.

이상의 결과에서 CHL a가 노화의 원인이 되고 있는 유리 라디칼의 생성 억제에 높은 활성을 나타내고 있으므로 CHL a의 생리적, 영양학적 연구가 이루어진다면 항산화제 뿐 아니라 훌륭한 항노화성 물질로서도 작용하리라고 여겨진다.

Table 5. Superoxide radical scavenging activities of chlorophyll a and pheophytin a in xanthine/xanthine oxidase-superoxide radical generating system

	Unit(U/mg)*	IC50(μ g)**
Chlorophyll a	2 0 4 8 . 0 1 6	4.032
Pheophytin a	1 1 1 . 9 9 5	8.929
BHA	215.983	4.630
α -tocopherol	87.997	11.364

* Calculated by SOD unit

** Inhibition of 50% cytochrome C reduction

Table 6. Comparison of xanthine oxidase inhibition rate(%) of chlorophyll a and pheophytin a and pheophytin b fraction obtained from mustard leaf*

Chlorophyll a	67.4
Pheophytin a	64.8
BHA	71.7
α -tocopherol	63.1

* Inhibition rate(%) of uric acid production was determined with 10 μ g of each extraction

2. 갓김치의 항산화특성

가. 갓김치에 함유된 항산화물질의 분석

1) Ascorbic acid 및 총 phenol함량

갓김치 발효기간에 따른 ascorbic acid 및 총 phenol함량을 Table 7에 나타내었다.

발효초기와 적기에서의 ascorbic acid의 함량은 거의 일정하게 유지되었으나 발효 7일 이후로 그 함량이 감소되어 발효말기에는 초기 함량의 50%까지 감소되었다. 김치는 특히 ascorbic acid의 좋은 급원으로 알려져 있으며 이 등(2)의 보고에 의하면 ascorbic acid는 숙성 적기에 그 함량이 증가한다고 하였는데 본 실험에 사용한 갓김치는 발효적기에 그 함량이 증가하지 않아 상이한 결과를 나타내었다.

한편, 발효기간에 따른 갓김치의 총 phenol함량은 발효가 진행됨에 따라 증가하여 7일간 발효한 김치의 총 phenol함량이 가장 높았다. 십자화과 채소의 신선한 잎에는 *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid같은 hydrobenzoic acid와 hydroxycinnamic acid인 *p*-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic acid의 cis와 trans의 isomers 등이 함유되어 있는 것으로 알려지고 있다.

Table 7. Changes of contents of ascorbic acid and total phenolic compounds in mustard leaf kimchi during fermentation at 15°C

Fermentation time(day)	Ascorbic acid(mg/100g)	Total phenol(mg/100g)
0	19.2±0.25*	36.3±0.18*
2	18.6±0.21	38.5±0.24
4	18.5±0.44	39.9±0.21
7	18.5±0.25	42.5±0.31
10	16.2±0.25	41.4±0.20
15	14.6±0.42	41.8±0.19
20	12.4±0.25	40.1±0.25
25	10.4±0.41	40.3±0.37

*Mean ± SD

2) Total chlorophylls와 total carotenoids

갓김치 발효기간 동안 total chlorophylls는 큰 변화가 없이 거의 일정하게 유지되었으나 carotenoids는 발효 초기부터 계속적으로 감소하여 발효 말기인 25일째는 초기 함량의 43.7%로 감소되었다(Table 8). 이는 김치에서 발효가 진행됨에 따라 pH의 변화에 의해 감소되는 것으로 추정된다. 지금까지 알려진 것을 보면 갓김치 숙성 중 chlorophyll의 분해가 일어나면서 total chlorophyll, chlorophyll a 및 b의 감소율이 현저하였다고 하며 chlorophylls이 chlorophyll derivatives로 전환되는 까닭이라고 하였다.

나. 갓김치의 일반적인 항산화특성

1) 갓김치 용매 추출물의 항산화성

청갯김치를 물과 75% 메탄올, 헥산으로 각각 추출하여 각 추출물의 항산화효과를 살펴보았다. 숙성시키지 않은 0일의 청갯김치와 발효가 진행되어 가장 맛이 좋은 4일 경의 청갯김치 추출물의 항산화 실험 결과는 숙성을 시킨 4일째의 청갯김치 추출물의

Table 8. Changes of total chlorophylls and total carotenoids of mustard leaf kimchi during fermentation an 15°C

Fermentation time(day)	Total chlorophylls(mg %)	Total carotenoids (mg %)
0	77.0(100)*	55.1(100)*
2	76.7(99.6)	49.6(89.8)
4	76.0(98.7)	43.6(79.1)
7	75.9(98.6)	37.0(67.2)
10	76.8(99.7)	31.7(57.5)
15	76.0(98.2)	29.9(54.3)
20	76.4(99.2)	26.8(48.6)
25	76.0(98.7)	24.1(43.7)

*Pigment values expressed as % of total pigments

항산화성이 높게 나타났다. 또한 첨가 농도별로 항산화성을 조사한 결과 물 추출물과 75% 메탄올 추출물의 경우 발효 기간에 관계없이 첨가 농도가 높을수록 항산화 효과가 높은 것으로 나타났다. 4일간 발효한 김치의 75% 메탄올 추출물에서 항산화성을 분리하기 위해 계통적으로 용매분획하고 각 분획층을 0.05% 농도로 하여 항산화성을 살펴보았다. 탈지한 후의 75% 메탄올 추출물의 0.05%와 0.1%의 비교에서는 농도가 높을수록 효과가 있다는 것을 알수는 있으나 control과 비교 했을 때 0.1%만이 효과가 있다고 볼 수가 있다. 그에 비해 용매별 분획물의 경우는 탈지 전의 헥산층과 석유 에테르층, 에틸 에테르층이 굉장히 좋은 것으로 나타났고 그 중 에틸 에테르층은 BHA보다 효과가 좋은 것으로 나타났다.(Fig.2) 그리고 DPPH 실험결과에서도 여전히 에틸 에테르층이 가장 좋은 효과를 보였다. 용매 분획층에서 항산화효과가 높게 나타난 에틸 에테르층을 계속해서 silica gel column chromatography에 대한 메탄올의 비율을 달리 해서 1%(Fr. 1), 5%(Fr. 2), 10%(Fr. 3), 50%(Fr. 4) 분획층을 얻었고 이 분획층에 대해 ferric thiocyanate method를 이용하여 항산화성을 측정된 결과 Fig. 12와 같이 Fr. 1이 가장 항산화성이 높았고 Fr. 4가 가장 낮았다. 일정 농도별로 희석하여 측정된 결과도 농도가 높을수록 그 효과가 높다는 것을 알 수가 있다. Fr. 1과 Fr. 2는 0.02% 토코페놀보다 높은 항산화성을 0.01%에서도 나타내었고 0.02% BHA와는 유사한 항산화성을 보여주었다. 이에 관련된 결과는 뒤에 다시 고찰되는 항산

화성 및 항산화물질란에서 자세히 살펴볼 것이다.

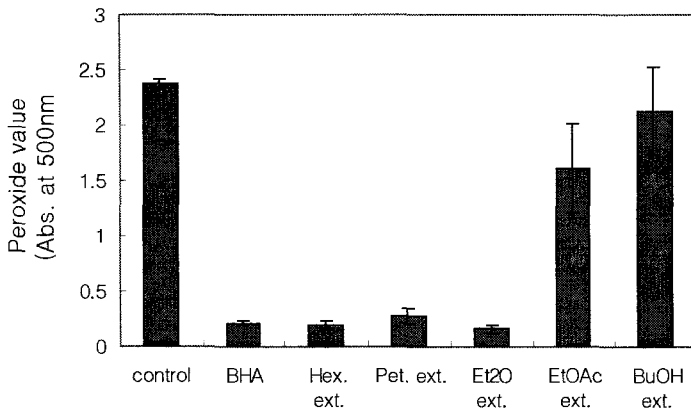


Fig 2. Antioxidative activity of the various fractions by silica gel column chromatography from ethyl ether extract of 75% methods extract from 4 day-fermented-mustard leaf kimchi on the autoxidation of linoleic acid mixture at 37°C after 4 days.

2) 가열우육 모델시스템에서의 항산화특성

갓김치의 첨가 농도를 달리하여 가열쇠고기와의 model system을 조합하여 항산화성을 살펴본 결과, 김치를 5g 첨가했을 때보다 10g을 첨가했을 때 보다 강한 항산화성이 나타났으며 이로써 김치의 섭취는 항산화물의 섭취로서도 좋은 방법이라고 생각된다. 또한 생시료보다는 김치의 형태일 때, 담금직후보다는 숙성된 김치의 model system에서 TBA가 보다 낮게 나타났다(Fig. 3).

한편, 갓의 종류와 발효기간을 달리한 김치의 항산화작용을 조사한 결과 가열쇠고기를 이용하여 조제한 model system에서 4일간 발효, 숙성된 들산갓김치의 항산화성은 적갓시료의 항산화성과 유사한 수준인 것으로 나타났으며 적갓의 model system끼리 비교하였을 때 생시료보다는 갓김치의 항산화성이 높았고 6일간 발효시켜 숙성된 갓김치의 항산화성이 가장 높게 나타났다. 이는 본 김치의 추출용매를 달리하여 관찰한 항산화성에서 나타난 결과와도 일치하였다.

3) Rat liver homogenate 및 EPC liposome에 대한 항산화성

갓김치의 rat liver homogenate 산화에 대한 갓김치 구성성분의 영향을 살펴보았다. chlorophyll a는 BHA와 유사한 수준으로 강한 항산화 효과를 보였다. chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin a 와 b, β -carotene 및 다른 항산화제들

의 항산화 효과를 TBA가 변화를 측정하여 비교한 결과는 chlorophyll a의 항산화효과가 가장 높았으며 EPC liposome을 만들어 chlorophyll a가 liposome산화에 미치는 영향을 알아보았을 때 chlorophyll a의 농도가 증가할수록 항산화 효과가 높았으며 0.02%의 농도에서는 BHA보다 더 높았다.

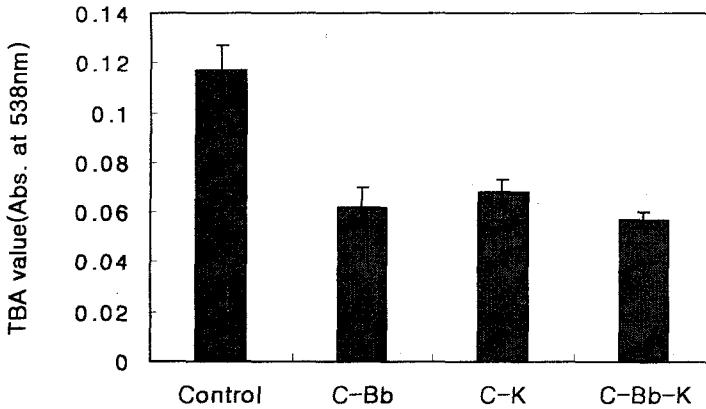


Fig. 3. Changes of TBA values in model systems of CGM(cooked ground meat) and others during storage at 4°C for 4 weeks. C: CGM + MLK-G, Bb: bonnet bellflower, K: kelp

3. 갯김치의 항산화성과 항산화물질

가. 적갯김치의 발효특성 및 천연 항산화물질 분석

앞에서의 실험결과 갯김치의 재료에 따라 항산화성이 달라졌으므로 주재료를 달린 한 갯김치를 조제하여 각각의 항산화특성을 살펴보기로 하였으며 모델적갯김치를 제조하여 그 발효특성과 항산화작용을 살펴보았다.

1) 모델 적갯김치의 발효특성

모델적갯김치의 경우 발효가 진행될수록 pH는 감소하였고 산도는 점점 증가하여 발효 6일째 되었을 때 pH 4.5, 산도 0.7%에 도달하였다. 적갯김치의 발효과정중 환원당의 함량변화는 발효초기 2.36%에서 발효 6일째에 1.00%로 감소하였다. 김치발효 중 젖산균수의 변화는 발효기간이 길어질수록 젖산균수가 증가하여 6일째에 최고치인 109cfu/ml를 보였다. 적갯김치의 총 phenol 함량은 발효 6일 갯김치(70mg%) > 담금 직후 갯김치(59mg%) > 생시료(49mg%) 순으로 발효가 진행됨에 따라 증가하였다.

총 vitamin C 함량은 Table 9에 나타난 바와 같이 생갯의 총 vitamin C 함량은 65 mg%였고, 발효직후 52mg%가 되었다가 점차 감소하였으나 숙성하면서 다시 어느정도

증가하였다. 담금직후는 절단이나 염절입 등의 전처리에 의해 함량이 다소 감소하였다. 항산화성 모델김치의 항산화성 성분으로 기대되는 biphenolic compounds 및 ascorbic acid가 다량(70mg% 및 50mg%내외) 함유되어 있음이 확인되었다.

Table 9. Changes of ascorbic acid content during the fermentation of mustard leaf kimchi (MLK, red) at 15°C

Fermentation time(day)	Total vitamin C(mg%)
Mustard leaf	65±0.41*
MLK-0	52±0.21
MLK-2	49.5±0.34
MLK-4	42±0.45
MLK-6	49±0.24

* Mean±SD

2) 모델 적갓김치의 항산화활성

갓김치중에서 주재료별로 보았을 때 특히 항산화성이 우수하였던 적갓으로 제조한 모델김치의 항산화활성을 TBA 가, POV가, free radical level 측정 등의 방법을 이용하여 다각도에서 살펴보았다.

Model system에서 TBA가를 살펴본 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5와 같았다. 발효 6일 갓김치 > 발효 0일 김치 > 적갓원료 > 발효4일 청갓김치 순으로 항산화성이 우수하였으며 가열최고기 model system에 이들 갓김치 및 갓을 첨가한 양이 많을수록 항산화성이 증가하였다.

적갓김치에서 용매를 달리하여 추출물을 얻은 후 linoleic acid system을 이용하여 항산화특성을 살펴볼 때 물 추출물과 methanol 추출물의 경우 추출물의 첨가농도가 증가할수록 POV가 역시 감소하여 과산화물 억제효과가 강하게 나타난 것을 볼 수 있다. Fig. 5.에서 methanol 추출물의 항산화성을 발효기간별로 비교하였을 때 알 수 있듯이 담금직후의 갓김치보다는 발효 6일째의 갓김치 추출물이 보다 강한 항산화성을 나타내었다. 그러나 발효 0일의 적갓김치추출물은 발효6일째의 추출물에 비해 그 경향이 현저하지 않았다.

3) 적갓김치 CAP(crude anthocyanin pigments)의 항산화특성

가) 적갓김치의 획분별 항산화성

천연에 존재하는 많은 색소가 항산화성을 지니는 것으로 알려져 왔으며 적갓에 풍부하게 함유된 flavonoid계 색소인 anthocyanin 역시 항산화성을 가질 것으로 예상되

어 수소공여능, 생체내 산화효소계에 대한 저해활성 분석, column chromatography에 의해 분획후 항산화성의 측정 비교 등의 방법을 통해 crude anthocyanin pigments의 항산화활성을 알아보았다. 적갯김치의 메탄을 추출물은 비교적 강한 항산화 효과를 지니고 있었으며 첨가농도가 높은 경우 항산화효과는 더욱 현저하였다(Fig. 6).

Linoleic acid system에서 적갯김치 column chromatography의 분획추출물별 항산화성을 살펴본 결과는 적갯의 anthocyanin 획분이라고 추측되는 0.1% TFA-70% MeOH분획에서 가장 강한 항산화효과가 나타났다(Fig. 7). 또한 첨가농도가 증가할수록 항산화성 역시 증가하였으며 이러한 경향은 유색미나 포도에서 추출한 anthocyanins의 항산화성을 관찰한 다른 실험에서 나타난 바와 일치하였다.

분획별 추출물의 수소공여성을 DPPH를 이용하여 관찰하였을 때 CAP획분에서 α -tocopherol 보다는 약하지만 가장 강한 수소공여능을 가지는 것으로 나타났다.

나) CAP(crude anthocyanin pigments)의 항산화성

CAP획분에서 DPPH법에 의해 첨가 농도에 따른 항산화성을 관찰하였을 때 두 획분 추출물의 첨가 농도가 증가할수록 수소공여능도 증가하였다(Fig. 8). 금속이온에 대한 CAP의 저해능을 살펴본 결과는 같은 농도일 때 α -tocopherol과 약간 낮은 정도로 금속이온의 산화촉진작용에 대한 저해도를 나타내었으며 CAP의 농도가 증가할수록 저해능 역시 증가하였다. α -Tocopherol 또는 CAP 단독으로 첨가하였을 때 보다는 함께 첨가하였을 때 우수한 항산화력을 나타내었으며 ascorbic acid에 대해서도 마찬가지로의 결과를 얻을 수 있었다. 특히, Ascorbic acid를 CAP와 병용하였을 때의 효과가 현저하게 나타났다. 이는 α -tocopherol과 ascorbic acid, CAP 등의 항산화 성분이 작용하는 항산화기전이 서로 다르기 때문에 나타난 결과라고 생각된다.

적갯김치에서 추출한 CAP는 phenolic compounds로서 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid 같은 불포화 지방산의 산화 및 식품의 변패에 깊이 관련되어 있는 lipoxygenase 활성화에 대한 저해작용을 할 것으로 예상되어 살펴본 결과는 Fig. 9와 같았다. CAP 역시 lipoxygenase-1-dependent linoleic acid peroxidation에 대하여 뚜렷한 저해효과를 나타내었으며 CAP의 농도가 증가할수록 lipoxygenase에 대한 저해효과도 증가하였다.

CAP가 다른 식물중의 anthocyanins과 마찬가지로 체내 superoxide anion radical에 대해 scavenging activity를 가지고 있을 것으로 생각되어 이에 관련된 실험을 한 결과 Fig. 10 과 같았다. CAP는 superoxide anion radical에 대해 높은 소거 활성을 나타내었으며 같은 농도의 α -tocopherol과 비슷한 정도의 저해효과를 보였으며 이때 IC50 값은 82 μ g이었다. CAP는 생체내 퓨린 대사에 관여하여 uric acid를 생산함으로써 통풍을 일으키며 xanthine, hypoxanthine기질과 반응시 free radical을 형성하는 것으로 알려진 xanthine oxidase에 대해서도 활성저해능을 나타내었다.

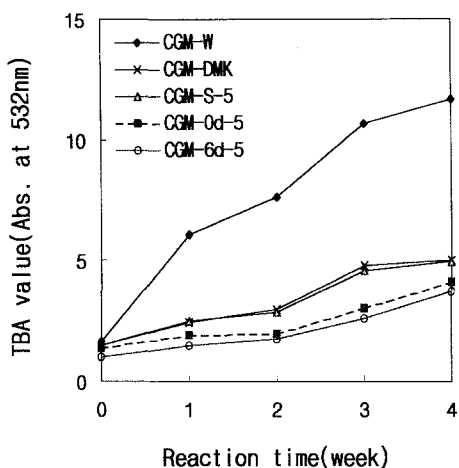


Fig. 4. Changes of TBA values of model systems of ground cooked meat(GCM) and others during the storage at 4°C for 4 weeks. W: distilled water, DMK: Dolsan mustard leaf kimchi, S: ed mustard leaf, 0d-5: 0 day of fermentation red mustard leaf kimchi 5g, 6d-5: 6 day of fermentation red mustard leaf kimchi 5g

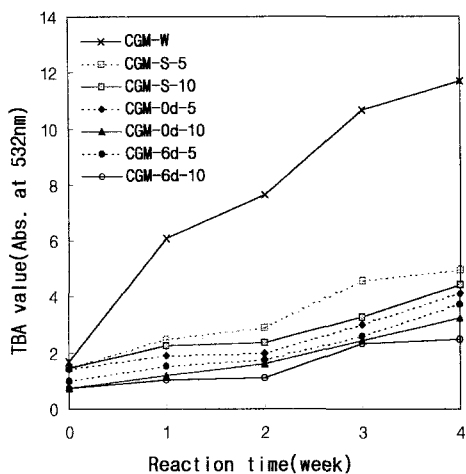


Fig. 5. Changes of TBA values of model systems with different level of mustard leaf kimchi during the storage at 4°C for 4 weeks. 0d: 0 day of fermentation red mustard leaf kimchi 5g, 10g , 6d: 6 day of fermentation red mustard leaf kimchi 5g ,10g

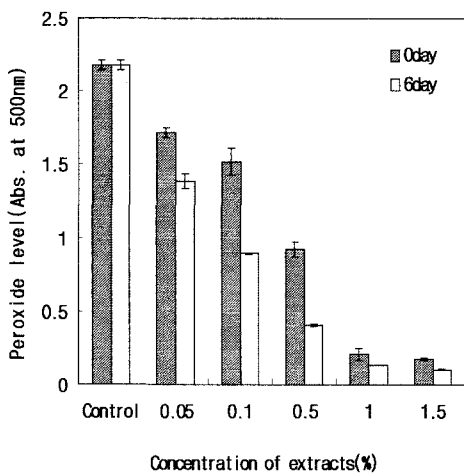


Fig. 6. Changes in peroxide level of linoleic acid with the addition of methanol solvent extracts of red mustard leaf kimchi on linoeic acid system at 3 8°C after 4 days.

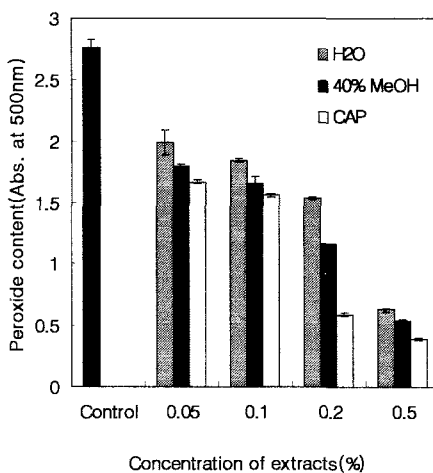


Fig. 7. Changes in peroxide contents of linoleic acid with the addition of fractioned solvent extracts of mustard leaf kimchi(6 days of fermentation) on linoeic acid autoxiadation system at 3 8°C after 4 days.

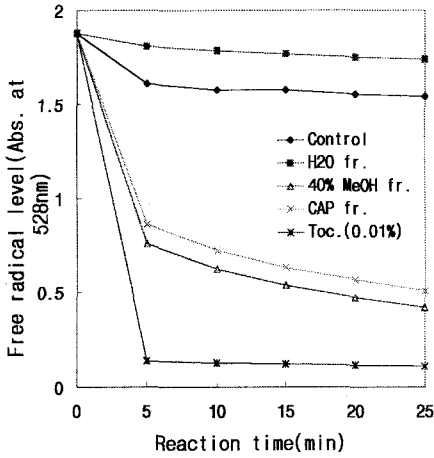


Fig. 8. Changes in the free radical level of DPPH of fractionated solvent extracts of mustard leaf kimchi(6 day of fermentation). The free radical level were determined by the DPPH method

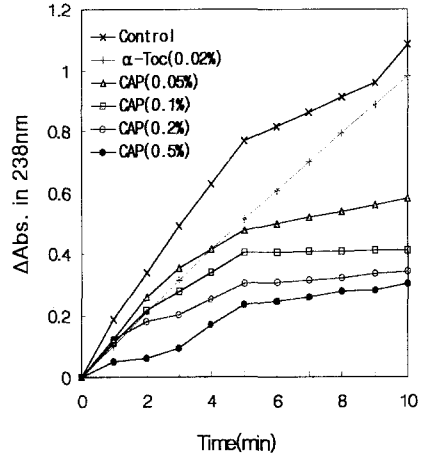


Fig. 9. Effect of CAP on lipoxygenase activity for linoleic acid oxidation. Lipoxygenase inhibition was determined by an increase in the concentration of conjugated dienoic acid.

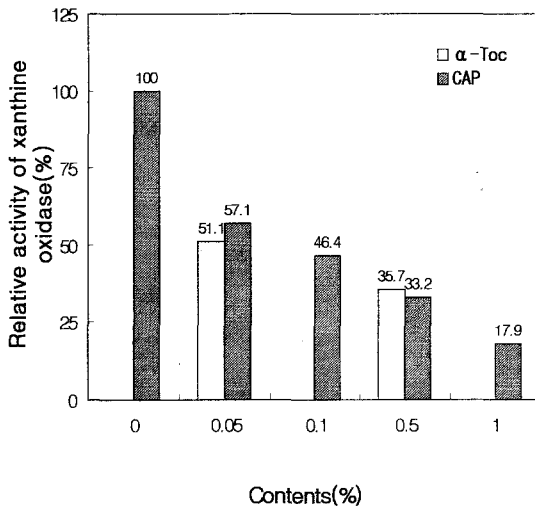


Fig. 10. Inhibitory effects on xanthine oxidase of CAP from mustard leaf kimchi, (6 day of fermentation).

나. 청갓 김치의 발효특성 및 항산화물질 특성

1) 추출용매별 분획물의 항산화 특성

청갓모델김치의 발효에 따른 총 phenol 함량과 생갓 자체의 총 phenol 함량은 Fig. 11에 나타내었다. 발효에 따른 청갓김치의 총 phenol 함량은 생갓, 0 day 발효, 4 day 발효청갓김치들을 서로 비교한 결과 4일간 발효한 갓김치의 총 phenol 함량이 가장 높았다.

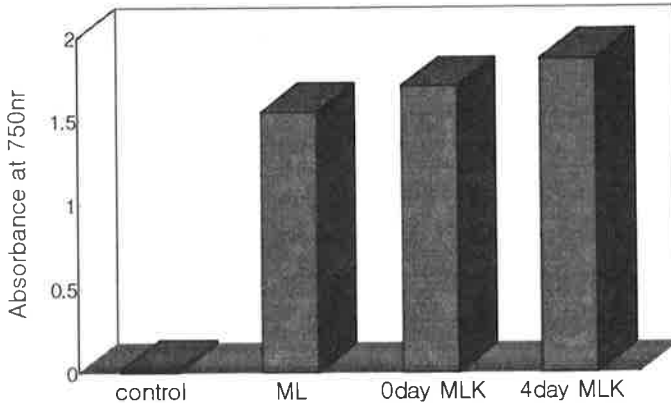


Fig. 11. Total phenolic contents of the different mustard leaf kimchi(MLK)

2) Silica gel chromatography에 의한 항산화성 물질 분리 및 분리물질의 항산화성

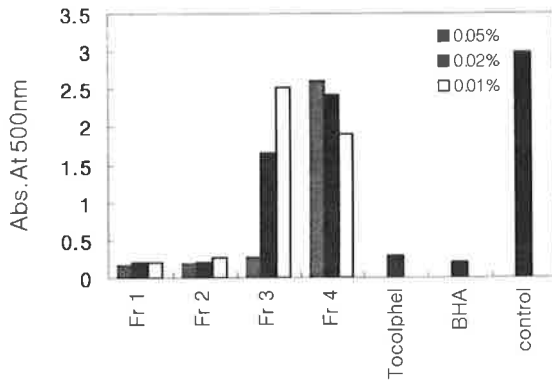


Fig. 12. Antioxidative activity of the various fractions separated by silica gel column chromatography from ethyl ether fraction of 75% methanol extract from 4 day-fermented-mustard leaf *kimchi* on the autoxidation of linoleic acid mixture at 37°C for 4 days.

청갓김치에서 각 용매의 극성별로 분획추출하여 항산화성을 살펴본 후 매 분획층에서 항산화효과가 높게 나타난 에틸에테르층을 계속해서 silica gel column

chromatography에 대한 methanol의 비율을 달리해서 1%(Fr. 1), 5%(Fr. 2), 10%(Fr. 3), 50%(Fr. 4) 분획층을 얻었고 이 분획층에 대해 ferric thiocyanate method를 이용하여 항산화성을 측정된 결과 Fig.12과 같이 Fr. 1이 가장 항산화성이 높았고 Fr. 4가 가장 낮았다. 또한 분획들을 일정 농도별로 희석하여 측정된 결과도 농도가 높을수록 그 효과가 높았으며 Fr. 1과 Fr. 2는 0.02% 토코페놀보다 높은 항산화성을 0.01%에서도 나타냈었고 0.02% BHA와는 유사한 항산화성을 보여 주었다. 역시 DPPH 법을 이용한 수소공여성 실험에서도 앞의 결과를 다시 한번 더 확인 할 수 있으며, 시간의 경과별이나 농도별의 영향도 명확하게 나타났다. 5분이 경과한 후에는 뚜렷하게 차이를 입을 수가 있는데 Fr. 1의 0.05%는 0.02%의 토코페놀과 아주 비슷하게 감소하였다.

다. 항산화기능성 flavonoids의 분리 및 확인

1) 생청갓의 EtOAc획분의 분리정제 및 구조결정

생청갓의 항산화 효과를 살펴보고 항산화물질을 동정하기 위해 생청갓의 각 획분을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 측정된 결과 L-ascorbic acid의 IC₅₀($\mu\text{g}/\text{ml}$)는 < 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고 생청갓의 메탄올 추출물은 IC₅₀ >120으로 항산화효과가 다소 미미하였으나 분획별로 살펴보았을 때 IC₅₀은 EtOAc fr.은 35.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CH₂Cl₂ fr.은 45.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hexane fr.은 99.73 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n-BuOH fr.은 116.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, H₂O fr.은 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 EtOAc fr. > CH₂Cl₂ fr. > hexane fr. > n-BuOH fr. > H₂O fr. 순으로 나타났다(Table 10).

Table 10. Radical scavenging effect of the methanol extract and their fractions obtained from mustard leaf on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Fractions	480	320	160	80	40	20	10	5	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
MeOH extract	26.79	26.79	12.77	-	-	-	-	-	>120
n-Hexane fr.	61.05	39.25	24.92	6.54	1.09	-	-	-	99.73
CH ₂ Cl ₂ fr.	90.65	74.30	46.26	23.68	12.21	3.42	-	-	45.34
EtOAc fr.	93.94	85.20	56.39	28.35	12.77	8.10	3.42	-	35.44
n-BuOH fr.	52.49	26.48	14.33	6.54	3.42	-	-	-	116.17
H ₂ O fr.	15.26	26.01	17.76	8.88	3.42	-	-	-	>120
L-Ascorbic acid					90.65	92.99	93.77	94.54	< 0.625

DPPH 및 ferric thiocyanate법에서 가장 강한 항산화활성이 나타난 EtOAc획분을 취

하여 EtOAc:MeOH=10:1(v/v), 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, MeOH 순으로 용출시켜 silicagel chromatography를 행하였다. TLC(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)를 통해 fr.1-fr.7로 분류하여 이중 fr.4에 대해 다시 TLC(EtOAc:MeOH=20:1)를 행한 결과 sub. fr.1-6을 얻었으며 sug fr.6에 대해 sephadex LH20 column chromatography를 행한 결과 compound 1을 얻었다.

2) Compound I의 구조결정

compound 1은 황색 결정으로 Mg/HCl, Zn/HCl, Molish정색반응시험에서 양성반응을 나타내었으며 ¹H-NMR spectrum을 통해 한 개의 methoxyl기를 함유하는 flavonoid 배당체임을 알 수 있었다. 또한 ¹³C-NMR spectrum을 통해 glucose가 β결합하고 있는 kaempferide-7-O-glucoside임을 확인하였다(Fig. 13, Fig. 14)

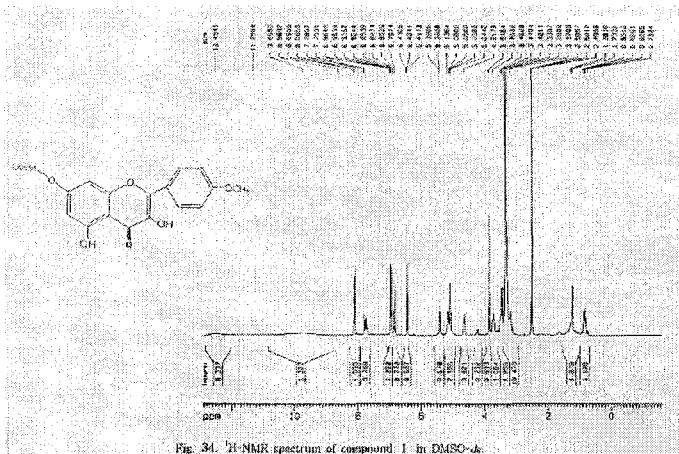


Fig. 13. ¹H-NMR spectrum of compound I in DMSO-*d*₆.

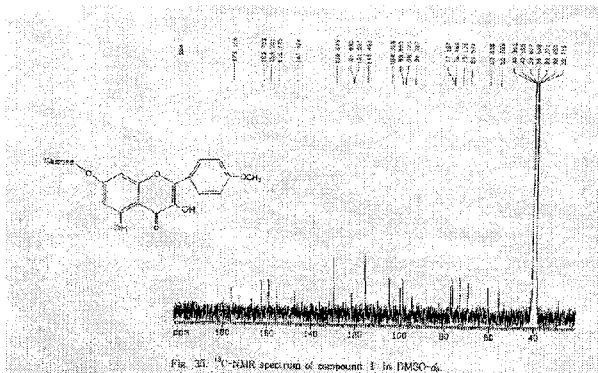


Fig. 14. ¹³C-NMR spectrum of compound I in DMSO-*d*₆.

라. 적갓 기능성 anthocyanins의 분리 및 확인

1) 적갓 기능성 anthocyanins의 동정

1999년 가을에 전라남도 완도군 완도읍에서 수확한 재래종 적갓을 동결건조후 분쇄하였다. 이를 0.1% TFA in 10% MeOH로 추출하여 조색소액을 얻은 후 이를 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chem. Co., Japan), ODS (Sigma Chem. Co., USA)를 이용하여 주된 색소부를 분리한 후 KC18 TLC plate (Whatman, USA) 및 Prep-HPLC (Waters Delta prep 4000, USA)를 이용하여 색소의 분리, 정제를 행하였다. 얻어진 색소들은 UV-vis spectrophotometer; Shinco S-2100 (Seoul, Korea), 1H- and 13C-NMR spectrometer; Varian Unity Plus 500 (California, USA), Fast Atom Bombardment Mass Spectra (FABMS); JEOL JMS-AX-505 WA (Japan Electron and Optics Laboratory Co. Ltd., Tokyo, Japan)등을 통해 구조를 결정하였다(Fig.15, Fig.16)

그 결과 재래종 적갓에 존재하는 항산화성 색소중 주된 색소 5가지(P1-P5)를 분리하였으며, 이들에 대한 TLC RF 치는 table 11과 같다.

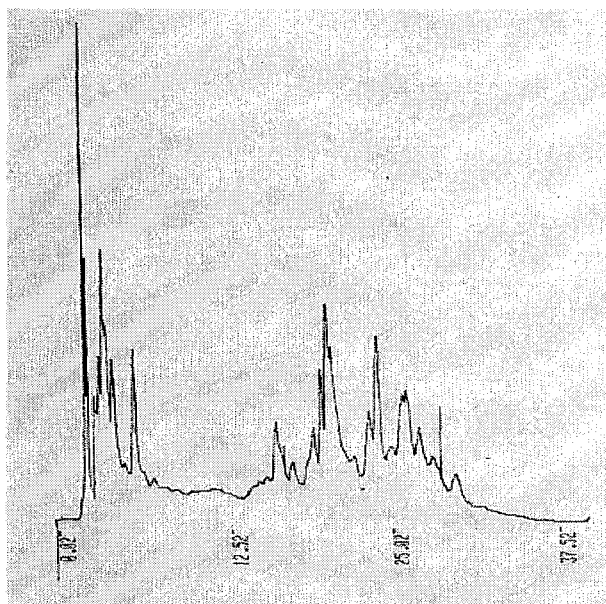


Fig.15. HPLC chromatogram of partially purified anthocyanins

HPLC conditions : column, Symmetry PrepTM C18 (7.8 × 150 mm); gradient elution from A to B for 35 min; solvent A (1.5% H₃PO₄ in CH₃CN-HOAc-H₂O (5:10:85, v/v), solvent B (CH₃CN-H₂O (20:80, v/v), flow rate, 2.0 mL/min; detector, 530nm

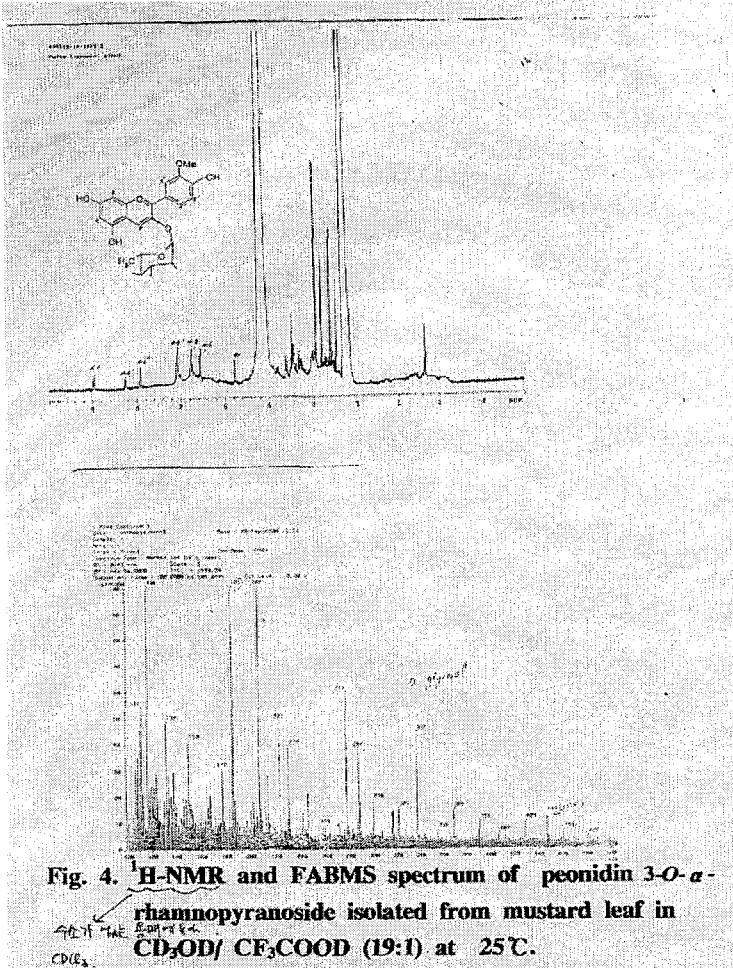


Fig. 4. ¹H-NMR and FAB/MS spectrum of peonidin 3-O- α -rhamnopyranoside isolated from mustard leaf in CD₃OD/CF₃COOD (19:1) at 25°C.

Fig.16. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum of P1 from red mustard leaf
¹H- and ¹³C-NMR spectrometer; Varian Unity Plus 500 (California, USA)

UV-spectrometer 및 HPLC, homo- and heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) 과 FAB/MS등을 통해 주된 색소는 peonidin 3-O-(6-O-p-coumaryl- α -L-rhamnopyranoside)-5-O- β -D-glucopyranoside 로 동정되었으며 P1과 P2의 구조는 fig. 19와 같다. P3-P5의 구조는 분석중에 있으며 240, 330 및 530 nm에서 피크가 나타나는 UV 특성으로 볼때 acylated anthocyanins이라고 추측된다.

Table 11. Chromatographic and spectral data of the anthocyanins isolated from mustard leaf

Compound	TLC (Rf)1	UV-vis spectroscopy		HPLC2
		$\lambda_{max}(nm)$	$A_{max}(acid)/A_{max}(vis)$ (%)	tR(min)
1	0.22	263, 278, 436, 518	9.1	2.221
2	0.31	279, 328, 527	4.2	3.611
3	0.36	283, 297, 323, 528	0.5	5.818
4	0.41	283, 296, 324, 531	0.9	20.155
5	0.49	283, 297, 323, 532	1	24.075

1TLC analysis was performed using KC18 plate with CH₃CN-H₂O-HOAc (15:80:5, v/v) as a developing solvent.

2HPLC analysis was performed using ODS column with CH₃CN-H₂O-HOAc (15:80:5, v/v) as a eluant.

2) 적갓 anthocyanins 획분의 기능성 검토

적갓 anthocyanins 획분을 다시 column chromatography하여 얻어진 획분의 전자 공여능을 살펴 보았을 때, fr.1-5 모두 어느 정도의 전자공여 작용이 있었으나 특히 fr.3와 fr.5의 전자공여능이 현저하였다(Fig.17). 이중 fr.3는 적갓 anthocyanins의 주된 성분층으로 이를 다시 분석하여 5개의 anthocyanins을 분리하고 이중 주된 색소의 구조를 fig.18과 같이 분리하였으며, fr.5는 flavonoids의 일종으로 추측되며 현재 그 구조를 분석중에 있다.

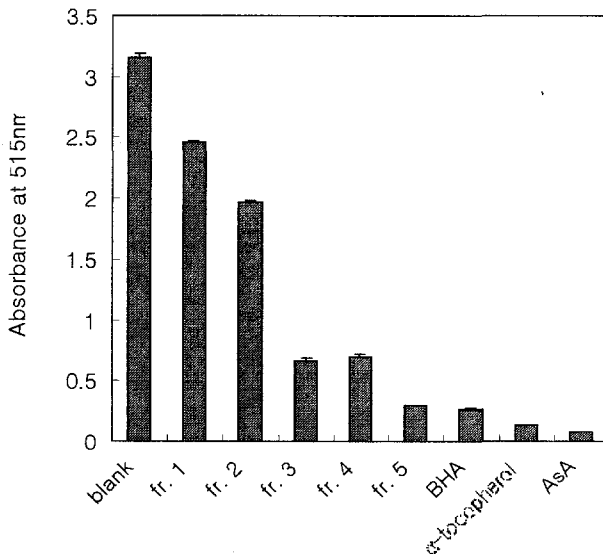


Fig.17. Electron donating ability of major anthocyanin fr.

fr.1-5의 아질산염 소거능은 fig 18와 같다. 이들 획분의 분해능은 pH의 영향을 받아 낮은 pH에서의 아질산염 분해능이 가장 우수하였으며, 주된 색소 획분인 fr.3의 분해능이 특히 우수하였다.

아질산은 식품에 존재하는 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하며 ascorbic acid나 tannic acid 유도체 등은 이를 저해한다고 알려져 있다. 특히 김치는 주된 재료인 배추, 무 등의 채소가 질산염 함량이 높고 젓갈류에는 아민류와 amides가 존재하며 소금을 첨가하여 강력한 발암 물질인 니트로소아민이 존재할 가능성이 제기되어 왔으나 김치 발효중 ascorbic acid, flavonoids 등에 의해 제거된다고 생각되며 적각 anthocyanins 역시 아질산제거에 기여할 것으로 생각할 수 있다.

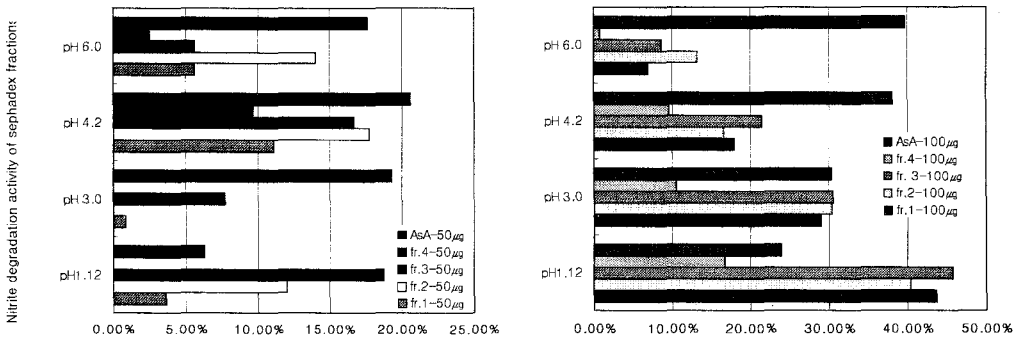


Fig. 18. 적각 anthocyanins 획분의 아질산염 소거능 50µg 및 100µg 첨가

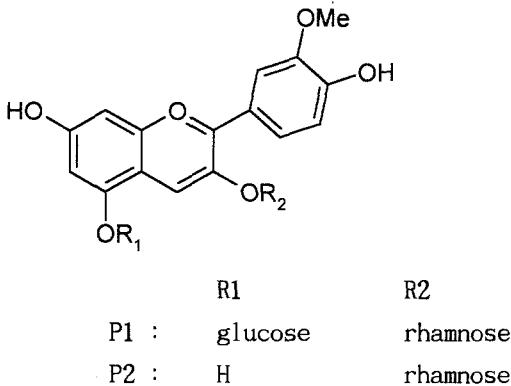


Fig. 19. Chemical structures of two major anthocyanins isolated from leaf

4. 항산화항노화기능성김치의 개발 및 품질개선

가. 항산화능도화기능성 김치(A-I형) 1차 조제

1) 주재료(청갓과 적갓)의 조합에 의한 항산화성 증진 김치

가) 김치 재료조합에 의한 항산화성 증진 김치 탐색

같은 갓김치라도 주재료로 사용하는 갓의 종류에 따라 발효양상, 생리활성기능과 항산화성을 비롯한 여러 가지 성질에서 차이를 보인다는 점에 착안, 청갓(일명 돌산갓)과 적갓(재래종갓, 일명 갓쌈지)을 주재료로 하는 갓김치를 담그면서 청갓과 적갓의 비를 달리한 김치의 일반적인 특성과 항산화성을 살펴보았다. 절인 갓의 염도가 2.5%가 되도록 15% 소금물 용액에 갓을 절여 갓에 파 4%, 마늘 2%, 고춧가루 2%, 생강 1%를 각각 첨가 혼합하여 김치를 담그어 15℃에서 발효시켰다. 이 때 청갓 김치는 발효 4일째에 pH 4.2, 산도 0.72%로 적숙기에 도달하였고 적갓김치는 발효6일째에 pH4.5, 산도 0.70%으로 적숙기에 도달하였다. 이와 같은 방법으로 제조한 모델김치군들과 가열쇠고기를 이용하여 조제한 model system에서 TBA가를 통해 항산화성을 살펴 보았다. 주재료인 갓은 그 항산화성이 다각도로 검토되어 높은 항산화활성을 가지는 것이 이미 확인된 바 있으므로 갓김치를 주재료를 적갓과 청갓으로 달리하여 항산화 특성 및 항산화 활성을 살펴보았다. Fig. 20은 청갓 김치군과 적갓김치군에 주된 파, 마늘, 고춧가루, 생강 등 김치부재료를 각각 첨가하여 TBA가를 본 결과로서, 청갓김치군보다 적갓김치군의 항산화성이 우수하였으며 부재료를 달리 하였을 때도 이런 경향이 일관되게 나타났다. 부재료별 항산화성은 고춧가루 > 생강 > 마늘 > 파 의 순으로 나타났으며 부재료들을 첨가하였을 때 그렇지 않은 경우보다 현저하게 높은 항산화성을 보였다.

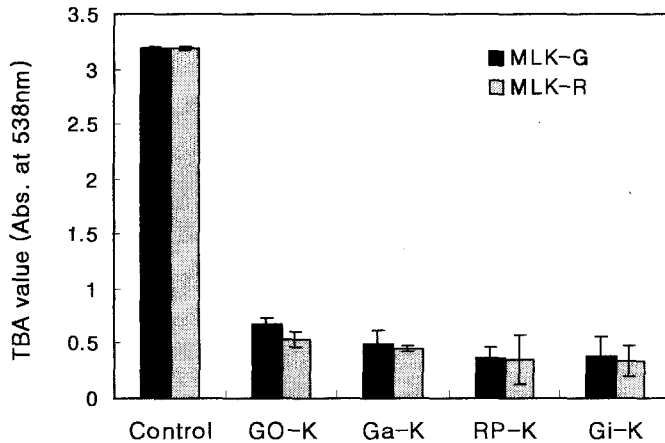


Fig.20. Changes of TBA values of model systems with the addition of different spices of kimchi during the reaction at 4℃ for 4 weeks. MLK-G; green mustard leaf kimchi, MLK-R; red mustard leaf kimchi, GO; green onion, Ga; garlic, RP; red pepper, Gi; ginger

가장 흔하게 사용되는 두가지 갖의 항산화성을 달리 비교한 결과 Fig.21에서도 마찬가지로 모델 갖김치에 항산화 활성이 있다고 알려진 부재료를 첨가한 김치군에서도 동일하게 나타났다. 거의 모든 부재료군에서 적각 김치군의 항산화성이 청각김치군보다 우수하였으며 부재료별로 보았을 때 더덕 > 우영 > 청각 순으로 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 특히, 항산화성이 높은 부재료로 밝혀진 청각 및 더덕을 갖김치에 첨가 후 발효시켰을 때 더덕(2%) 및 청각(2%) > 더덕(4%) > 청각(4%) 등의 순으로 항산화활성이 높게 나타나 항산화성이 우수한 재료들을 조합하였을 때 항산화성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 부재료를 첨가한 비(%)가 높아질수록 항산화성 역시 증가하였다.

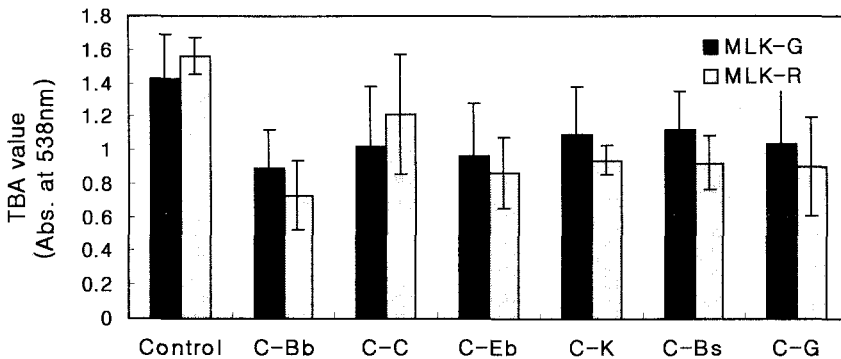


Fig.21. Changes of TBA values of model systems with the addition of various vegetables during the reaction at 4°C for 4 weeks. MLK-G; green mustard leaf kimchi, MLK-R; red mustard leaf kimchi, Bb: bonnet bellflower, CC: chinese chive, Eb: edible burdock, K: kelp, Bs: brown seaweed, G: *Gloipettis furcata*

Fig.22. 에서 살펴본 바와 같이 숙성 청각김치와 숙성 적각김치를 각각 극성이 다른 용매로 추출하여 이들 추출물을 1.5% 첨가한 linoleic acid system에서 POV가를 측정하여 항산화성을 관찰한 결과 물추출물 첨가군과 메탄올 추출물 첨가군에서 청각김치보다 적각김치의 항산화성이 보다 우수한 것으로 나타났다.

또한 주요 부재료가 갖김치의 항산화성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각 주재료와 부재료를 달리한 model system을 조제하였다. Cooked ground meat(Control) 10g에 증류수 10ml을 가한 군과 파를 4% 첨가한 군(C), 마늘을 2% 첨가한 군(Ga), 고춧가루를 2% 첨가한 군(RP), 생강을 1% 첨가한 군(Gi)으로 나누어 주재료별로 갖김치 10g을 첨가하여 model system을 조제, 4°C에서 4주간 처리 후 TBA가를 살펴보았으며

그 결과는 Fig. 20에서 살펴본 바와 같이 모든 부재료군에서 청갓김치보다 적갓김치의 항산화성이 우수하였다. 청갓과 적갓을 다양한 비율로 조합하여 갓김치를 담그었을 때 적갓김치의 비율이 높을수록 항산화성이 우수한 경향을 보였다. 그러나, 적갓은 청갓과는 달리 맛과 향이 강한 만큼 김치로 담그었을 때 청갓김치보다 기호도가 낮은 경향이 있고 또한 첨가하는 것같은 양이 청갓김치보다 많아 염도도 높은 편이며 청갓김치의 주재료인 돌산갓을 일년 내내 시장에서 구할 수 있는 것에 비해 적갓은 주로 김장철에 이용가능한 계절 재료임을 감안하여 볼 때 청갓만 주재료로 하거나 적갓만 주재료로 한 갓김치보다는 청갓과 적갓을 혼합하여 갓김치를 담그었을 때 기호성, 저장성, 각종 기능성면에서 우수한 제품이 생산가능하다고 사료된다.

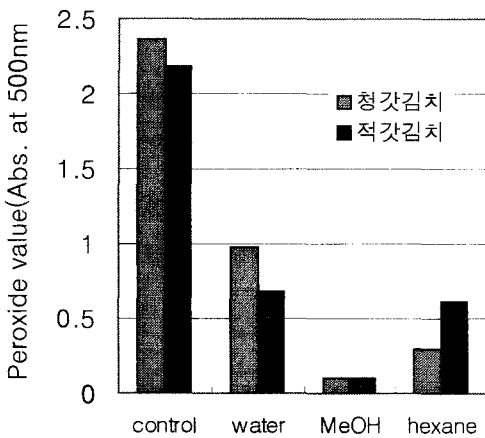


Fig. 22. Effects of various solvent extracts of the different mustard leaf kimchi on the peroxide formation during the autoxidation of linoleic acid mixture at 37°C for days.

예비 실험 결과 적갓의 비율이 높을수록 항산화성이 우수하였으나 위의 여러 상황을 고려해볼 때 청갓대 적갓의 비율이 70 : 30으로 한 갓김치가 항노화기능성 김치로 적당하리라 생각되며 이에 대해 보다 자세한 실험을 진행하였다.

나) 부재료(청각, 더덕)의 조합에 의한 항노화성 증진김치

항산화활성이 있는 것으로 알려진 특수 부재료들을 조합을 달리하여 청갓김치 및 적갓김치에 첨가한 후 이들 부재료의 추가가 항산화성에 기여하는 정도를 분석하였다 (Fig. 23-25). 김치제조시 주재료(청갓과 적갓)의 조합에 의한 항노화성 증진 김치에서 사용한 것과 같은 비율의 양념에 더덕, 부추, 우엉, 미역, 다시마 및 청각을 각각

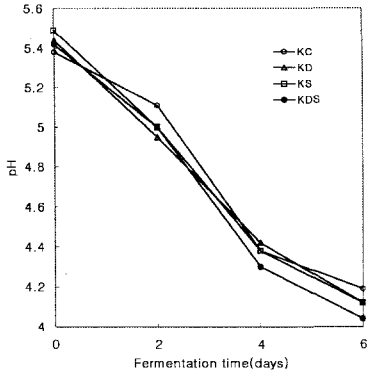


Fig.23. Changes of pH of the different optional ingredients added green mustard leaf kimchi during fermentation at 15°C.

KC : Control green mustard leaf kimchi, KD: Dō dōk added kimchi, KS: Seastaghorn added kimchi, KDS: Dō dōk & Seastaghorn added kimchi

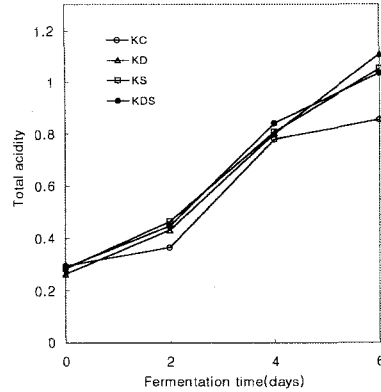


Fig.24. Changes of total acidity of the different optional ingredients added green mustard leaf kimchi during fermentation at 15°C.

KC: Control green mustard leaf kimchi, KD : Dō dōk added kimchi, KS: Seastaghorn added kimchi, KDS: Dō dōk & Seastaghorn added kimchi

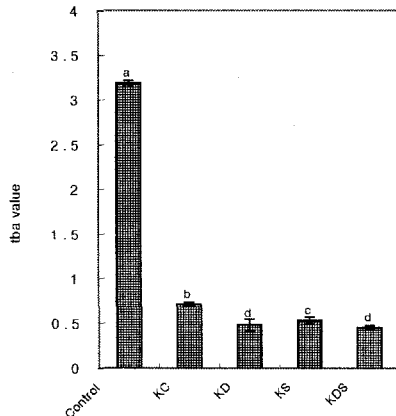


Fig.25. Changes of TBA values of model systems of the 4% different optional ingredients added green mustard leaf kimchi during the reaction at 4°C for 4 weeks.

KC : Control green mustard leaf kimchi, KD : Dō dōk added kimchi, KS : Seastaghorn added kimchi, KDS: Dō dōk & Seastaghorn added kimchi

2%와 4%씩 첨가 후 김치 model system을 제조하여 이들에 대한 TBA를 살펴보았다. 이들 중 특히 항산화성이 우수하였던 군은 청각과 더덕을 첨가한 군이었으며 부재료의 첨가 농도가 증가할수록 항산화성 역시 증가하는 경향을 보였다. 이중 항산화성이 가장 우수한 두가지 부재료인 청각과 더덕을 이용한 갓김치를 제조하여 항산화성을 살펴보았다. 네 군 김치(control, KD:더덕첨가김치, KS:청각첨가김치, KDS:청각

및 더덕첨가김치) 모두 15℃에서 4일째에 pH 4.3~4.42, 산도 0.78~0.85%로 나타났으며 그 결과는 Fig. 23. 및 Fig. 24. 와 같다. 이상의 결과를 보면 pH가 저하함에 따라 산도는 증가하였다. Control군의 김치에 비하여 다른 부재료를 첨가한 김치군의 산도가 높게 나타났는데 이는 부재료 첨가량이 많아짐에 따라 발효속도가 높아지기 때문이라 생각된다.

청각 김치에 더덕을 첨가한 군(KD), 청각을 첨가한 군(KS), 더덕과 청각을 혼합하여 첨가한 군(KDS) 및 이들 부재료를 첨가하지 않은 군(KC)으로 나누어 제조한 모델 청각 김치의 항산화성 증진 효과를 조사한 결과는 Fig. 25와 같다.

Control군에 비하여 KC, KD, KS 및 KDS의 네군 모두에서 항산화 활성이 훨씬 높게 나타났으며 특수 부재료를 첨가하지 않은 KC군에 비하여 특수 부재료를 첨가한 군(KD, KS, KDS)에서의 항산화성이 높게 나타났다. 또한 특수 부재료 첨가 군별로는 2주와 4주째 모두 KDS > KD > KS > KC의 순으로 나타나 항산화성이 우수한 재료들을 조합한 군(KDS)에서의 항산화성 증진 효과가 더덕(KD) 및 청각(KS)을 각각 첨가한 군에서 보다 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 경향은 Fig. 5에서 나타나듯이 4℃에서 저장한지 4주째 되었을 때 현저하게 나타났다. 75% 메탄올 추출물의 경우 역시 더덕(KD)과 청각(KS)을 각각 첨가한 군보다는 이들 특수 부재료를 모두 첨가한 군(KDS)에서의 항산화 효과가 우수하였다.

2) 항산화항노화 기능성 김치 AI형(갓김치)의 레시피

가) 계절별 갓의 특성

계절별로 갓을 사서 갓 한 단의 길이, 둘레, 줄기 길이, 무게, 한 단 중 포기 개수, 포기 당 무게를 조사하여 비교한 결과(Table 12), 갓의 외관은 봄·가을, 여름에 그 특징이 크게 달랐으며 봄·여름의 갓 길이가 가을 갓보다 더 길었다.

Table 12. Comparison of the general characteristics of mustard leaf by season

	Spring · Fall	Summer
Length of bunch (cm)	41.53 ± 4.47*	32.81 ± 5.79
Girth of bunch (cm)	55.35 ± 2.74	58.46 ± 2.91
Stem Length (cm)	13.71 ± 1.69	11.94 ± 1.46
Weight of bunch (g)	2508.24 ± 858.37	1735.83 ± 216.44
Thickness (cm)	0.2~2.0	0.1~0.7
Number of plant in a bunch	56.33 ± 21.14	79.94 ± 34.48
Weight of plant in a bunch (g)	54.19 ± 34.91	25.53 ± 18.36

*Mean ± SD

또 한 단의 들레는 계절별로 비슷했으나 한단 중 포기 개수가 봄·가을 갓이 훨씬 적음에도 불구하고 단의 무게는 봄·가을 갓이 많이 나가는 것으로 보아 봄·가을 갓이 밀도가 높은 것으로 볼 수 있다. 여름 갓은 줄기 길이, 두께가 봄·가을 갓보다 약간 씩 작으며 포기당 무게도 적게 나가 여름 갓의 외관은 크기가 작은 포기를 이룸을 알 수 있다.

갓은 채소 종류에서도 고온 다습에 잘 견디는 작물이나 내한성은 약하여 겨울에 따듯한 남부 해안 지방 외는 월동이 불가능하며 저온에 대해 일반 재래종 갓보다 들산 갓이 약간 약한 편이다. 장다리가 나오고 꽃눈이 분화되는 것은 온도보다 일조시간에 크게 영향을 받으며 월동 후 고온 장일하에서 촉진된다. 여름의 갓은 일조시간이 길어 빨리 꽃이 피어 버리므로 짧을 때 수확해버리고, 봄·가을 갓은 날씨가 갓이 크기에 적당하여 제대로 클 수 있으므로 크기가 크고 굵다.

나) 갓김치 담금법 개선 및 레시피 선정

(1) 갓김치 담금법에 대한 문헌 조사 및 이의 재현성 검토

문헌과 조리서 및 공장 담금법에 수록된 20개 이상의 갓김치 담법을 중심으로 그 재료의 종류와 원료 배합비 및 담금방법을 체계적으로 정리 및 환산하여 대표적인 문헌의 갓김치 담금법 10가지를 결정하였다(Table 13). 이 담금법으로 김치를 제조하여 적속기에 관능검사를 실시해서 비교하였다(Fig. 26). 그 결과 7번의 담금법으로 담근 갓김치가 종합적인 평가에서 가장 좋은 점수를 얻었는데, 이 김치는 젓갈, 고춧가루 및 마늘을 비교적 적게 넣고 배를 많이 넣어서 단맛을 추가해 짜지 않았다.

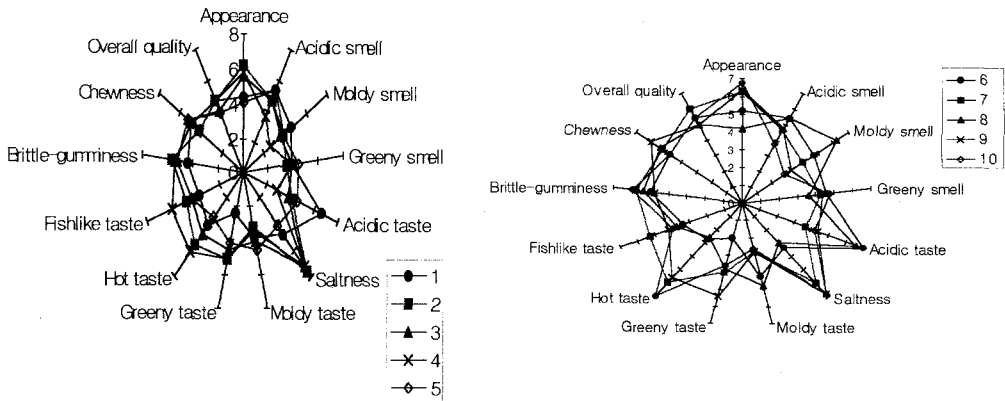


Fig. 26. QDA profile of mustard leaf kimchi prepared with different recipes from survey results based on literatures

Table 13. Ingredients ratio of Mustard leaf kimchi preparation from literatures research

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mustard leaf	1000	100 0	100 0	100 0	1000	1000	1000	1000	100 0	1000
Radish	400					75				
Garlic	60	30	60	60	15	7.5	30	21.7	60	28.2
Ginger	30	7.5	30	30	7.5	3.8	15	16.7	30	28.2
Green onion	500	25	400	500	41.8	125	55	41.7	100 0	28.2
Red pepper powder	315		105	158	13.1	39.2	39.5	17.5	158	131
Red pepper		100								
Pear	75		75	150			225			
Sugar								5		
Roasted sesame	3	3	14	7	3	3.5	3	3	7	7.3
Chestnut	175		250	250						
Pine nuts	13		50	13						
Oyster	200		200	200						
Glutinous rice paste	160	240			13.4	50	80	13.4		29.2
Fermented anchovy juice	630	315	630	630	26.3	26.3	52.5	21.7	420	117
Shredded red pepper	little						little			

(2) 전라도 지방의 갓김치 담금법 조사 및 이의 재현성 검토

전통적인 갓김치 담금법을 조사하기 위한 전라도 지방 명가 갓김치 담금법 조사 결과는 Table 14와 같다. 전체 8종류이며 특이한 것은 젓갈에서 멸치젓만 쓰는 것이 아니라 멸치젓에 새우젓을 첨가하여 김치를 담는 명가 갓김치 담금법이 6종류나 되었다. 이것은 보랏빛이 도는 재래종의 갓김치에서는 멸치젓이 100% 사용하여 담그는 경우가 많으나 청갓인 돌산 갓김치 담금법에선 갓김치에 새우젓을 추가하여 담금을 더 선호하는 것으로 보인다. 조사된 담금법으로 김치를 제조하여 적숙기에 관능검사를

하여 그 결과를 비교하였다(Fig. 27).

Table 14. Ingredient ratio of Mustard leaf kimchi preparation based on the survey in Cholla province

	1	2	3	4	5	6	7	8
Mustard leaf	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Radish						500		
Garlic	75	45	84	45	45	45	15	45
Ginger	1		12.5	15	5	5.5	15	45
Green onion	50			250	50	250	125	50
Red pepper powder	150		300	100	63	300	300	60.35
Red pepper		300						
Carrot	45			45	93.5			93.5
Sugar		7.5	90	7.5	20	7.5	30	40
Roasted sesame	3				3			
Seastaghorn								little
Fresh shrimp		100				250		
Glutinous rice paste	40	80	40	8	79	21	222	180
Fermented anchovy juice	7	105	84	35.5	135.5	35.5	35.5	135.5
Fermented shrimp	142.5	19	45.5	45.5	34.6	8.5		
The others fermented seafood			45.5					

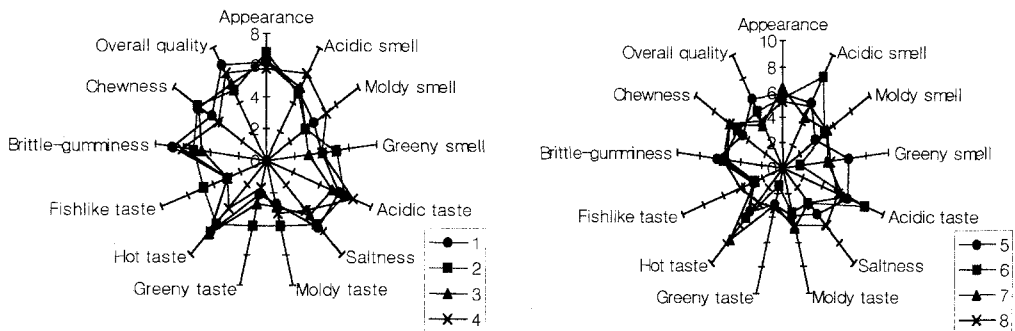


Fig. 27. QDA profile of mustard leaf kimchi prepared with different recipes from survey results in Cholla province.

다) 갓김치 recipe 선정 및 젓갈을 달리한 갓김치 발효양상

갓김치의 젓갈 및 기타 부재료의 적당한 배합을 위해 부재료 조합이 다른 갓김치를 담그어 비교했으며, 갓김치는 멸치젓으로 절이는 것이 일반화되어 있는데 실제 전라도 명가 갓김치 담금법 조사 결과 멸치젓에 새우젓을 첨가해서 담그는 경우가 많아 새우젓 첨가하여 담근 갓김치의 발효양상을 비교하였다. 멸치젓 100%을 Control군으로 하고, 새우젓 20% 멸치젓 80%, 새우젓 50% 멸치젓 50%군으로 실험한 결과 pH는 담금 당일 새우젓 20% 멸치젓 80%, 새우젓 50% 멸치젓 50%군이 Control군보다 더 높았으나 pH 저하는 더 현저하였다. 산도의 변화는 발효초기는 비슷하나 발효후기에 Control 군에 비해 새우젓군이 더 높음을 볼 수 있는데 이는 김 등의 결과와 유사하였다. 환원당 함량은 큰차이가 없고 젓산균수에서 *Leuconostoc* sp.가 발효초기에 새우젓 50% 멸치젓 50%군에서 현저한 증가현상을 보였다. 관능검사의 결과는 Control군이 짠맛, 덜익은 맛, 풋내에서 높은 점수를 나타내고 신내와 신맛은 새우젓 20% 멸치젓 80%군에서 높았고 종합적인 평가는 새우젓 50% 멸치젓 50% > 새우젓 20% 멸치젓 80% > Control 군 순으로 높게 나타났다

따라서 갓김치 담금시 젓갈을 멸치젓만 넣는 것보다 새우젓 50% 멸치젓 50%으로 하는 것이 더 적당하다고 판단되었다. 젓갈은 우리 고유의 수산 발효 식품으로 김치의 부재료로서 중요한 양념류이며 이들은 생선이나 조개류 또는 내장등을 원료로 하기 때문에 단백질이 풍부하고 이것이 분해되어 글루타민산, 핵산 물질이 생성되어 구수한 감칠맛을 내어 준다.

나. 갓김치 담금법에 따른 발효양상 및 주요 성분의 변화

1) pH 및 산도

조사된 문헌 및 전라도 지방의 갓김치 담금법 중 관능이 우수한 것으로 선택된 recipe와 수정·보완된 새로운 recipe로 갓김치를 담궈 그 발효양상을 비교하였다. pH는 4일째까지 급격한 저하를 보이다가 그 후로는 완만하며 문헌의 담금법으로 담근 갓김치가 발효 전기간 동안 가장 낮았다. 산도는 4일까지는 세 군이 비슷한 경향을 보이나 그 이후부터 차이가 심해져 발효후기에는 전라도 지방의 담금법으로 담근 갓김치의 산도가 가장 높았다. 민 등은 염도 3.0%인 김치를 5~14℃의 저온에서 발효시켜 pH 4.2(산도 0.6~0.8%)일 때 적당한 정도로 익었다고 하였고 구 등은 pH 4.2~4.4일 때가 먹기에 적당한 신맛 범위라고 하였다. 또한 조 등은 일반적으로 맛과 pH 및 젓산함량의 관계에서 가장 맛이 좋은 상태의 김치는 pH가 4.2~4.6사이로서, 젓산함량은 0.5~0.75%라고 보고하였고, 김치재료 및 부재료의 첨가와 숙성온도 등 여러 가지 인자에 따라 약간씩 다르게 그 조건이 결정된다고 하였다. 돌산갓김치의 경우는 5℃의 숙성조건에서 pH가 4.6~5.1(김치), 4.1~4.4(국물)범위인 10~12일 이후가 맛

이 바람직할 것이라고 보고하였다.

2) 환원당 함량

갓김치 담금법에 따른 갓김치의 발효 기간 중 환원당 함량은 발효기간 동안 비교적 높은 비율로 감소하였고 부재료의 양이 많은 전라도 지방 담금법의 갓김치의 함량이 가장 많았다. 신은 김치발효 중 환원당이 감소하면서 산도가 증가하였다고 보고하여 본 실험 결과와 같은 경향을 나타내었다. 채소류의 당함량은 종류와 온도나 햇빛 등의 재배환경에 의해 달라지며 김치를 담그는 경우 원료의 종류, 첨가되는 부재료의 종류, 절임시간, 소금농도에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려지고 있다. 대체로 당의 함량변화는 pH 및 산도와 상관관계가 많은데 이것은 김치 중의 각종 젖산생성 미생물에 의해 당이 소모된 만큼 유기산 생성으로 인한 이유 때문으로 생각되었다.

3) 젖산균 수

담금법에 따른 세 군의 갓김치의 젖산균수 변화는 *Leuconostoc sp.* 수는 전라도 지방, 문헌, 수정된 새로운 recipe로 담근 세 군의 김치 모두 비슷한 경향을 보이는데 2일째까지는 급격하게 증가하다가 그 이후부터는 비교적 일정하게 유지된다. *Lactobacillus sp.*는 발효초기에 문헌의 담금법으로 담근 갓김치가 다른 두 군에 비해 현저한 증가를 보이는데 4일째이후부터는 세 군 모두 비슷한 경향을 보인다. 김치의 발효과정 중 세균의 경시적인 변화는 발효 초기부터 혐기성 세균의 생균수가 급격히 증가되어 발효 후기에 일정한 수준에 도달하나 호기성 세균은 발효 초기에 약간의 증가를 보이다가 발효가 점차 진행되면서 생육이 억제되어 균체수가 감소된 후 저장 후기에 다시 급증하는 것으로 나타났다. 김치 발효는 젖산균에 의해 주도되는데, 주 발효균은 *Leuconostoc mesenteroides*로 이것은 김치의 맛과 냄새에 좋은 영향을 주며 김치의 적숙기에 그 수가 최고로 되며 *Leuconostoc mesenteroides*가 감소하는 시기에 산패를 일으키는 *Lactobacillus plantarum*이 생기는 것으로 알려져 있다.

4) Total phenol 함량

담금법을 달리한 갓김치의 총 phenol 함량은 발효 4일째 총 phenol의 함량이 세 군의 김치 모두에서 증가하는 경향을 나타내었다. 십자화과 채소의 신선한 잎에는 *p*-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid 같은 hydroxybenzoic acid와 hydroxycinnamic acid인 *p*-coumaric, ferulic, caffeic, sinapic acid의 cis와 trans의 isomers가 발견되었다. 십자화과 채소의 침출액에서 guaiacol과 그들의 ethyl과 vinyl 유도체 등의 휘발성 phenol류가 분리되었는데 절여진 Takana 잎의 경우 저장 기간이 길수록 phenol의 상대적인 양이 증가하였다. 이것은 *p*-coumaric acid와 ferulic acid 같은 phenolic acid가 미생물과 가열반응에 의해 phenol의 ethyl 또

는 vinyl 유도체를 생성하기 때문이라고 했는데 이는 본 실험의 결과 발효가 진행됨에 따라 총 phenol 함량의 증가 현상과 일치하고 있다.

채소와 향신료의 항산화성은 주로 phenol 물질에 의하며 그 중 quercetin의 유도체인 flavonol이 중요한 역할을 담당한다고 알려지고 있다. 이때 flavonol은 ascorbic acid를 파괴하는 구리 같은 중금속 이온이 존재할 때 ascorbic acid의 안정제 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 일부 phenol 화합물은 lipoxxygenase와 peroxidase 활성을 저해한다고 보고되고 있다. 채소 추출물은 peroxidase 활성에도 영향을 주는데 α -tocopherol과 quercetin, raticinic acid와 chlorogenic acid의 경우 chlorogenic acid가 가장 효과적이며 그 다음이 quercetin, raticinic acid 순이었다고 한다. 그리고 감자에서 추출한 poly phenol이 콜레스테롤을 투여한 흰쥐의 간장에서 지질과산화물을 억제한다는 보고도 있다.

5) Ascorbic acid 함량

갓김치 담금법에 따른 갓김치의 ascorbic acid 함량은 발효 초기에 비하여 발효 4 일째인 적숙기에서는 ascorbic acid 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 이 등의 보고에 의하면 ascorbic acid는 숙성 적기에 그 함량이 증가한다고 하였는데 본 실험에 사용한 갓김치는 발효 적기에 그 함량이 오히려 감소하여 상이한 결과를 나타내었다. 박 등의 보고에 의하면 담금 온도를 달리한 갓김치에서 ascorbic acid의 함량이 발효 초기에는 서서히 감소하다가 발효 적기에는 초기의 함량보다는 다소 낮지만 다시 증가하다가 발효후기에 완만하게 감소한다고 보고하였다. 신과 전 등의 보고에 의하면 김치 액즙만을 실험대상으로 할 때는 발효과정 중 ascorbic acid가 서서히 용출된 것을 측정할 결과로 발효기간에 따라 서서히 함량이 높아진 것으로 여겼으며, 김치 전체를 마쇄하여 액즙을 사용한 결과로는 발효 중 점차 감소한다고 하여 김치 발효 중 ascorbic acid는 생성된다기 보다 오히려 발효과정 중 계속 감소한다고 하였다. 본 실험에서는 500g 단위로 담은 김치 전체를 마쇄하여 액즙을 취하여 ascorbic acid 함량을 측정하여 신과 같은 결과를 보였다. 김치 숙성 중 ascorbic acid 함량변화는 흥미 있는 연구대상이 되고 있으며 주재료 및 첨가되는 부재료, 숙성온도, ascorbic acid 추출방법에 따라 연구 결과에 다소 차이가 있다.

6) Chlorophylls 함량

청갓 김치의 발효가 진행됨에 따라 푸른 채소의 청록색이 황록색으로 변하는 것은 pheophytin과 pheophorbides의 생성 때문으로 알려져 있는데 이것은 chlorophyllase의 작용으로 chlorophyllides의 생성이 촉진되고 산발효 과정에서 생성된 산에 의해 pH가 낮아져서 생성된 chlorophyllides의 대부분이 pheophorbides로 변했기 때문으로

보고되고 있다. 일반적으로 이러한 chlorophyll의 분해 및 pheophytin의 생성 속도는 가열온도와 시간, 가열방법, 저장방법과 저장기간, 저장온도, pH 등의 조건에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다. 김 등은 배추, 열무 및 갓김치 저장 중의 chlorophyll 함량의 감소와 pheophytin과 pheophorbide 생성량의 증가는 발효중 ascorbic acid의 함량이 높게 유지되었던 갓김치에서 가장 낮게 나타났다고 보고하였고 또한, 김치 중의 chlorophyll의 분해 및 pheophytin, pheophorbide의 생성은 김치에 함유된 ascorbic acid 함량과 정의 상관성이 있다고도 보고되었다. 본실험의 갓김치 담금법에 따른 세 군의 김치 모두에서 발효 초기에 비해 발효 적기의 총 chlorophyll 감소가 현저하게 나타났는데 이는 갓김치 숙성 중 chlorophyll의 분해가 일어나 total chlorophyll, chlorophyll a 및 b의 감소율이 현저하였다고 보고한 조와 최의 보고와 유사한 결과를 나타내나, 총 chlorophyll의 함량이 발효 전기간에 거의 변화 없이 같은 수준을 보인다는 이와 송의 보고와는 다른 결과를 나타냈다. 이는 본 실험이 chlorophyll derivatives로 전환된 함량을 고려하지 않고 chlorophyll a와 chlorophyll b의 함량변화만을 측정하여 이에 따라서 총 chlorophyll 함량을 나타낸 것에 기인한 결과라고 사료된다. 또한 chlorophyll a와 chlorophyll b의 발효에 따른 함량변화는 발효초기에 비해 발효 4일째 현저히 감소되는 것으로 나타났는데 이는 발효과정 중 chlorophyll a와 b가 이들의 유도체인 pheophytin a와 pheophytin b로 전환된 결과로 여겨진다. 이는 김의 보고와 유사하며 chlorophyll이 pheophytin으로 전환되는 과정은 김치 제조 후 즉시 시작되어 발효가 진행됨에 따라 갓김치의 색은 초록색에서 갈색으로 변환된다고 보고되어 있다. Pheophytin의 생성 속도는 가열온도와 시간, 가열방법, 저장방법과 저장기간, 저장온도, pH 등의 조건에 의해 영향을 받는다고 보고되어 있다.

7) Carotenoids 함량

담금법을 달리한 갓김치의 발효 과정 중 carotenoids의 함량은 세 군 모두 발효 초기에 비해 발효 적기에 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 김치에서 발효가 진행됨에 따라 생성된 미생물과 pH의 감소에 따라 carotenoid가 감소되는 것으로 추정되며 carotenoid의 감소 현상은 매우 완만한 기울기를 나타내고 있는데 이는 최의 보고와 유사하다. 부재료로서 고추, 파 및 멸치액젓이 각각 첨가된 김치에서 carotenoids 함량에 영향을 미친다는 장 등의 보고를 볼 때, 세 군의 갓김치 중 전라도 지방의 담금법으로 담근 갓김치의 carotenoid 함량이 가장 많은 것은 고춧가루와 당근의 영향으로 여겨진다.

다. 관능검사

전라도 지방과 문헌에 나타나는 담금법과 수정·보완된 담금법으로 갓김치를 담근

서 적숙기(4일째)에 관능검사를 실시해 그 결과를 비교한 결과 고춧가루와 젓갈의 양이 적은 문헌의 갓김치는 외관이 두 군에 비해 현저히 낮은 점수를 얻었고 또한 젓갈내와 짠맛, 매운맛, 비린맛에서도 낮은 점수를 얻었다. 전라도 지방의 담금법으로 담근 갓김치의 관능결과는 풋내, 젓갈내, 덜익은 맛, 매운맛에서 관능점수가 높았으며 한편 새로 수정·보완된 담금법으로 담근 갓김치는 종합적인 평가에서 가장 높은 점수를 얻어 이 담금법이 가장 기호성이 있음을 알 수 있었다. 관능적 특성은 중요한 김치의 품질 지표인데 김치의 관능적 특성을 주는 요소는 맛, 냄새, 조직감 그리고 색깔이라고 할 수 있으며, 김치의 맛은 신맛, 감칠맛, 짠맛, 단맛, 상쾌한 맛 등이 조화를 이루고 있어 덜 익었을 때는 짜며 과숙한 것은 신내와 군덕내가 나고 조직감은 적당한 정도와 아삭아삭하는 씹히는 특징을 주며 과숙한 것은 물러지는 현상을 나타낸다고 한다.

라. 1차 모델 recipe의 선정

위의 실험결과를 바탕으로 조제한 1차 모델 recipe는 Table 15와 같다.

Table 15. Ingredients ratio of mustard leaf *kimchi*

Ingredients	Weight(g)
Fresh mustard leaf	1000
Green onion	50
Garlic	25
Ginger	7
Red pepper powder	80
Fermented anchovy juice	110
Glutinous rice paste	80
Sugar	6
Final salt concentration	2.5±0.1%

제 4 절 결론

1. 항산화성 갓김치와 항산화 특성

김치는 여러 가지 기능성 중 항노화 및 항산화 특성이 있으며 항산화성 물질이 결국 항노화성에 깊이 관여하고 있다고 판단되었다. 특히, 갓김치는 일반적으로 많이 식용하고 있는 배추김치나 무김치보다 항산화성이 높았다. 가열우육의 지방질 산화에

대한 항산화성이 인정되었고 또한 생체모델 실험에서도 확인되었다. 이 항산화성은 발효 적정 시기에 더 높았다. 갓 김치 자체는 물론 용매 추출물을 여러 가지 방법으로 분석하여 상대적인 항산화성을 비교검토하였다. 그 결과 우육지방질의 모델 시스템에서 지방질의 과산화 방지 특성, TBARS(TBA가) 생성억제, 유리라디칼 소거 특성 그리고 rat eliver homogenate와 EPC liposome에 대한 높은 항산화 특성을 보였다. 따라서 갓김치 및 갓김치 성분들은 지방질의 과산화 억제, 유리라디칼 등의 소거능력 그리고 항산화 관련효소의 활성 촉진 작용이 있었다.

2. 기지의 항산화성 물질의 분석

김치류에 존재하는 이미 알고 있는 항산화 물질을 분석하고 이들의 항산화성을 살펴보았다. 특히 갓김치의 chlorophyll(CHL), carotenoids(car) 획분에서 대단히 높았다. 그리고 CHL a 및 CHL b, pheophytin(PHY) a 및 PHY b, β -carotene 등의 성분이 항산화성에 중요한 역할을 하였다. 기타 ascorbic과 phenol 물질 등도 확인되었다. Phenol 물질을 분리하여 그 조성을 살펴 본 결과 vanillic acid, hydroxycinnamic acid, ferulic acid 등 10여개의 물질이 함유되어 있었다.

3. 갓김치의 항산화 물질의 분리와 동정

용매계통 분리 방법에 의한 항산화 물질의 분석, 분리하여 각 획분의 항산화성을 검정하였으며, 물질을 동정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. Phenol 물질 중 flavonoids를 분리하여 동정한 결과 kaempferide-7-o-glucoside 등이었으며, 이 성분 외에도 다른 물질도 동정 중에 있다. 한편 청갓김치보다 적갓 김치의 항산화성이 더 높았으므로 적갓김치의 발효특성, 항산화활성, 항산화 특성을 살펴본 바 적갓에서 독특하게 함유하는 anthocyanin 색소(CAP)가 중요한 역할을 하였다. CAP는 유리라디칼 소거능도 높을 뿐만 아니라 lipoxygenase 및 xanthine oxidase 활성을 저하시키는 특성도 높았다. 이러한 anthocyanin 성분을 계통분리하여 기기분석 등으로 동정한 결과 주성분은 P1 [peonidin 3-O-(6-O-p-coumaryl- α -L-rhamnopyranoside)-5-O- β -D-glucopyranoside] 등이며 P3-P5의 세물질을 현재 동정중에 있다. 따라서 갓김치에 함유하는 항산화물질은 극히 다양하며 결과적으로 광범위한 물질의 종합적인 역할에 의하여 높은 항산화성을 나타낸다고 판단되었다.

4. 항산화 향노화 김치의 개발 및 품질개선

주재료(청갓 및 적갓)의 조합과 부재료(고춧가루, 생강, 마늘, 파 등)의 조합 그리고 특수 부재료로 항산화성이 있다고 알려진 더덕, 우영, 청각 등의 조합에 대하여 살펴보았다. 그리고 계절별 갓의 특성도 검토하였다. 또한 갓김치 담금법 개선을 위하여 기존의 담금법 및 관능성, 발효 특성을 검토하고 레시피에 대한 일련의 연구결

과 1차 갓김치 기본 레시피를 선정하였으며 여기에 일정 수준의 특수부재료를 필요에 따라 첨가하도록 하였다. 1차 갓김치 기본 레시피는 신선한 갓(1000)을 기준으로 하여 파(50), 마늘(25), 생강(7), 고춧가루(80), 멸치액젓(110), 쌀풀(80), 설탕(9)으로 하되 최종 식염량은 2.5% 이하로 하고 있다. 그리고 이때 특수부재료서 더덕(2) 및 청각(2)의 조합을 권장하도록 하였다. 그리고 이의 산업화에 대한 결과는 제9장에서 살펴보기로 한다.

제 5 절 참고문헌

1. Pratt, D.E. and Birac, P.M. : Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, 44, 1720 (1979)
2. 이승교, 김화자 : 절임조건별 배추에 의한 김치의 숙성 중 riboflavin과 ascorbic acid의 함량 변화. *한국영양식량학회지*, 1(1), 27-32(1985)
3. Gross, J. : Pigments in vegetables : Chlorophylls and carotenoids. An AVI Book, New York(1991)
4. Lichtenthaler, H. K. : Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods. Enzymol.* 148, 350(1987)
5. 김우정, 구경형, 조한욱 : 김치의 절임 및 숙성 과정 중 물리적 성질의 변화. *한국식품과학회지*, 20, 483(1988)
6. 박경신, 한복려, 정길자, 한정혜, 조명숙 : 맛김치, 김장김치. 효성출판사, 서울 (1992)
7. 장경숙 : 배추김치 부재료 혼합의 모델화와 품질. *동아시아식생활학회지*, 4, 147, (1994)
8. 노홍균, 이신호, 김순동 : 부재료가 배추김치 숙성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, 24, 642 (1995)
9. 유태중, 정동효 : 김치의 공업적 생산을 위한 공업 표준화에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 6, 116 (1974)
10. 신호선 : 식품분석 -이론과 실험-. 신광출판사, 서울 (1983)
11. 이철우, 고창영, 하덕모 : 김치발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리젖산균의 동정. *한국산업미생물학회지*, 20, 102 (1992)
12. 이명기, 박완수, 강국희 : 김치에서 젖산균의 선발 및 계수를 위한 선택배지. *한국식품영양과학회지*, 25(5), 754 (1996)
13. Stripe, F. and Della, C. : The regulation of rat liver xanthine oxidase conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase(Type D) to oxidase(Type O). *J. Biol. Chem.*, 244, 3855 (1969)

14. 강성구, 성낙계, 김용두, 이재근, 송보현, 김영환, 박석규 : 갖의 에탄올 추출물이 생물생육에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 23, 1014 (1994)
15. Farag, R. S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G.S.A. : Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. J. Am. Oil Chem. Soc., 66, 792 (1989)
16. Cheigh, H. S. Yu, R. N. Choi, H. J. and Jun, H. K. : Ascorbic Acid by Microorganisms in Kimchi Fermentation Process. J. Food Sci. Nutr., 1(1), 37 (1996)
17. Hammerschmidt, P. A. and Pratt, D. E. : Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci., 43, 556 (1978)
18. White, R. C., Jones, I. D. and Eleanor, G. : Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheopjytins and pheophobides in plant material. J. Food Sci., 28, 431 (1963)
19. Tarladgis, B. G., Watts, B. M. and Yunathan, M. T. : A distillation method for the quantitative determination of malonealdehyde in ranced foods. J. Am. Oil Chem., 37, 44 (1960)
20. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : A rapid method of total lipids extration and purification. Canadian J. Biochem and Physiology, 37, 911 (1959)
21. Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 119 (1958)
22. Sato, M., Iguchi, N. and Murata, T. : Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. I. Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe²⁺ and L-ascorbic acid. Yakugaku Zasshi, 97(3), 268(1977)
23. Sato, M., Imai, K. and Murata, T. : Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. III. The antioxidative activities of the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. Yakugaku Zasshi, 100(5), 580(1980)
24. Sato, M., Fujiura, H., Imai, K. and Murata, T. : Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IV. The antioxidative action of copper chlorins. Yakugaku Zasshi, 100(9), 941(1980)
25. 홍정일, 권미향, 나경수, 성하진, 양한철 : 냉이(Capsella bursa-pastoris)에탄올 추출물의 유리라디칼 소거 및 Xanthine oxidase 저해활성. 한국농화학회지, 38(6), 590(1995)
26. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M. :

- Inhibition of Xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2173(1985)
27. 김혜경 : 생체모델 시스템에 있어서 필수지방산, 토코페놀 및 카로티노이드의 co-oxidation에 대한 lipoxygenase의 영향. 부산대학교 박사학위논문 (1990)
 28. Bergmeyer, H. U. : *Methods of enzymatic analysis*. Academic press, New York, 483 (1974)
 29. 황지숙 : *Penicillium sp. L-242H가 생산하는 Lipoxygenase inhibitor에 관한 연구*. 부산대학교 석사학위논문 (1988)
 30. 春日敦子 등 : 食用植物の抗酸化性. *日本食品工業學會誌*, **35**(12), 828 (1988)
 31. Vekiari, S. A., Oreopoulou, V., Tzia, C. and Thmopoulos, C. D. : Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**(5), 483 (1993)
 32. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K. : Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Nutrition and Food (Japan)*, **19**(3), 60 (1966)
 33. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. : Antioxidative effect the constituent of rosemary and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(3), 521 (1983)
 34. 식품공전, 한국식품공업협회(1997)
 35. Converse, C. A. and Skinner, R. E : *Lipoprotein analysis: A practical approach*. Oxford University Press, p11(1992)
 36. 이연재 외 3명 : 붉나무 순차 용매 추출물의 항산화 효과 비교 : 한국식품과학회지, 1993, **25**(6), 677-682
 37. 김미애 : 부산대학교 대학원 이학석사 학위논문, 1994
 38. 이정희, 이서래 : 식물성 식품 중 페놀성 물질의 함량분석. 한국식품과학회지, 1994, **26**(3), 310-316
 39. Patricia A. Hammerschmidt and Dan E. Pratt : Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.* 1978, **43**, 556-559
 40. 정태영 : 건조 토마토의 비타민 C, 페놀산 및 유기산에 관하여. 부산대학교 가정대학 연구보고, 1988, **14**, 25-32
 41. 이주원, 신호선 : 동결건조 커피의 순차용매 분획별 특성과 항산화 효과. 한국식품과학회지, 1996, **28**(1), 109-116
 42. Sook-Im Mun, Hong-Soo Ryu, Hee-Jung Lee and Jae-Sue Choi : Further Screening for Antioxidant Activity of Vegetable Plants and Its Active Principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(3), 466-471(1994)

43. 박재한 외 4명 ; 식용 해조류에서 항산화 물질의 분리 ; 한국식품과학회지 , 1991, 23(3), 256-261
44. 지옥화, 양차범 : 방아 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지. 28(6), 1157-1163(1996)
45. 김현구 외 4명 ; 국내산 생약 추출물의 항산화 효과 및 생리활성 ; 한국식품과학회지, 1995, 27(1), 80-85
46. 최홍식, 이정수, Free radical scavenger로서의 plant phenols의 특성과 항산화 활성, 생명과학, 4(1), 11(1994)
47. Larson, R. A., The antioxidant of higher plant, *Phytochemistry*, 27, 969(1988)
48. Dugan, L. R., Natural antioxidants in Autoxidant in Food and Biological Systems (M. G. Simic and M. Karel, eds), Plenum Press, New York, 261(1980)
49. 최홍식, 이창용, Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성. 한국영양식량학회지, 22,(2), 246(1993)
50. Kinsella, J. E., Frankel, B. G., and Kanner, J., Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technology*, 85(1993)
51. Nose, M., and Fujino, N., Antioxidant activities of some vegetable foods and active component of avocado epicarp, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29(9), 507(1982)
52. Neito, S., Garrido, A., Sanbueza, J., and Valenzuela, A., Flavonoids as stabilizers of fish oil., *J. A. O. C. S.*, 70, 773(1993)
53. Hahm, T. S., King, D. L., and Min, D. B., Food Antioxidants, *Food and Biotechnology*, 2(1), 1(1993)
54. 문갑순, 최홍식 : 우육지방질의 산화에 미치는 간장의 항산화작용에 관한 연구. 한국식품과학회지, 18(4), 313(1986)

제6장 미용증진을 위한 기능성 김치무리의 개발

제 1 절 서설

피부는 신체의 외부 표면을 덮고 있는 조직으로 물리적 화학적 자극으로부터 신체를 보호해 주는 동시에 체온조절, 배설작용, 분비작용 등의 기능을 수행하는 생명유지에 없어서는 안 될 중요한 기관이다. 이러한 피부는 신체의 가장 바깥부분에 위치하고 있어 내·외적인 자극에 의해 손상을 받기 쉽기 때문에 이에 따른 형태학적인 변화를 용이하게 관찰할 수 있는 조직이다. 임상적으로도 개체가 나이가 들어감에 따라 피부에 주름이 증가하고 탄력성의 감소, 표피 부속기관의 기능 감소에 의한 피부 건조와 각화현상의 증가 등 노화 현상을 잘 표현하는 조직이라 할 수 있다(Champion 1992).

김치류는 항산화효과가 큰 여러 물질들이 함유되어 있고 우리 국민들이 일상식으로 가장 많이 섭취하는 채소류이므로 활성산소에 의한 인체 산화를 억제해 줄 것으로 기대된다. 특히 일본에서 김치가 미용에 좋은 식품이라 하여 젊은 여성들에게 인기가 높다고 한다.

본 연구에서는 한국인이 보편적으로 많이 섭취하고 있는 배추김치, 갓김치 그리고 부추김치의 세 종류의 김치를 선정하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제 효과를 살펴보았다. 먼저 김치와 김치 재료 중 피부노화를 억제시키는 효과가 있을 것으로 예상되는 항산화 성분인 chlorophyll, carotenoids, 총 비타민 C 및 페놀 화합물의 함량을 분석하였으며, 피부미용 관련 무기질들의 함량을 측정하였다. 특히 김치의 피부 산화독성 완화 효과를 규명하기 위하여 피부세포인 Keratinocyte와 fibroblast에 paraquat와 과산화수소로 산화적 스트레스를 가해 김치 및 김치재료들의 세포독성 완화효과를 살펴보았다.

그리고 세 종류의 김치를 각각 식이에 10%씩 첨가하여 hairless mouse에 16주간 공급하였을 때 피부의 표피층과 진피층에 미치는 김치 식이의 영향을 살펴보고 그 변화를 관찰하였다. 또한 사육 20주 후 hairless mouse의 간과 소기관에서 활성산소 농도를 비교하였으며, 간과 피부의 균질액에 대해 자외선을 조사한 후 광산화 억제 효과를 측정하였다.

피부노화 억제에 활성이 있는 물질을 찾기 위하여 각 김치김치를 종류별로 용매 분획하여 용매 획분 중의 항산화 물질의 함량을 측정하고 항산화성과 유리기소거능을 비교하였다. 또한 피부 균질액에 김치 용매획분을 일정농도 첨가하여 자외선을 조사한 후 광산화 억제효과를 살펴보고, 용매별 획분을 크림에 첨가하여 hairless mouse의 피부에 도포한 후 자외선 조사에 의한 홍반생성 억제능을 살펴보았다. 갓김치, 배추김치 그리고 부추김치 세 종류를 선정하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제 효과를 살펴본 결과 갓김치가 가장 우수한 효과를 나타내었다.

이에 맛과 기능이 증진된 김치를 개발하기 위하여 갓김치의 공정개성과 재료 물질의 강화연구, 상품화된 맛 및 보존성 연구를 수행하였다.

본 연구를 통해 김치식이의 피부노화 억제 효과를 과학적으로 규명할 수 있다면 우리 식생활의 우수성을 세계적으로 밝힐 수 있고 우리나라민들의 김치에 대한 자부심을 고양할 수 있을 것이다. 따라서 현대의 신세대 어린이들이나 젊은이들이 점차 기피해 가고 있는 우리나라 전통 식생활을 지켜가는데에도 일조할 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 우리 김치의 우수성을 규명함으로써 외국인들의 우리 김치에 대한 관심을 고양시키고 김치의 소비촉진과 수출촉진을 이룰 수 있을 것이다.

본 연구를 통하여 피부미용효과가 극대화된 김치레시피를 개발함으로써 국민 건강에 좋은 좌표를 제시할 수 있고 기능성을 높이므로써 우리 농산물의 부가가치를 더 높일 수 있고 아울러 김치의 소비 증대를 통해 농민들의 소득 증대에도 기여할 수 있을 것이다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 김치 원부재료

본 실험에서 세포실험을 위해 제조한 김치는 문 등(문갑순 등, 1998)이 발굴한 명가 김치 중의 하나의 레시피를 모델로 하였다. 배추김치의 구성비는 절인 배추 1Kg에 대하여 고춧가루 50g, 마늘 15g, 생강 5g, 멸치액젓 0.5C, 배 45g, 무 60g, 부추 10g, 찹쌀 0.5TBSP과 같이 조정하여 결정하였다. 배추는 계절(여름)배추로 김해 삼방 시장에서 구입하였으며, 부재료로 마늘(서산), 생강(서산), 배(니주), 고춧가루(안동농협)를 각각 사용하였다. 배추를 1/4포기로 절단한 후 10% 소금물에 20시간(실내 온도 10℃)절인 후 3회 씻고 3시간 자연 탈수시켰다. 양념은 절임 배추무게의 18%가 되도록 버무려 8℃ 냉장고에 보관하였다.

나. 김치재료의 선정 및 시료김치

Hairless mouse를 이용한 피부미용효과 측정을 위한 김치는 배추김치, 갓김치, 부추김치를 사용하였고 김치에 사용된 배추(가락신 1호), 갓(돌산갓), 부추(경남 대동), 고춧가루(태양초), 멸치액젓(청정원), 소금(천일염), 설탕(정제당), 찹쌀풀, 마늘, 무, 파 등은 부전시장에서 구입하였다. 배추김치, 갓김치는 부산대학교 김치연구소에서 표준화한 레시피를 사용하였고 부추김치는 인제대학교 식품과학연구소에서 표준화한 김치의 재료배합비를 사용하였으며 각 김치들의 재료 배합비는 Table 16과 같다.

배추김치의 제조 방법은 10% 염도에서 10시간 절인 후 흐르는 물에 3회 수세하고

3시간 탈수하였다. 양념에 버무린 다음 15℃에서 4일간 저장하였다. 이때 배추김치의 pH는 4.21, 산도는 0.74%, 환원당 함량은 1.4mg%였으며 최종 염농도는 2.5%였다.

갓김치의 제조 방법은 15% 염도에서 1시간 30분간 절임하였으며, 30분간 탈염시킨 다음 5회 수세하여 30분 탈수한 후 양념을 버무린 다음 포기로 말아 20℃에서 7일간 저장하였다. 이때 갓김치의 pH는 4.10, 산도는 0.8%, 환원당 함량은 1.6mg%였으며 최종 염농도는 3.0%였다.

Table 16. Recipe for experimental kimchi preparation

Ingredients	Korean cabbage kimchi ¹⁾ (g)	Mustard leaf kimchi ²⁾ (g)	Leek kimchi ³⁾ (g)
Brined Korean cabbage	100.0	-	-
Brined mustard leaf	-	100.0	-
Brined leek	-	-	100.0
Red pepper powder	3.5	14.3	17.2
Garlic	1.4	4.2	4.9
Ginger	0.6	2.8	3.2
Fermented anchovy	2.2	14.3	16.5
sauce			
Glutinous rice paste	-	10.7	13.0
Sugar	1.0	-	2.0
Radish	13.0	-	-
Green onion	2.0	-	-

¹⁾Korean cabbage : *Brassica pekiinensis*

²⁾Mustard leaf : *Brassica juncea*

³⁾Leek : *Allium tuberosum* Rottler Liliaceae

부추김치는 부추를 세척한 후 멸치젓에 30분 절이고, 3회 수세하고, 30분 동안 탈수 시켰다. 양념을 버무린 후 15℃에서 1주일간 저장하였다. 부추김치의 pH는 4.27, 산도는 0.76%, 환원당 함량은 1.3mg%였으며 최종 염농도는 2.3%였다. 김치의 pH와 총산의 함량은 종류에 따라 다르게 나타나나 맛이 가장 좋은 적숙기의 pH는 4.0~4.2, 총산의 함량은 0.65% 내외이며, 돌산 갓김치가 가장 맛있는 시기는 pH는 4.61~4.82, 국물이 pH 4.2~4.22이며 이때가 적숙기라고 하였다. 따라서 본 실험에 사용된 시료김치는 맛이 가장 좋은 시기의 pH와 산도에 일치하는 적숙기의 김치였으며, 제조한 김치는 동결건조 전문업체인 슈펙스(포항소재)에서 동결건조하여 시료로 사용하였다.

다. 사용 세포주

본 실험에 사용한 피부세포는 표피의 주요 세포인 Keratinocyte(A431 cell line, epidermoid carcinoma, human)와 진피의 주요 세포인 fibroblast (CCD-986SK, skin, normal control, human)를 한국암세포주은행에서 분양 받아 사용하였다.

라. 시약

세포배양 실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle medium(D-MEM)은 Gibco BRL(NY, USA)의 것을, paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride), 과산화수소(H₂O₂) 등의 일반시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며 용액제조에 사용한 물은 증류수를 탈이온하여 사용하였다.

광학현미경용 염색을 위한 시약인 van Gieson's 용액, alcian blue, DAKO LSAB Kit, PAP(Peroxidase-Anti-Peroxidase) Kit, glutaraldehyde, osmium tetroxide 등은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였다. 식이섭취 분석을 위한 amylase, protease, amyloglucosidase 효소들과 지질 및 단백질 산화 실험을 위한 TBA (thiobarbituric acid), DNPH(2,4-dinitrophenylhydrazine), 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP) 등은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 반정제용 식이에 사용된 casein, choline bitartrate, methione은 Sigma Chemical Co.(USA), vitamin mixture, mineral mixture, cellulose 등은 ICN Biochemical Co.(USA)제품을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 김치 원부재료의 추출

김치 추출물은 냉장고(8℃)에서 0, 1, 2, 3, 4, 5주간 숙성시킨 김치시료를 mixer로 분쇄하여 그 즙을 원심분리한 후 상등액을 0.22 μ m filter로 여과하여 사용하였다. 김치 재료 추출물의 제조는 김치의 재료인 배추, 무, 부추, 마늘, 생강, 양파, 파를 mixer로 분쇄하여 그 즙을 원심분리한 후 상등액을 취해 0.22 μ m filter로 여과하여 사용하였다.

나. 세포배양 및 세포생육 억제 활성

피부의 주요 세포인 Keratinocyte와 fibroblast에 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유하는 D-MEM배지를 사용하여 plastic culture dish(75cm²)당 5×10⁵cells 씩 plating하여 6-7일간 배양하였으며, 96-well plate에서는 keratinocyte에는 well당 200 μ l의 배지에 10⁴cells씩, fibroblast는 well당 200 μ l의 배지에 5×10³cells씩 접종

하여 6-7일간 배양하였다. 세포는 1회용 disposable plastic plate에서 monolayer로 자라도록 하였으며, 3일마다 배지를 교환하여 37°C에서 CO₂ 5%로 배양하였다.

김치 및 김치 재료 추출물의 과산화수소와 paraquat(PQ)에 대한 세포사멸 억제효과를 장기간 시료에 노출하였을 때와 단기간 시료에 노출하였을 때로 나누어 측정하였다. 장기간 시료를 노출한 경우는 위에서 측정하여 결정한 김치 추출물의 최대 투여 농도를 세포 분주 후 24시간 뒤에 투여하고 다시 24시간 뒤에 과산화수소와 paraquat를 농도별로 투여하여 4일간 배양한 후 산화적 스트레스에 대한 김치 추출물의 세포사멸 억제효과를 배양 종결 시점에서 MTT assay를 사용하여 측정하였다. 단기간 시료에 노출한 경우는 세포분주 후 4일간 배양한 다음 시료를 결정된 최대투여농도로 투여한 후 24시간 뒤에 과산화수소와 paraquat를 농도별로 투여하고 그 뒤 24시간 뒤에 MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 김치 재료 추출물은 김치 재료를 추출하여 김치에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

다. 동물실험

1) Hairless mouse를 이용한 피부미용효과

가) 식이 조제

시료 김치를 동결건조한 후 수분, 조지방, 조단백질, 조회분을 상법에 따라 각각 분석하고 총식이섬유(TDF) 함량은 Prosky 등에 의해 수정 개발된 AOAC 법(213)으로 측정하였다. 시료로 사용한 동결건조김치의 일반성분은 Table 2와 같다. 조단백질은 갓김치군에서 27.65%로 가장 높게 나타났으며, 조회분은 배추김치군에서 27.77%로 가장 높게 나타났다. 조지방과 총식이섬유량은 부추김치군에서 각각 6.67%, 33.2%로 가장 높게 나타났다. 이들의 일반성분을 고려하여 에너지 수준이 동일하게 식이를 조제하였다(Table 18). 제조한 식이는 고품으로 만들어 60°C 열풍건조기(Vision Scientific, KMC-1202D4N)로 건조시켜 냉동보관하면서 공급하였다.

Table 17. Proximate composition of various kinds of freeze-dried *kimchi*

	Korean cabbage kimchi	Mustard leaf kimchi	Leek kimchi
Moisture	13.6±0.2	12.1±0.1	6.6±0.2
Crude protein	25.4±0.3	27.7±0.2	26.9±0.3
Crude fat	4.2±0.2	4.6±0.3	6.7±0.3
Crude ash	27.8±0.3	22.1±0.3	16.5±0.4
Total dietary Fiber	22.6±0.4	21.9±0.2	33.2±0.3

Table 18. Composition of experimental diets for the animal study(%)

Ingredients	Control	Korean cabbage <i>kimchi</i>	Mustard leaf <i>kimchi</i>	Leek <i>kimchi</i>
Casein	20.00	17.46	17.24	17.31
Corn starch	65.00	60.22	60.41	61.68
Corn oil	5.00	4.58	4.54	4.33
Cellulose	5.00	2.74	2.81	1.68
Choline bitartrate	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamine mix.	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix.	3.50	3.50	3.50	3.50
D,L-Methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Korean cabbage <i>kimchi</i> powder	-	10.00	-	-
Mustard leaf <i>kimchi</i> powder	-	-	10.00	-
Leek <i>kimchi</i> powder	-	-	-	10.00

¹⁾Control diet was prepared following AIN-76 guidelines for mouse experiment.

Experimental diet was prepared with freeze-dried *kimchi* as shown in Table 2. In order to meet the equal energy and fiber level among diets, carbohydrate, protein, lipid and fiber contents of freeze-dried *kimchi* were analyzed and calculated.

나) 동물 사육

실험동물은 20g 내외의 수컷 SKH-1 hairless mouse를 Charles river co. (USA)로부터 분주 받아 일정한 조건(온도: 20±2℃, 습도 : 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 기본 식이로 4주간 적응시킨 후 무작위(completely randomized design)로 6마리씩 4군으로 나누어 각각 대조군, 배추김치군, 갓김치군, 부추김치군으로 하였다. 실험기간 중 물과 식이는 자유급식하였으며 체중은 1주일마다 측정하였다. 실험 식이를 16주간 공급 후 피부생검을 하고, 20주 후에 dry ice로 마취한 후 장기들을 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하고 중량을 측정한 다음 액체질소에 담근 후 -70℃에서 냉동 보관하였다.

다) 피부조직의 처리 및 염색

(1) 피부생검

김치를 섭취한 hairless mouse 피부의 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 hairless mouse를 ketamain으로 전신 마취시키고 lidocaine 으로 어깨부위를 국소마취한 다음 직경 4mm biopsy punch로 생검한 후 그 부위를 봉합사로 봉합하였다.

(2) 조직표본 제작

(가) 광학현미경용 조직표본 제작

생검한 피부를 10% buffered formalin에서 고정한 다음 80%, 95% ethanol에서 각 1시간씩 2회 탈수시키고 100% ethanol로 각 3회, 1시간씩 탈수시켰다. 100% ethanol : xylene(1:1)에서 1시간 두고 조직이 과도하게 단단해지지 않도록 하기 위해 cedar oil(cedar oil I(2hr) → cedar oil II(2hr) → cedar oil III(1hr))에서 보관하였다. Paraffin으로 포매하여 (paraffin I(2hr) → paraffin II(2hr) → paraffin III(2hr) → paraffin IV(2hr) → paraffin V(vacuum, 2hr))으로 처리하여 광학현미경용 블록을 만들었다. Paraffin 블록은 microtome(Leica, USA)을 사용하여 4 μ m 두께로 잘라서 조직절편을 만들었다. 절편은 xylene(I, II)에서 각각 2분씩 처리하여 파라핀을 제거하고 100%(I, II), 95%, 90%, 70% ethanol에서 각각 2분씩 처리하고 증류수에서 함수시킨 후 염색하였다.

(나) 전자현미경용 조직표본 제작

생검한 피부를 1mm³ 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde(4 $^{\circ}$ C, 24hr)로 먼저 1차 고정을 하고 1% osmium tetroxide (4 $^{\circ}$ C, 2hr)로 2차 고정을 하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 7.2~7.4)로 세척한 후 ethanol 농도를 높여가면서(50% → 70% → 80% → 90% → 95% → 100%)탈수시켰다. Propylene oxide로 30분간 2회 치환시킨 후 propylene oxide : epon mixture(1~3hr)로 침투시키고, epon 812로 포매하여 37 $^{\circ}$ C EM oven에서 12시간 동안 열중합시켰다. Ultramicrotome(LKB, Nova, Sweden)을 이용하여 0.5~1 μ m두께로 semi-section한 후 toluidine blue로 단염색하고 광학현미경으로 관찰할 부위를 결정하여 trimming한 다음 60~90nm로 ultrathin section하였다. 절편을 200mesh copper grid에 section 부착시킨 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색을 하고 나서 electro-microscopy (JEM 1200 EX-II, JEOL, Japan)로 관찰하였다.

(다) 조직 염색

① H & E 염색

피부의 두께를 살펴보기 위하여 조직절편을 Gram's Iodine 용액에 일정시간 두고 수세한 다음 5% sodium thiosulfate로 처리한 후 함수시켰다. Harris' Hematoxylin 용액으로 염색한 후 수세하고 acidic alcohol에서 3-10회 재빨리 적셨다 뻤 후 현미경으로 검사하여 핵이 뚜렷하고 배경이 매우 밝은 색이 될 때까지 염색하였다. 염색한 절편은 수세한 후 ammonia water에서 절편이 밝은 청색이 될 때까지 적시고 수세한 다음 eosin 용액에서 2분간 둔 다음 과도한 eosin액이 제거될 때까지 탈수하고

xylene에서 청명하게 한 후 permount로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

② Van Gieson 염색

Van Gieson staining은 피부의 결합조직인 collagen의 변화를 관찰하기 위한 염색으로 Van Gieson's 용액은 1% aqueous acid fuchsin 2.5ml와 포화 picric acid 용액을 97.5ml을 섞어 만들어 이 용액으로 1~3분간 염색하였다.

③ PAS-Alcian blue 염색

Glycoprotein을 관찰하기 위해 조직절편을 3% acetic acid에서 3분간 매염시켰다. Alcian blue pH 2.5 용액에서 반응시킨 후 물로 수세하고, 1% periodic acid에서 산화시킨 후 다시 수세하였다. Shiff 용액으로 반응시킨 다음 0.5% sodium metabisulfite로 수세한 후 kernechtrot 용액으로 대조 염색하였다.

④ Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP) 염색

표피의 cytokeratin을 관찰하기 위하여 Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)면역염색을 하였다. 먼저 3% hydrogen peroxide 용액을 조직표본에 충분량 가한 다음 실온에서 5분간 방치한 후 tris buffer로 수세한 다음 5분간 두었다. 여과지로 buffer를 제거한 다음 blocking serum용액을 가한 후 20분간 방치하였다. Primary antibody 또는 negative control reagent를 가한 다음 20분 두고 link antibody를 가해 20분 방치한 후 PAP를 가해 염색하였다. 각 단계로 넘어가기 전 tris buffer로 수세하였다. Substrate mixture를 준비하기 위하여 buffer를 graduated test tube에 붓고 2ml의 buffer당 AEC 한방울을 가한 후 즉시 잘 섞은 다음 hydrogen peroxide를 한방울 가하여 다시 섞어두었다. 침전물이 형성될 경우 filter column을 내로 밀어 넣어서 graduated test tube로 제거하고, substrate solution을 가한 후 증류수로 세척하였다. 대조염색과정으로 slides를 Mayer's hematoxylin bath에 담가 두었다가 증류수로 세척한 후 ammonia수에 담가두었다. 흐르는 물로 세척한 후 liquid glycerol gelatin으로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

⑤ DAKO LSAB Kit 염색

Type IV collagen의 면역화학염색은 1차 항체로 DAKO type IV collagen 항체를 적용해서 DAKO LSAB Kit를 이용하여 염색하였다. 염색할 절편을 3% hydrogen peroxide로 반응시킨 뒤 증류수로 수세하고 tris-buffer에 둔 다음 PBS로 반응시키고 수세하는 과정 없이 바로 type IV collagen항체로 반응시키고 tris-buffer로 수세후 tris-bath에 두었다. 반응시킨 절편은 biotinylated anti-mouse immunoglobulins로 반응시킨 후 tris-buffer로 수세하였다. 발색 반응은 2ml의 substrate buffer액을 calibrated test tube에 넣고 각 buffer 2ml 마다 AEC chromogen액을 한 방울씩 첨가하고 혼합한 다음 buffer 2ml 마다 substrate hydrogen peroxide 용액을 한 방울씩 첨가하고 혼합하여 제조한 substrate-chromogen 용액으로 반응시켰다.

(㉔) 피부의 형태계측

광학현미경상의 나타난 결과의 형태계측은 Color Image Analysis; Image proplus ver 3.0(Mediacybernetics co.)를 사용하여 분석하였다.

라) 자외선조사에 대한 보호 효과 측정

(1) 자외선 조사

자외선 조사에 의한 김치의 광산화 억제 효과를 측정하기 위한 피부 균질액은 Kim 등의 방법에 따라 제조하였다. 즉 일정량의 피부조직을 10배 부피의 1.15% KCl 용액에 담근 상태에서 iris scissors로 세절하여 거의 젤 상태가 되도록 한 뒤 이 피부조직을 다시 glass homogenizer로 마쇄하여 균질액으로 만든 다음 800×g에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 피부조직 균질액으로 하였다. 이 용액 2ml를 직경 3cm인 petri dish에 부어 약 2mm 정도의 두께가 되게 균등하게 담고 UVB light가 장착되어 있는 자외선 조사기(NBC, Ohio, USA)를 이용하여 조사하였다. 1.0mW/sec의 조사량으로 30분 동안 조사하였으며 이때 자외선 등과 petri dish 사이의 거리는 약 15cm가 되도록 유지하였고 온도상승을 방지하기 위해 주위에 얼음주머니를 두고 조사시켰다.

(2) TBARS에 의한 지방산화의 측정

지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 사용하였다. 균질화시킨 시료 0.2ml와 8.1% SDS 0.2ml, 50% NaOH로 pH 3.5로 보정한 20% acetic acid 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml를 cap test tube에 넣고 증류수로 4ml이 되게 정용시켰다. 이 혼합용액을 95℃에서 60분간 반응시킨 다음 찬 물에서 완전히 냉각시킨 후 증류수 1ml와 n-butanol:pyridine(15:1, v/v) 5ml을 넣어 섞은 다음 원심분리 (4,000 rpm, 10 min)한 후 분리된 유기용매층을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 사용하였으며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다.

(3) Protein carbonyl value에 의한 단백질의 산화 측정

피부와 간균질액에서 protein carbonyl 함량은 Oliver 등의 방법에 준하여 DNPH (2,4-dinitrophenyl hydrazine)를 이용하여 측정하였다. 즉, 피부조직에 1.15% KCl을 넣어 균질액을 만든 후 800×g에서 10분간 원심분리한 후 Lowry 등의 방법으로 단백질 함량을 측정한 다음 그 양이 1mg이 되게 2개의 원추형 원심분리관에 넣었다. 여기에 동일 용량의 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 단백질을 침전시키고 10%의

TCA를 넣어 다시 한 번 더 침전시켰다. 이 중 한 시험관은 바탕시험용으로 2N-HCl을 넣고, 또 다른 한 시험관은 시험용으로 0.2% DNP를 함유한 2N-HCl을 가한 다음 25°C에서 1시간 방치하였다. 방치 후 20% TCA를 가하여 다시 단백질을 침전시키고 ethanol:ethylacetate (1:1, v/v) 혼합액으로 세척한 후 20mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 함유하는 6M guanidine-HCl 용액으로 용해시켜 370nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) 항산화효소계의 활성 측정

(1) Superoxide dismutase(SOD)활성의 측정

SOD(superoxide dismutase)활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 1.1mM diethylenetriamino- pentaaceticacid(DTPA)와 55.6mM trizma base를 혼합한 후, cacodylic acid를 사용하여 pH 8.2로 보정한 buffer 6ml에 간조직 0.1g을 가해 균질화하여 tube에 적당량 넣고 3,000rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 취하여 시료로서 사용하였다. Buffer 2.95ml에 시료 0.05ml을 혼합한 용액을 2.7ml 취하고 10mM HCl에 용해되어 있는 6mM pyrogallol(at 25°C) 0.3ml를 가하여 420nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 1 unit는 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양으로 하였다.

(2) Catalase활성의 측정

Aebi의 방법에 의해 50mM Na-K phosphate buffer(pH 7.0), 기질로 30mM H₂O₂용액과 시료액을 취해 240nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 30mM H₂O₂용액 대신에 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 1ml를 가하고 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성은 1분동안 1 μmol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

(3) Glutathione peroxidase(GSH-px)활성의 측정

GSH-px의 활성은 Lawrence와 Burk의 방법에 의해 측정하였다. 즉 효소 활성은 GSH-px가 H₂O₂를 제거하면서 소비된 GSH를 환원형으로 전환시키는데 필요한 NADPH의 양을 250mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.6ml, 10mM EDTA 0.3ml, 10mM Na₂S₂O₈ 0.3ml, 10mM GSH 0.3ml, 2mM NADPH 0.3ml, glutathione reductase(500 U/ml) 20 μl, 증류수 0.6ml를 이용하여 340nm에서 측정하였다. 이때 GSH-px 1 unit은 1분간 1 μmol NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다.

바) 활성산소종의 함량 측정

(1) 간 세포 소기관의 분리

일정량의 간을 칭량하여 10배의 1.15% KCl-10mM phosphate buffer with 5mM EDTA solution(pH 7.4)로 균질화 한 후 3,000rpm에서 10분동안 원심분리시켜 간 세포소기관을 분리하였다.

(2) Superoxide anion 함량 측정

간의 mitochondria에서 superoxide anion 함량은 Aust 등의 방법에 의해 측정하였다. 즉, sample 300 μ l에 0.3M phosphate buffer with 0.1mM EDTA (pH 7.4) 36ml과 3mM potassium cyanide 680 μ l, 0.1mM cytochrome C 4ml을 혼합한 mixed solution 2ml을 첨가하였다. 위의 용액을 잘 혼합한 후 550nm 흡광도에서 2분 동안 time scan을 실시하였다.

(3) Hydrogen peroxide 함량 측정

간의 microsome 중의 hydrogen peroxide 함량은 Philip 등에 의한 방법에 의해 측정하였다. 즉 400mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 400 μ l, 100mM MgCl₂ 200 μ l, 200mM nicotinamide 200 μ l, 50mM sodium azide 200 μ l, sample(0.5mg protein. vol.), H₂O를 시료에 첨가한 다음 60mM NADPH 200 μ l를 혼합하였다. 이 혼합액을 37°C에서 15분 동안 incubation한 후 1.0ml을 취하여 1.2M TCA 1.0ml을 첨가하였다. 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.0ml 취한 다음 10mM ferrous ammonium sulfate 0.2ml, 2.5M KSCN 0.1ml을 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하였다. 480nm에서 흡광도를 측정하여 400 μ M H₂O₂ 표준곡선을 이용하여 함량을 계산하였다.

(4) Hydroxyl radical 함량 측정

Hydroxyl radical 함량은 Barry 등에 의한 방법으로 측정하였다. 즉 control tube 67 μ l와 incubation tube 34.8 μ l에 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 33.3 μ l, 10mM sodium azide 33.3 μ l, 7mM deoxyribose 33.3 μ l, 5mM ferrous ammonium sulfate 33.3 μ l, 0.54M NaCl 33.3 μ l, 증류수 185 μ l를 혼합하였다. 37°C에서 15min동안 incubation 시킨 후 8.1% SDS 75 μ l, 20% acetic acid 500 μ l, 증류수 25 μ l을 첨가하였다. 다음 각 시험관에 1.2% TBA 333 μ l을 넣어 vortex 한 후 30분 동안 가열한 후 실온으로 냉각시켰다. 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리 시킨 후 532nm에서 흡광도를 측정하여 TEP solution 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

(5) 단백질함량의 측정

Lowry 등의 방법에 의해 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

사) 김치의 용매별 분획 및 획분의 항산화성 측정

(1) 용매 분획

김치 메탄올 추출물은 김치분말 중량의 10배의 메탄올을 가하여 24시간씩 stirring 하면서 3회 반복 추출하여 여과액을 합하여 rotary evaporator에서 농축하고 동결건조하여 일정 농도의 메탄올 용액을 조제하여 항산화성을 검토하기 위한 시료로 사용하였다. 피부도포용 시료의 용매별 추출물의 분획은 먼저 동결건조한 김치 분말 1kg에 10배의 메탄올을 가해 24시간씩 stirring하면서 3회 반복 추출하고 여액을 합해 40°C에서 감압농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물을 증류수에 현탁한 후 hexane을 가하여 분획한 후 감압농축하고 그 추출물을 chloroform, ethylacetate, butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획하였다. 각 분획물은 45°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 완전히 제거, 농축한 후 시료로 사용하였다.

(2) 용매분획물의 항산화 효과 및 수소공여성 측정

(가) 과산화물가의 측정

김치 methanol 추출물들의 항산화 효과의 측정은 Hayase와 Kato의 방법에 따라 과산화물가를 측정하였다. 즉 50ml cap test tube에 linoleic acid 1g을 넣고 ethanol 20ml에 녹이고 0.2M phosphate buffer(pH 7.0) 25ml과 일정농도의 김치추출물 용액을 1ml을 넣어 50°C incubator에서 6일 동안 incubation시키면서 경시적으로 POV를 측정하였다. 해당 반응시간 동안 보관한 용액을 300ml 분액 여두에 옮긴 다음 적량의 물과 식염 2g을 가한 후 chloroform 25ml을 가해 하층을 삼각플라스크에 모으고 acetic acid 25ml과 포화 KI 1ml을 가해 1분간 흔들여 준 후 암소에서 10분간 방치하였다. 여기에 50ml 증류수를 가하고 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01N-Na₂S₂O₃으로 적정하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$POV(\text{meq/kg}) = S \times N \times 10 / \text{linoleic acid의 중량(g)}$$

$$S : 0.01\text{N-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{의 소비량(ml)}$$

$$N : 0.01\text{N-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{의 규정농도}$$

(나) DPPH에 의한 측정

용매별 획분의 유효기 소거능은 DPPH법에 의해 측정하였다. α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH)16mg을 100ml ethanol를 혼합하여 Whatman filter paper No.2로 여과하여 이 여액 5ml에 일정농도의 시료용액 0.1ml을 혼합한 후 528nm에서 흡광

도 감소를 기준으로 수소공여성을 측정하였다.

아) 김치 중의 피부노화 관련 성분 분석

(1) Chlorophyll 함량 측정

생 시료와 동결건조 김치와 김치의 용매별 추출물의 chlorophyll 함량은 White 등의 방법에 의해 측정하였다. 시료 20g을 blender에 넣고 calcium carbonate 0.1g과 acetone 200ml을 가해 4분간 마쇄한 후, glass filter를 통해 흡인여과 하였다. 색소를 완전히 추출하기 위해 85% acetone으로 여러 번 씻어주고 여과액을 500ml 정량플라스크에 옮겨 85% acetone으로 정량하였다. Acetone 추출액 25ml을 분액 여두로 옮기고 에테르 30ml을 첨가하여 흔들여 준 다음 5% sodium sulfate 용액 100ml을 가해 ether층으로 색소를 옮겼다. 아래층을 다른 분액 여두로 옮겨 색이 없어질 때까지 에테르로 재 추출하였다. 에테르 추출액을 모두 모아서 5% sodium sulfate 용액으로 여러 번 씻어 acetone을 완전히 제거한 후 무수 Na_2SO_4 를 첨가하여 건조시켜 시료로 하였다. chlorophyll a와 b는 최대흡수파장인 660.0nm와 642.5nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

(2) Carotenoids 함량 측정

생 시료와 동결건조 김치와 김치의 용매별 추출물의 carotenoids 함량은 생 시료의 경우 ethanol로 추출 여과하여 acetone : n-hexane(1:1)용매로 추출하여 농축시킨 후 농축 물에 n-hexane으로 용해시켜 증류수로 3회 세척하고 상징액에 과포화 KOH/ethanol로 검화하여 일정용액으로 하여 448nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 총 비타민 C 함량 측정

총 비타민 C의 함량은 DNP법에 의해 측정하였다. 마쇄한 김치시료에 5% metaphosphoric acid 용액을 가하고 여과한 후 여과액 2ml씩을 시험관에 취하여 oxidation, osazone을 형성하고 osazone 용해의 순서로 조작한 후 spectrophotometer를 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정하여 비색정량하였다.

(4) 총 페놀 함량 측정

동결건조 김치와 용매별 김치 추출물의 총 페놀함량은 Hammerschmidt의 방법에 의해 측정하였다. 동결건조 김치분말 5g을 50ml 메탄올에 하루동안 침지시킨 후 사용한 methanol과 함께 시료를 2분 동안 균질화시키고 항온수조에서 5분 동안 끓인 다음 Whatman filter paper No.42 여과지로 여과하고 그 잔여물을 뜨거운 메탄올로 씻어 계속 여과하여 불용성 잔여물을 제거하였다. 이 여과물을 모아 회전진공증발기에서 농축시킨 다음 메탄올에 녹여 100ml로 정량하였다. 이 여과액 0.1ml에 Na_2CO_3 용액

2.0ml에 녹이고 2분후 50% Folin-Ciocalteau 용액 0.1ml을 가하여 실온에서 30분간 방치후 750nm에서 흡광도를 측정하고, 기준물질로 chlorogenic acid를 사용하여 함량을 계산하였다.

(5) 무기질 분석

김치 중의 K, Mg, Ca, P, S, Cu 함량은 ICP/AES (Inductively Coupled Plasma/Atomic Emission Spectrometer : Shimadzu ICP-III model, Japan)를 이용하여 분석하였으며, Se 함량은 ICP/MS (Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometer: Fisons PQ3 STE model, UK)로 분석하였다.

자) 김치용매획분의 피부도포 및 광산화 효과 측정

(1) 김치 첨가 크림의 제조

피부도포 실험을 위한 일반적인 크림의 성분은 Table 19와 같다. 크림의 제조방법은 part A의 원료를 모두 500ml 비이커에 넣고, 80~82℃까지 가열, 용해한 다음 200rpm에서 유화시키고, part A의 원료가 완전히 용해되면 Part B의 원료를 넣고 200rpm으로 유화시킨 후 78~80℃로 맞추었다. Part C의 원료를 25℃, 1400rpm에서 30분간 혼합, 분산한 다음 part D의 원료 100ml를 혼합한 후 65~70℃까지 가열시켜 용해하였다. Part A와 B를 혼합한 것에 part C, D를 천천히 넣으면서 78~80℃, 20rpm에서 유화시킨 다음 20rpm에서 약 80~90분간 교반하고, Part E의 원료와 Part F의 원료를 65℃에서 천천히 투입한 후 3000rpm으로 1분간 유화시킨 후 27℃로 냉각시켰다. 분획한 김치 추출물들을 위와 같이 제조한 크림에 0.02g/g로 첨가하여 도포용 크림을 제조하였다.

(2) 피부도포 실험

제조한 크림을 hairless mouse의 등에 도포하고 UVB(NBC, Ohio, USA)를 조사하면서 홍반 여부를 관찰하였다. 피부색은 chromameter (Minolta CT-310, Japan)로 측정하였으며, 홍반의 증가정도는 초기값과 비교하여 erythema relative index로 평가하였다.

$$\text{Erythema relative index(\%)} = \frac{\text{after value} - \text{before value}}{\text{before value}} \times 100$$

차) 통계 처리

실험결과의 통계처리는 SPSS program을 이용하여 분석하여 Mean±S.D.으로 표시하였으며, 각 군간 평균치의 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 검증한 다음 p<0.05수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검정하였다.

Table 19. Basic compositions of cream for skin test

Part	INCI Name	Trade Name	Con. (%)
A	Microcrystalline Wax	Multi-Wax W-44	2.00
	Bees Wax	Bees Wax	3.00
	Cetearyl Alcohol	Lanetto-o	1.20
	Stearic Acid	Stearic acid	1.00
	Vacarine	Vacarine	4.00
	Propylparaben	Propylparaben	0.10
	Octyldodecanol	Eutanol-G	3.00
	Caprylic/Capric triglyceride	Lexol GT865	3.00
	Glycol Mono Stearate	GMS-105	2.00
	Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate	Arlacel-165	1.00
	-	I.P.M	5.00
	Dimethicone	Silicon oil	0.30
Mineral Oil	Drakeol-7	38.00	
B	PEG-40 Stearate	MYRJ-52S	2.60
	Sorbitan Sesquioleate	Arlacel-83	0.80
C	-	Distilled water	24.00
	Disodium EDTA	EDTA-2Na	0.02
	Xanthan Gum	Keltrol F	0.04
	Magnesium Aluminum Silicate	Veegum HV	0.40
D	-	Distilled water	2.08
	Propylene Glycol	P.G	4.00
	Glycerine	Glycerine	1.00
	TriEtOHamine	TEA	0.30
	Methylparaben	Mrthylparaben	0.25
	Allantoin	Allatoin	0.01
E	-	Distilled water	0.30
	Imidazolidinyl Urea	Germall 115	0.30
	-	Yellow #4	0.00016
	-	Yellow #5	0.00008
F	-	Perfume	0.30
Total			100.00

제 3 절 결과 및 고찰

1. 김치 추출물의 활성산소에 대한 독성 완화효과

숙성시기를 달리한 김치(0주~5주) 추출물들의 keratinocyte에 대한 세포독성 실험 결과 숙성 2주김치가 가장 억제효과가 커서 0.15%의 낮은 농도에서도 세포성장을 억제하였으며 숙성 3주김치의 경우 그 다음으로 억제효과가 컸다. 나머지 김치 추출물들은 유사한 정도의 세포성장 억제효과를 나타내어 김치의 숙성시기에 따라 세포독성에 미치는 효과에 차이가 있음을 알 수 있었다. 사용한 keratinocyte는 암세포로서 김치의 이러한 세포성장 억제효과는 암세포에 대한 김치의 항암효과로 볼 수 있겠는데 이러한 결과는 박의 연구 결과와도 일치하여서 김치 추출물이 HT-29 인체결장암 세포, human leukemia K-562 및 MG-63 인체골육암세포의 성장을 현저히 억제하였고 특히 5°C에서 3주 숙성시킨 잘 익은 김치에서 항암효과가 가장 큰 것으로 보고하고 있어, 본 연구의 8°C에서 2주 숙성시킨 김치의 경우 암세포 생존을 억제효과가 가장 컸던 것과 유사한 결과라고 생각된다. TD₅₀은 숙성시키지 않은 김치의 경우 5% 범위였고 숙성 1, 4 및 5주 김치의 경우 5~10% 범위였으며 숙성 2, 3주김치의 경우 2.5~5% 범위였다.

사람의 정상세포인 fibroblast에 대한 김치 추출물의 독성실험 결과 숙성기간에 따른 김치 추출물의 TD₅₀은 0~3주 김치에서 10%부근이었고 4, 5주 숙성김치의 경우 10~20%범위였다. Fibroblast에 대해서는 keratinocyte보다 김치 추출물의 세포독성이 낮게 나타났으나 김치 추출물의 농도를 낮추어도 세포생존율에 약간의 영향을 미쳤다. 암세포인 keratinocyte에 대해 가장 강한 세포독성 효과를 나타내었던 2주 숙성 김치의 경우 정상세포인 fibroblast에 대해서는 독성효과가 비교적 낮은 것으로 나타나서 0.3~1.25% 범위에서 세포생존율에 거의 영향을 미치지 않았다.

이러한 결과를 바탕으로 피부세포에 첨가하는 숙성기간별 김치 추출물의 농도를 결정하였다. 즉 세포에 영향을 미치지 않는 김치 추출물의 농도를 keratinocyte에서는 1.25%로 하였고 fibroblast에 대해서는 2.5%의 농도로 결정하였다.

Keratinocyte에 활성산소 생성을 유발시키는 과산화수소와 paraquat을 농도별로 투여하여 김치 추출물들의 활성산소에 대한 독성 완화작용을 살펴보았다. 먼저 keratinocyte에 과산화수소를 첨가하였을 때의 김치 추출물의 효과를 숙성기간별로 비교해 보았다. Fig. 28은 장기간 과산화수소에 노출하였을 때의 숙성기간별 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 나타낸 것이다. 과산화수소 0.5mM이내에서는 세포생존율이 유사한 것으로 나타났으나 과산화수소의 농도가 1mM이상이 되면 세포독성이 커서 대부분의 세포가 사멸하였다. 김치 추출물을 첨가한 경우 0.25mM농도까지에서는 숙성 4주 김치가 대조군보다 세포생존율이 낮았으나 나머지는 김치 추출물 투여군의

세포생존율이 높았고 특히 2주 숙성김치의 세포독성 완화효과가 높은 것으로 나타났다. 과산화수소의 농도가 높아지는 0.5mM에서 대조군의 세포생존율은 감소했으나 김치 추출물 첨가군의 경우 세포생존율을 높이는 것으로 나타났다. 0.25~0.5mM로 과산화수소의 농도가 높아질수록 특히 효과가 큰 것은 2주 숙성김치와 0주, 3주 숙성김치의 순이었으며 1주, 5주, 4주 김치도 대조군에 비해 세포독성 완화효과를 나타내었다.

Fig. 29는 keratinocyte를 단기간 과산화수소에 노출시켰을 때의 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 본 것이다. 1.25%의 김치 추출물을 세포에 투여하고 하룻동안 과산화수소에 노출시켰을 때 세포가 받는 과산화수소에 의한 독성은 4일간 과산화수소에 노출시켰을 때와 거의 유사한 경향을 나타내어 1mM 이상의 농도에서 keratinocyte 대부분이 사멸하는 것으로 나타났다. 김치 추출물의 경우 장기간 과산화수소에 노출시켰을 때와 마찬가지로 과산화수소에 대한 세포독성 완화효과가 나타났는데 2주 숙성김치에서 그 효과가 현저하였고 2주 숙성김치의 산화적 스트레스에 대한 확실한 억제효과는 세포를 장기간 과산화수소에 노출시켰을 때보다 단기간 노출시켰을 때 더욱 현저한 것으로 나타났다.

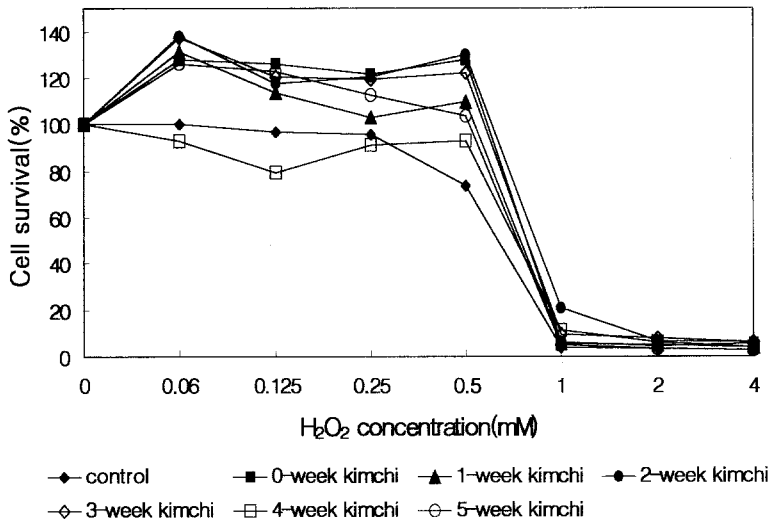


Fig. 28. Effect of kimchi extracts on cytotoxicity of H₂O₂ in keratinocyte (4-day exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10⁴ cells/well and incubated for 24hr. Then 1.25% of kimchi extract was added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 4 days.

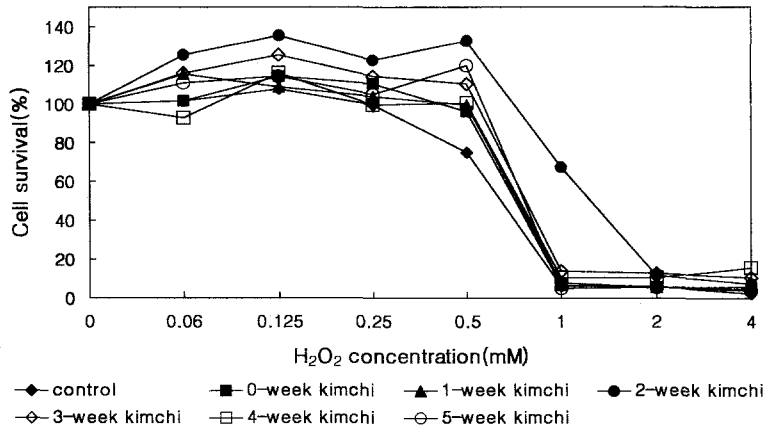


Fig. 29. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of H₂O₂ in keratinocyte(24hr exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10⁴cells/well and incubated for 4 days. Then 1.25% of *kimchi* extract was added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 24hr.

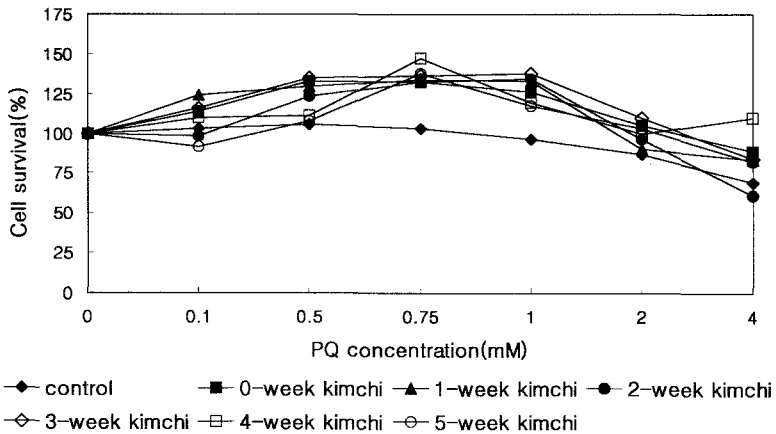


Fig. 30. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of PQ in keratinocyte(24hr exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10⁴cells/well and incubated for 4 days. Then 1.25% of *kimchi* extract was added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of PQ for 24hr.

Fig. 30은 paraquat을 keratinocyte에 첨가하고 단기간의 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 본 것이다. Keratinocyte에 paraquat을 첨가한 본 실험에서 paraquat의

농도가 증가할수록 세포생존율은 감소하였으나 과산화수소 처리군에 비해 현저하지는 않았다. Paraquat의 농도가 증가할수록 김치 추출물의 세포독성 완화효과가 컸는데 특히 0.75~1mM의 농도에서 김치 추출물의 세포독성 완화효과가 현저하였다. 1mM의 농도에서 3주>2주>1주>0주>4주>5주 김치의 순으로 독성 완화효과가 낮아졌으나 대조군에 비해 현저한 효과를 나타내었다. Paraquat 4mM 이상의 농도에서는 4주 숙성김치를 제외하고는 김치 추출물의 세포독성 완화효과가 낮아지는 경향을 나타내었고 2주 숙성김치의 경우 대조군보다 낮은 효과를 나타내어 활성산소를 유발시키는 방법에 따라 김치 추출물의 세포독성 완화효과에 차이가 있음을 알 수 있었다.

피부의 진피세포인 fibroblast에 과산화수소 및 paraquat을 가해 산화적 스트레스를 가한 후 김치 추출물들의 세포독성 완화효과를 살펴보았다. Fig. 31은 과산화수소 및 김치 추출물을 장기간 투여하여 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 본 것이다. Fibroblast의 경우도 keratinocyte와 유사한 경향을 나타내어 과산화수소 1mM농도에서 세포독성이 크게 증가하였고 김치 추출물을 첨가하였을 때 keratinocyte에서 보다 세포독성을 현저히 감소시켰고, 그 효과도 분명한 것으로 나타났다. 특히 김치의 숙성기간에 따라 차이가 현저하여서 과산화수소 1mM농도까지의 전 농도에 걸쳐 2주 숙성김치의 효과가 가장 컸고 0주, 3주 숙성김치도 과산화수소 1mM농도에서 현저한 효과를 나타내었다.

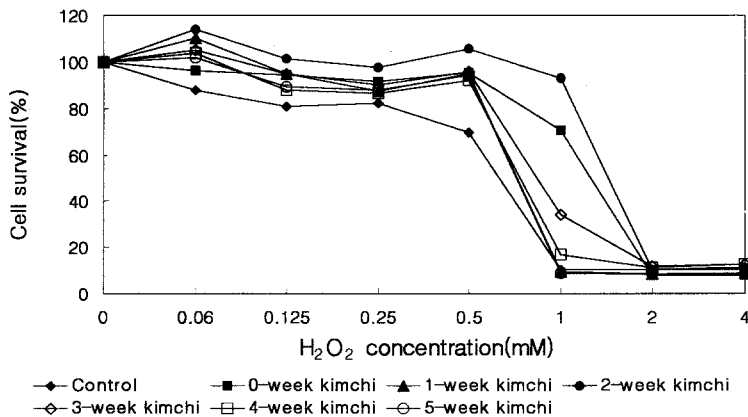


Fig. 31. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of H₂O₂ in fibroblast(4-day exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10³cells/well and incubated for 24hr. Then 2.5% of *kimchi* extract was added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 4 days.

Fig. 32는 fibroblast에 김치 추출물과 과산화수소를 단기간 투여한 후 fibroblast에 미치는 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 본 것이다. 대조군의 경우 과산화수소

0.5mM에서 현저하게 세포독성이 증가했으나 김치 추출물을 첨가한 경우 전 김치 숙성 기간에서 상당한 세포독성 완화효과가 있었다. 과산화수소 1mM의 경우 2주 숙성김치의 세포독성완화효과가 매우 크게 나타나서 앞의 실험 결과들과 일치함을 알 수 있었다.

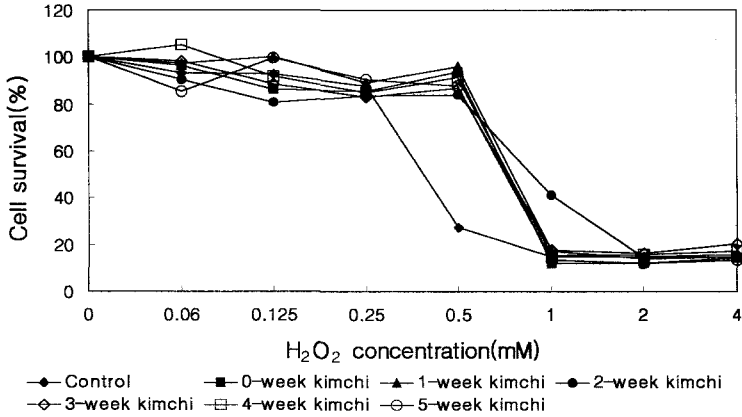


Fig. 32. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of H₂O₂ in fibroblast(24hr exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10³cells/well and incubated for 4 days. Then 2.5% of *kimchi* extract was added and incubated for another hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 24hr.

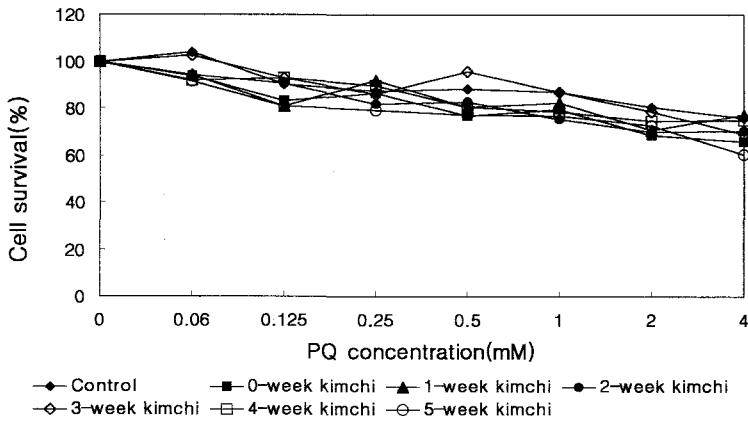


Fig. 33. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of PQ in fibroblast(24hr exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10³cells/well and incubated for 4 days. Then 2.5% of *kimchi* extract was added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of PQ for 24hr.

Fig. 33은 fibroblast에 paraquat과 김치 추출물을 첨가하고 김치 추출물의 세포독성 완화효과를 본 결과이다. Fibroblast에 있어서는 paraquat에 대한 김치 추출물의 세포독성 완화효과는 현저하지 않은 것으로 나타났다. 이것은 keratinocyte에 paraquat을 부가하였을 때와 유사한 결과로서 paraquat의 농도가 증가할수록 세포생존율은 감소했으나 과산화수소 첨가시처럼 현저하지 않았고 김치 추출물들의 세포독성 완화효과도 낮은 것으로 나타났다. 0.5mM농도에서는 대조군보다 세포생존율에 유리하게 작용하는 것은 3주 숙성김치 뿐이었다. 1mM이상의 농도에서는 김치 추출물들이 오히려 세포생존율을 낮추는 역할을 하는 것으로 나타났다.

노화란 시간의 경과에 따른 기능의 쇠퇴로서 세포가 내외적 도전에 저항이 떨어지는 현상을 일컫는다. 현재까지 알려진 노화이론은 300여가지가 넘지만 그 중 가장 많은 지지를 받고있는 이론은 유리기이론이다. 유리기 중에서도 세포독성을 주는 가장 강력한 물질로서 활성산소종이 알려져 있다. 인체의 대사과정 중 생성되는 유해산소종은 superoxide anion($O_2^- \cdot$)과 과산화수소(H_2O_2) 및 hydroxy radical($\cdot OH$)이 있고 이들은 반응성이 높아 세포의 구성물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산을 파괴하고 세포의 기능을 저하시키고 노화현상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Harman 1956).

이러한 유리기들에 의한 과산화적 손상으로부터 생체를 보호하려는 항산화방어계가 생체 내에 존재하고 있고 그 방어기전으로 selenium, tocopherol, glutathione, uric acid 등의 비효소계와 superoxide dismutase(SOD), glutathione S-transferase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 해독효소들이 세포내 여러 구획에서 특이적으로 작용하여 조직의 과산화를 억제하는데 기여하고 있다. 이밖에도 식품 성분으로서 유해산소 소거능이 있는 것으로 알려져 있는 물질들 중에는 비타민 C, tocopherol, uric acid, sulfhydryl compounds, phenols, 환원 glutathione, selenium, carotenoids, mannitol등이 알려져 있고 이들은 항산화제로서 정의된다.

그런데 활성산소들의 독성에 관한 결정적인 증거를 제공하는데 일차적인 난관은 이들 산소종들의 성질이 매우 일시적이고 측정하기 어렵다는 것이다. 따라서 본 실험에서는 superoxide anion을 생성하여 폐의 호흡곤란을 초래한다고 알려져 있는 paraquat과 유해산소종의 하나인 과산화수소를 직접 피부세포에 투여하여 산화적 스트레스를 유발하도록 하였다. Paraquat은 제초제로 사용되어지는 bipyridyl화합물 중에서도 독성학적으로 가장 강력하며 superoxide anion을 발생시켜 세포의 막을 파괴시키고 식물잎을 고사시키는 물질로 알려져 있다. 인간에 있어서 독성은 paraquat에 의해 유도된 superoxide anion이 즉시 지방과 반응하여 fatty acid hydroperoxide를 형성하고 그 결과로 세포가 damage를 받아 염증, edema, 그리고 결국 fibrosis를 유발한다는 것이다.

피부세포를 이용하여 과산화수소와 paraquat를 이용하여 활성산소를 유발하여 김치 추출물의 활성산소에 대한 독성 완화효과를 살펴본 결과 김치 추출물들은 산화적 스

트레스에 대해 현저한 세포독성 완화효과를 나타내었고 특히 숙성 2주김치에서 그 효과가 큰 것으로 나타났다. 이와 같은 김치 추출물들의 산화적 스트레스에 대한 독성 완화 효과는 김치 및 김치 재료 속에 함유되어 있는 여러 성분들의 유해산소종 소거능에 의한 것으로 추정된다. 배추 속에 함유되어 있는 것으로 알려진 플라보노이드, 페놀물질들에 관한 유해 활성산소의 소거능이 이미 보고되어 있고, 녹황색 채소류 속에 풍부히 함유되어 있는 β -carotene의 활성산소 소거능이 잘 알려져 있으며, 채소류 속에 함유되어 있는 α -tocopherol, Vit C, propyl gallate 등에 의한 활성산소 소거능이 Bissett 등에 의해 hairless mouse를 이용한 실험에서 규명된 바 있다. Tanielian과 Wolff는 chlorophyll과 그 유도체가 singlet oxygen molecular를 제거함으로써 항산화 효과를 나타낸다고 보고하고 있어 김치의 활성산소 소거능에 관한 가능성을 뒷받침하고 있다.

숙성기간에 따라 김치 추출물의 산화적 스트레스에 대한 세포독성 완화효과가 2주 숙성김치에서 가장 현저하였는데 이는 이와 최의 연구와 일치하는 결과로서 이와 최도 미발효김치보다 맛이 좋은 7일 발효김치에서 높은 항산화효과를 확인한 바 있다. 이러한 결과는 숙성기간에 따라 김치성분이 변화하기 때문으로 여겨지는데 김치의 숙성 중 비타민 C의 경우 김치가 맛있게 익었을 때 그 함량이 가장 많았다는 우의 보고와, 김치 속에 함유되어 있는 phenolic acid들이 숙성이 진행되면서 배당체에서 유리되어 나와 항산화효과에 기여하였을 가능성 및 이의 연구 결과에서처럼 chlorophyll이 김치 속의 Zn과 안정한 결합체를 만들어 항산화효과를 높였을 가능성이 제기되어 있고, 이외에도 발효과정 중 생성되는 어떤 물질에 의해 항산화효과가 영향을 받을 것으로 추정되므로 이에 관한 계속된 검토가 필요하다고 여겨진다.

그런데 본 실험에서 활성산소의 종류에 따른 세포독성 완화효과는 과산화수소와 paraquat를 이용하였을 때 현저한 차이를 나타내어 과산화수소로 유발된 산화적 스트레스를 피부세포에 주었을 때는 keratinocyte와 fibroblast 모두 유사한 경향을 나타내어 김치 추출물의 세포독성 완화효과가 현저하였고 특히 2주 숙성김치에서 그 효과가 현저하였는데 paraquat로 산화적 스트레스를 유발하였을 때는 김치 추출물들의 세포독성 완화효과는 현저하지 않았고 특히 fibroblast의 경우에는 더욱 그 효과가 분명하지 않았다. 이는 활성산소종의 종류에 따라 paraquat에 의해 유발되는 일중항산소에 대해서는 김치 추출물의 소거능이 확실하지 않으나 과산화수소에 대해서는 소거능이 현저함을 시사하는 것으로 여겨지고, Kohen에 의하면 paraquat는 Fe에 의해 독성을 증진시킨다고 보고되어 있어 paraquat는 세포독성에 대해 과산화수소와는 다른 영향을 미치는 것으로 추정되므로 이에 관해서는 계속된 규명이 필요하다고 하겠다.

2. 김치 재료 추출물의 활성산소에 대한 독성 완화효과

Keratinocyte에 대한 김치 재료 추출물들의 세포독성 실험 결과 김치의 주재료인 배추의 경우 keratinocyte에 대해 가장 낮은 독성을 나타내어 10%정도 첨가하여도 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았고 양파 추출물도 세포 독성이 약했으나 실험에 사용한 나머지 부재료 추출물들은 상당한 독성을 나타내었다. 파는 1.25%에서, 무와 생강이 0.62~1.25%, 부추는 0.15~0.3%, 마늘은 독성이 가장 강하여 0.05%에서도 세포 생존율에 영향을 미쳤다. 암세포인 keratinocyte에 대해 가장 강한 세포성장 억제효과를 나타낸 것은 마늘 추출물이었고 부추의 효과도 상당히 높음을 알 수 있었다. Park은 김치의 주재료인 배추를 비롯하여 부재료인 마늘, 고춧가루, 생강 및 파 등이 항암 및 암예방 효과를 나타냄을 보고하고 있어 본 실험결과와 일치함을 알 수 있었다. Keratinocyte 세포에 대해 가장 큰 세포독성을 나타낸 마늘의 항암효과에 관해서는 많은 연구결과들이 보고되어 있고, 무, 부추, 배추도 MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)에 대해 상당히 큰 저해효과를 나타내었음이 보고되어 있다.

이러한 김치의 항암효과는 김치 재료에 풍부한 비타민 C, β -carotene, 식이섬유소, 플라보노이드, 엽록소 등과 발효과정 중 유산균의 생성으로 인한 암예방효과가 있다고 추측된다. 특히 김치에 첨가되는 파, 부추, 고춧가루 등의 녹황색채소류들은 암을 예방하는 대표적인 식품으로 인정받고 있는데 녹황색채소류들의 항암작용기전은 superoxide anion(O_2^-)과 hydroxy radical($\cdot OH$)과 같은 산소종의 형성을 소거하거나 억제하므로써 작용되어 진다고 볼 수 있는데, 특히 β -carotene의 일중항산소 소광성질은 잘 알려져 있다.

Keratinocyte에 대한 김치 재료 추출물의 TD_{50} 은 배추가 10-20%였고 양파가 5-10% 범위였으며 생강이 5%, 파가 2.5-5%, 무가 2.5%, 부추가 0.62%였으며 마늘이 0.1-0.2%였으므로 부추와 생강은 0.62%, 마늘은 0.1%, 나머지 재료는 1.25%의 농도로 세포에 투여하였다.

정상세포인 fibroblast에 대해서도 세포독성의 경향이 keratinocyte와 유사하여서 TD_{50} 은 배추가 20%이상이었고 무, 양파가 10-20%, 파 10%, 생강이 5-10%, 부추가 2.5%였으며 마늘이 1.6-3.3%였으나 세포독성에 영향을 미치는 시료의 농도가 keratinocyte 보다 높은 것으로 나타났다. 이것은 세포에 따라 외부물질에 반응하는 기작이 조금씩 차이가 있기 때문으로 여겨진다. 따라서, 세포에 투여하는 시료의 농도를 부추와 생강은 1.25%, 마늘은 0.83%, 나머지 재료는 2.5%의 농도로 결정하였다.

표피세포인 keratinocyte에 과산화수소와 paraquat을 농도별로 투여하여 산화적 스트레스를 유발시켜 김치 재료 추출물들의 활성산소에 대한 독성 완화작용을 살펴보았다.

Fig. 34는 장기간 과산화수소에 노출하였을 때의 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 나타낸 것이다. 과산화수소에 의한 세포독성은 앞과 동일한 경향을 나타내

어서 1mM농도에서 대부분의 세포가 사멸하였다. 대부분의 김치 재료 추출물들은 세포 독성 완화효과를 나타내었는데 과산화수소 0.5mM농도에서 양파, 배추, 무, 마늘의 세포독성 완화효과가 큰 것으로 나타났고 부추, 생강의 경우 세포독성 보호효과가 약간 낮은 것으로 나타났으나 과산화수소 1mM농도에서는 마늘의 세포독성 완화효과가 현저한 것으로 나타났다.

Fig. 35는 keratinocyte를 단기간 과산화수소에 노출시켰을 때의 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 본 것이다. 세포가 받는 과산화수소에 의한 독성은 장기간 과산화수소에 노출시켰을 때와 거의 유사한 경향을 나타내어 1mM 이상의 농도에서 keratinocyte 대부분이 사멸하는 것으로 나타났다. 김치 재료 추출물들의 경우 장기간 과산화수소에 노출시켰을 때와 마찬가지로 과산화수소에 대한 세포독성 완화효과가 나타났는데 생강 추출물의 효과가 현저하였고 파, 부추 등의 함황화합물을 가지고 있는 식품들이 산화적 스트레스에 대한 확실한 억제효과를 나타내었다. 마늘의 효과는 단기간 처리했을 때는 장기간 처리시보다 확실하지 않아 처리 시간에 따라 약간의 다른 결과가 나타났다.

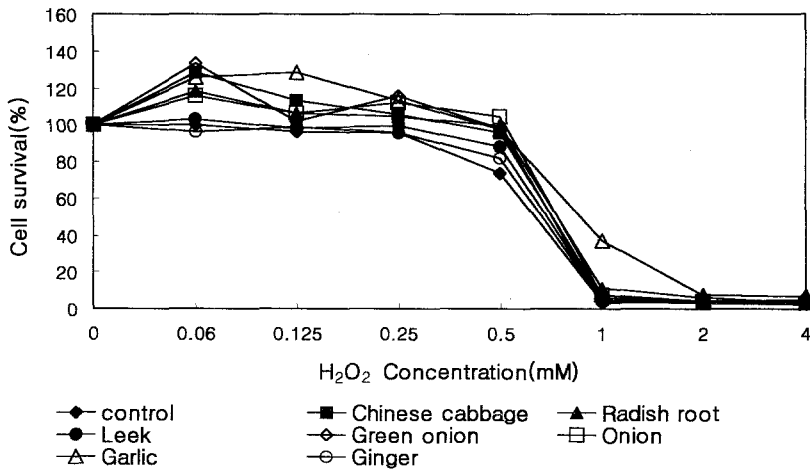


Fig. 34. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of H₂O₂ on keratinocyte (4-day exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10⁴ cells/well and incubated for 24hr. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 4 days. The concentration of leek and ginger extracts used 0.6% and that of garlic extract 0.1%.

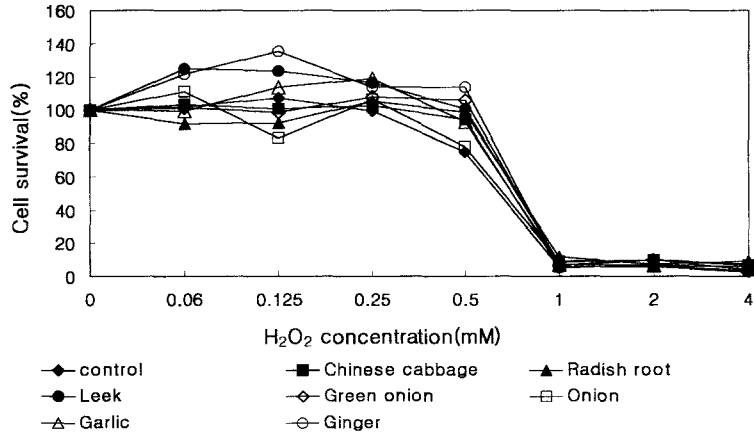


Fig. 35. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of H_2O_2 on keratinocyte (24hr exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10^4 cells/well and incubated for 4 days. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H_2O_2 for 24hr. The concentration of leek and ginger extracts used 0.6% and that of garlic extract 0.1%.

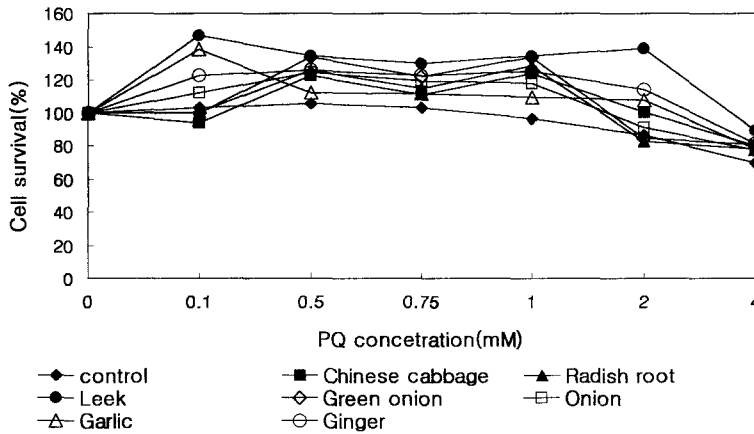


Fig. 36. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of PQ on keratinocyte (24hr exposure). Keratinocyte cells were plated at the concentration of 10^4 cells/well and incubated for 4 days. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of PQ for 24hr. The concentration of leek and ginger extracts used 0.6% and that of garlic extract 0.1%.

Fig. 36는 paraquat을 keratinocyte에 첨가하고 단기간의 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 본 것이다. Keratinocyte에 첨가하는 paraquat의 농도가 증가할수록 세포생존율은 감소하였고, 감소패턴은 김치 추출물에서와 같았다. Paraquat의 농도가 증가할수록 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과가 컸는데 특히 2mM의 농도에서 세포독성 완화효과가 현저하였으나 4mM 농도에서는 김치 재료 추출물을 첨가한 세포독성 억제효과가 크지 않고 오히려 대조군에 가까워지는 경향을 나타내었다. Paraquat 2mM농도에서 부추의 세포독성 완화효과가 월등하였고 생강, 마늘, 배추의 순으로 효과가 높았으며 파, 무의 효과는 높지 않거나 대조군보다 낮았다.

피부의 진피세포인 fibroblast에 과산화수소 및 paraquat을 가해 산화적 스트레스를 가한 후 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 살펴보았다.

Fig. 37은 과산화수소 및 시료 추출물들을 장기간 투여하여 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 본 것이다. Fibroblast의 경우도 keratinocyte와 유사한 경향을 나타내어 과산화수소 1mM농도에서 세포독성이 크게 증가하여 대부분의 세포가 사멸하였다. 그런데 김치 재료 추출물들을 첨가하였을 때 keratinocyte에서 보다 세포독성을 현저히 감소시켰고, 그 효과도 분명한 것으로 나타났다. 특히 생강의 경우는 4mM 농도에서도 세포사멸을 현저히 억제시켰고 마늘, 무의 경우 1mM농도에서 세포생존율을 현저히 증진시켰다. 부추의 경우 과산화수소의 낮은 농도에서는 가장 세포 생존율을 높이는 작용을 하였으나 1mM이상의 농도에서는 그 효과가 현저히 감소하였다.

Fig. 38은 fibroblast에 과산화수소를 단기간 투여한 후 fibroblast에 미치는 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과를 본 것이다. 단기간 투여하였을 때도 장기간 투여하였을 때와 거의 유사한 경향을 나타내어 생강의 효과가 특이하게 높았고 마늘의 경우에도 장기간보다 단기간에서 더 효과가 높아서 4mM농도에서도 상당한 독성 완화효과를 나타내었다. 과산화수소 0.5mM에서는 모든 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과가 대조군에 비해 현저하였고 저농도에서는 무의 효과가 높은 것으로 나타났다.

Fig. 39는 fibroblast에 paraquat과 김치 재료 추출물들을 첨가하고 세포독성 완화효과를 본 결과이다. 김치 추출물에서의 결과와 마찬가지로 fibroblast에 있어서는 paraquat에 대한 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과는 현저하지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 keratinocyte에 paraquat을 부가하였을 때와 유사하여서 paraquat의 농도가 증가할수록 세포생존율은 감소했으나 그 효과는 과산화수소 첨가 시처럼 현저하지 않았고 김치 재료 추출물들의 세포독성 완화효과도 낮은 것으로 나타났다. 2mM농도에서는 마늘, 부추, 생강 추출물이 대조군보다 세포생존율에 약간 유리하게 작용하였으나 4mM에서는 효과가 낮아지는 것으로 나타났다.

김치의 피부건강에 미치는 영향을 규명하기 위하여 피부의 주요 표피세포인 keratinocyte와 진피세포인 fibroblast를 이용하여 김치 재료 추출물들의 활성산소

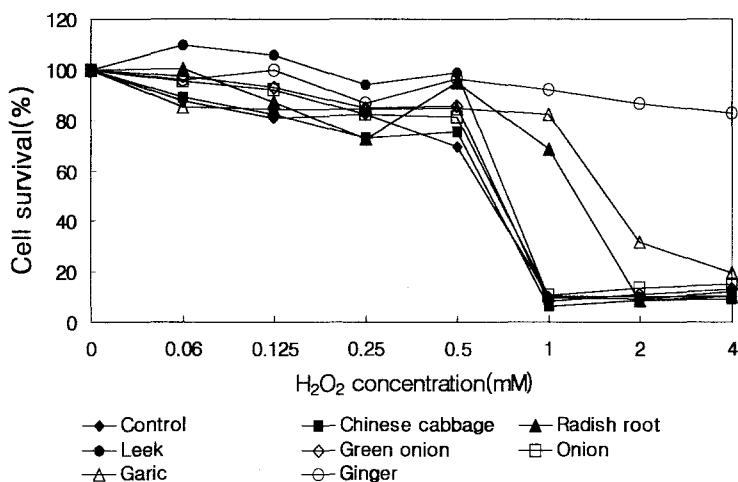


Fig. 37. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of H₂O₂ on fibroblast (4-day exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10^3 cells/well and incubated for 24hr. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 4 days. The concentration of leek and ginger extracts used 1.25% and that of garlic extract 0.83%.

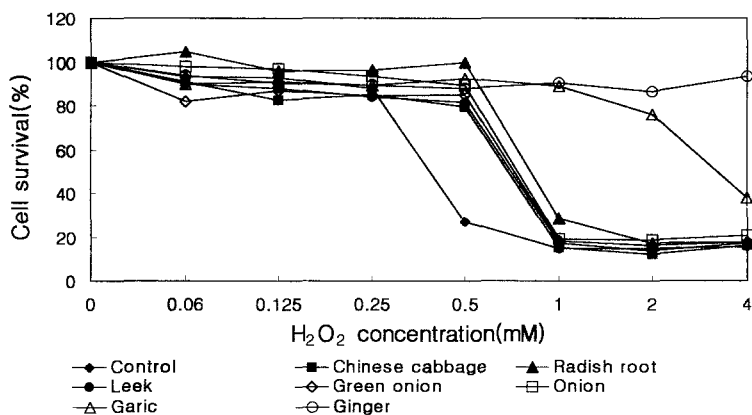


Fig. 38. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of H₂O₂ on fibroblast (24hr exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10^3 cells/well and incubated for 4 days. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of H₂O₂ for 24hr. The concentration of leek and ginger extracts used 1.25% and that of garlic extract 0.83%.

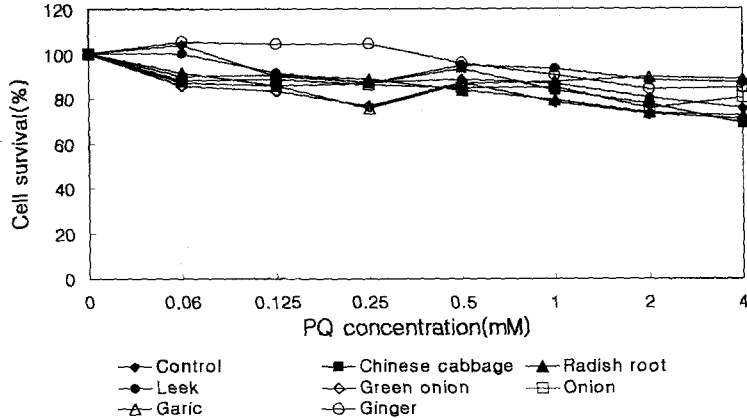


Fig. 39. Effect of kimchi ingredient extracts on cytotoxicity of PQ on fibroblast(24hr exposure). Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10^3 cells/well and incubated for 4 days. Then kimchi ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 24hr, followed by exposure of cells to different concentrations of PQ for 24hr. The concentration of leek and ginger extracts used 1.25% and that of garlic extract 0.83%.

에 의한 독성 제거효과를 살펴본 결과 keratinocyte에 대해서는 과산화수소로 산화적 스트레스를 가하였을 경우 마늘, 양파, 생강에서 세포독성 완화효과가 크게 나타났으며 특히 마늘의 경우 과산화수소의 높은 농도에서도 효과가 있었다. Paraquat로 산화적 스트레스를 가했을 경우에도 부추, 생강, 마늘의 효과가 높은 것으로 나타났다. Fibroblast에 대해서는 과산화수소로 산화적 스트레스를 가했을 때, 과산화수소의 농도가 낮을 때에는 부추, 생강의 세포독성 완화효과가 현저하였으나 농도가 높아지면 생강, 마늘의 효과가 월등한 것으로 나타났다. Paraquat에 대해서는 농도가 낮을 때에는 생강의 효과가 월등하였으나 농도가 높아지면 부추, 마늘의 효과가 높은 것으로 나타났다.

3. 김치 및 김치 재료 추출물의 UVB에 대한 독성 완화효과

먼저 fibroblast 세포에 독성을 미치지 않는 범위의 시료들, 즉 부추와 생강은 1.25%, 마늘은 0.83% 그리고 김치 추출물과 나머지 김치 재료 추출물은 2.5%수준으로 투여하여 실험을 수행하였다. UV를 4시간동안 조사하였을 때 시료를 넣지 않는 대조군의 경우 세포생존율이 급격히 감소한 반면 시료를 투여한 군은 높은 세포생존율을 보였다. 특히 3주 숙성김치와 2주 숙성김치에서 그 효과가 두드러졌으며 김치 재료 추출물의 경우에도 모두 세포사멸 억제 효과가 있었으며 특히 마늘과 양파, 생강에서 그 효과가 탁월하였다. 자외선은 spectrum에 따라 UVC(190-290nm), UVB(290-320nm) 및 UVA(EVA I, 340-400nm, EVA II, 320-340nm)등 3개의 spectrum으로 구분되며 이중 UVB는 태양광선에 포함되어 있어 피부의 화상, 변이원, 세포사멸 및

피부암을 일으키는 등 피부에 많은 손상을 준다. UV에 의한 피부 손상 및 피부암 발생원인중 하나로 유리기가 관여하고 있다고 보고되어 있는데 피부가 UV에 노출되면 유리기가 생성되고 피부의 항산화계는 유리기에 대한 활성이 감소되어 피부중의 단백질, 지질 및 DNA가 유리기에 의해 손상을 입게 된다. Schallreuter 등도 피부 및 피부 균질액에 UV를 조사하면 유리기가 생성된다고 하였다. 따라서 유리기에 의한 손상을 방지하기 위하여 항산화 및 피부보호제로서 polyphenol 및 flavonoid 화합물이 효과가 있다고 알려져 있다. 이렇게 김치 재료 추출물들 중 활성산소에 의한 세포독성 완화효과가 큰 물질에는 마늘, 생강, 부추가 공동으로 screening되었다. 마늘의 항산화작용 및 원인물질에 대해서는 전과 이에 의해 다각도로 규명되어 있는 바 garlic oil, allin 및 ethanol fraction에서 현저한 항산화효과를 확인하였으며 마늘의 항산화 작용기구로서 garlic oil이 peroxidase와 superoxide dismutase의 활성을 증가시킴을 보고하고 있다. 생강의 항산화효과에 관해서도 많은 연구가 이루어져 있는데 백 등에 의하면 생강추출물이 대두유 및 대두유, 팜유, 돈지 및 어유의 산화안정성에 기여하며 흰쥐 간의 마이크로솜의 지질과산화물 상당히 억제하였다고 보고하고 있고 그 주요 성분은 gingerol임을 규명한 바 있다. 공동 생강, 고추, 마늘분말이 라드에 대해 항산화능을 나타냄을 보고하였고 특히 생강의 항산화활성이 높게 나타났다고 하여 이러한 결과를 뒷받침해주고 있다. 부추의 항산화효과 및 관련 물질에 관한 연구는 아직 다각도로 이루어져 있지 않으나 부추 속에는 β -carotene, 클로로필, 비타민 C 및 함황화합물, 함질소화합물 및 식이섬유가 다량 함유되어 있다. 녹황색채소류 중에 다량 함유되어있는 클로로필과 클로로필 분해생성물들은 감광체로서 산화를 촉진하는 물질로 알려져 있지만 광선이 차단된 상태에서는 각종의 유지에 대해 항산화효과를 확인한 바 있다. 이에 의해 김치의 중요 항산화 물질로서 Zn-chlorophyll이 동정된 바 있다. 클로로필의 이러한 항산화효과는 클로로필a가 b보다 강하며 Tanielian과 Wolff는 클로로필과 그 유도체가 singlet oxygen molecular를 제거함으로써 항산화효과를 나타낸다고 보고하고 있고, singlet oxygen과 클로로필화합물 사이의 반응은 페놀화합물과 유사하게 작용한다고 하여 김치의 활성산소 소거능에 클로로필이 중요한 역할을 할 가능성을 뒷받침하고 있다.

β -carotene의 활성산소 소거능도 잘 알려져 있으며, 녹황색 채소류 속에 풍부히 함유되어 있는 α -tocopherol, 비타민 C, propyl gallate 등에 의한 활성산소 소거능이 Bissett 등에 의해 규명된 바 있다. 한편 식이 glucosinolate가 실험동물에 있어서 GSH와 quinone reductase와 같은 제 2상효소계의 활성을 증가시켰다는 보고도 있다. 따라서 김치 재료로 사용되는 양념류와 갖가지 녹황색 채소류들이 김치의 항산화효과와 관련이 있을 것으로 여겨지고 그 항산화 메카니즘으로서 이들 성분들의 활성산소 소거능이 관련되어 있을 것으로 여겨진다. 그러나 앞에서 산화적 스트레스에 대한 완화작용이 2주 숙성김치에서 가장 강하였고 김치의 중요 항산화관련 성분들이

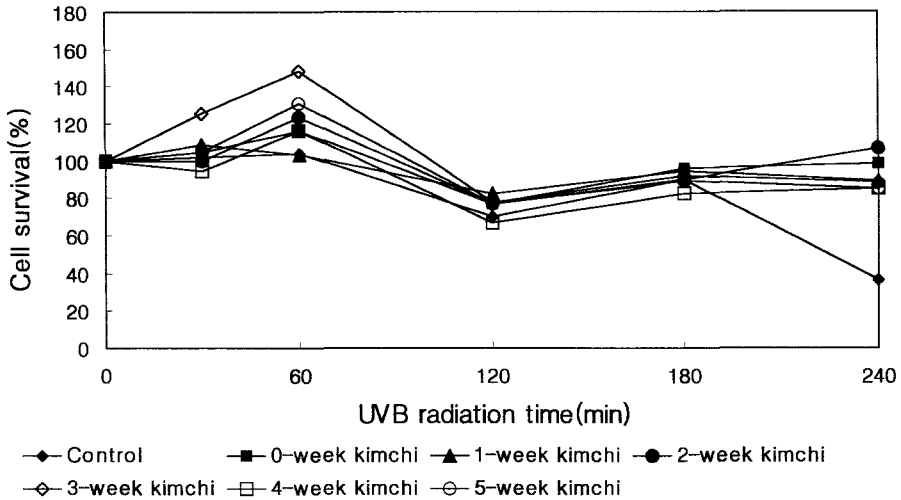


Fig. 40. Effect of *kimchi* extracts on cytotoxicity of UVB radiation on fibroblast. Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10^3 cells/well and incubated for 24hr. Then 2.5% of *kimchi* extract was added and incubated for another 4 days, followed by exposure of cells to different radiation time.

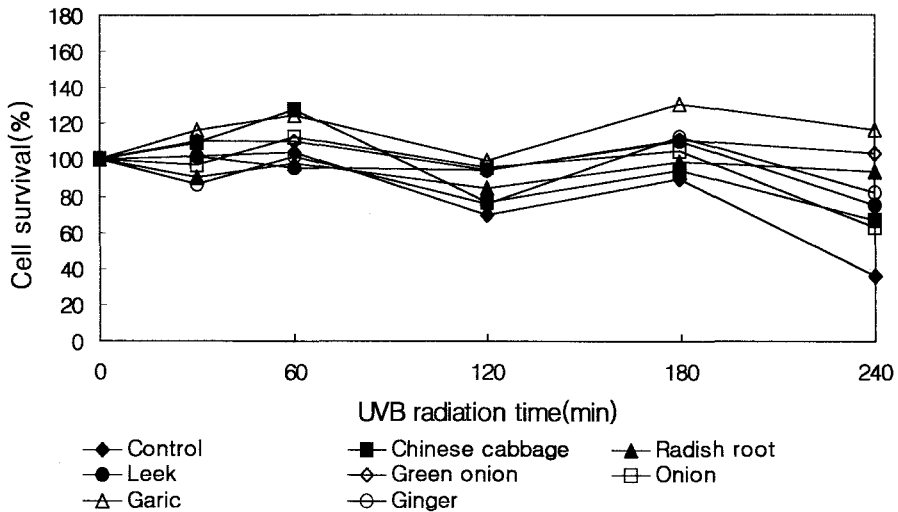


Fig. 41. Effect of *kimchi* ingredient extracts on cytotoxicity of UV radiation on fibroblast. Fibroblast cells were plated at the concentration of 5×10^3 cells/well and incubated for 24hr. Then *kimchi* ingredient extracts other than leek, ginger and garlic were added and incubated for another 4 days, followed by exposure of cells to different radiation time. The concentration of leek and ginger extracts used 1.25% and that of garlic extract 0.83%.

ascorbic acid, 클로로필 화합물, 페놀성분등이 발효기간에 따라 각각 생화학적 변화를 하고 있는 것으로 알려지고 있으므로 이들의 변화가 김치의 항산화성의 차이에 직접 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 김치 숙성 과정 중 이들 성분들의 변화와 김치의 활성 유해산소종의 독성 완화작용과의 관련에 관한 규명이 과제로 남아있다.

4. 김치 및 김치 재료 중의 피부노화 관련 성분의 함량

가. Chlorophyll 함량

시료김치와 김치의 주재료인 배추, 갓, 부추 중의 chlorophyll 함량을 측정한 결과는 Table 20과 같다. 배추의 경우 총 chlorophyll 함량은 1.1mg%였고, 갓은 34.6mg%, 부추는 36.2mg%로 배추보다 갓과 부추에서 높게 나타났다. Chlorophyll a는 chlorophyll b보다 항산화력이 더 큰 것으로 알려져 있는데 주재료의 경우 chlorophyll a와 b를 보면 배추, 갓, 부추 모두 대부분 a가 b보다 3배 정도 높게 나타났다으며, chlorophyll a는 배추보다 갓과 부추에서 더 높게 나타났고 갓과 부추는 큰 차이가 없었다. 동결건조한 김치의 경우도 주재료와 마찬가지로 chlorophyll a의 경우 배추김치 2.3mg%, 갓김치 91.4mg%, 부추김치 264mg%였고, chlorophyll b의 경우 배추김치 3.7mg%, 갓김치 39.3mg%, 부추김치 111.9mg%로 주재료와 마찬가지로 chlorophyll a가 chlorophyll b보다 높게 나타났고 부추김치에서 chlorophyll a, b 모두 가장 높게 나타났다.

Table 20. Contents of chlorophyll in fresh Korean cabbage, mustard leaf, leek and their freeze-dried *kimchi*

Samples	Chlorophyll		
	a	b	total
Raw material ¹⁾			
Korean cabbage	0.8±0.3	0.3±0.2	1.1±0.4
Mustard leaf	26.1±0.2	8.5±0.1	34.6±0.3
Leek	26.1±0.1	10.1±0.1	36.2±0.3
Freeze-dried <i>kimchi</i> ²⁾			
Korean cabbage <i>kimchi</i>	2.3±0.1	3.7±0.1	6.0±0.1
Mustard leaf <i>kimchi</i>	91.4±0.2	39.3±0.1	130.7±0.1
Leek <i>kimchi</i>	264.0±4.3	111.9±3.2	376.4±4.5

Values are means±S.D.

¹⁾Moisture contents of Korean cabbage, mustard leaf and leek were 93.2%, 91.0% and 92.1%, respectively.

²⁾Moisture contents of freeze-dried *kimchi* were 13.6%(Korean cabbage *kimchi*), 12.1%(mustard leaf *kimchi*) and 6.6%(leek *kimchi*), respectively.

갯김치의 chlorophyll 색소는 주로 갯에 의한 것으로 chlorophyll a는 41mg%, chlorophyll b는 15mg%를 함유하고 있으며 잎이 줄기에 비해 각각 7.4배, 8.1배 높은 함량을 나타내었으며 배추, 상치보다 2.9배, 3.6배 높다고 보고되어 있다. 총 chlorophyll 함량은 배추김치에서 5.98mg%로 가장 낮았고, 갯김치 130.65mg%, 부추김치 376.40mg% 순으로 높게 나타났다. 곽 등(곽연주 1998)의 연구 결과에 의하면 동결 건조한 부추의 chlorophyll 함량은 2벌 부추가 762.5mg%, 3벌 부추가 77.5mg%, 4벌 부추 763.0mg%, 5벌 부추가 798.0mg%로 수확시기에 따라 달라진다고 보고되어 있어 본 실험에 사용된 시료의 경우도 채취시기에 따라 그 함량에 차이가 있는 것으로 사료된다.

Chlorophyll은 녹색채소의 주색소로서 과일 및 채소의 신선도나 식욕증진의 요소일 뿐만 아니라 여러가지 생리활성이 있으며, 지방질의 자동산화 방지나 항돌연변이성 및 항암작용이 있는 물질로 알려져 있어(Gentile 1972) 피부의 노화억제 영향을 줄 것으로 기대된다.

나. 총 비타민 C 및 carotenoids

시료김치의 주재료로 사용된 배추와 갯, 부추는 김치에 첨가된 전체 재료중 대부분을 차지하고 있어 이것들이 가지고 있는 총 비타민 C 및 carotenoids의 함량을 측정한 결과는 Table 21과 같다. 김치 주재료 중의 총 비타민 C의 함량은 배추 23.6mg%, 갯 38.3mg% 그리고 부추 36.7mg%으로 배추보다 갯과 부추에서 높게 나타났으며 갯에서 가장 높게 나타났다. 식품성분표에 의한 비타민 C의 함량을 살펴보면, 배추의 경우 46mg%, 갯은 70mg%, 부추는 41mg%로 조사되어져 있어 본 실험과는 다소 차이가 있다. 박 등의 보고에 의하면 갯의 총 비타민 C 함량이 35mg%로 본 실험의 경우와 유사한 결과였으나 식품성분표에 나타난 70.0mg%보다 낮았다. 본 연구 결과와 식품성분표의 결과와 차이가 나는 것은 재료의 품종과 재배조건, 시료의 채취시기에 따라 차이가 난 것으로 사료된다.

동결건조 김치의 경우 총 비타민 C 함량은 배추김치 885.0mg%, 갯김치 1285.0mg%, 부추김치 900.0mg%로 주재료의 경우와 마찬가지로 갯김치에서 가장 낮게 나타났다. 세 종류의 김치에서 총 비타민 C 함량의 차이는 재료에서 차지하는 함량에 기인되며 이외에 비타민 C가 많이 들어있는 고춧가루, 마늘과 같은 김치 부재료의 첨가량이 배추김치보다 갯과 부추김치에서 다소 높았기 때문에 그 함량이 더 높게 나타난 것으로 추정된다.

김치 주재료 중의 carotenoids 함량은 생갯에서 9.2mg%로 가장 높았으며, 부추 2.5mg%, 배추 1.8mg%순으로 낮게 나타났다. 동결건조 김치 중 carotenoids 함량은 주재료와 마찬가지로 갯김치에서 86.0mg%로 가장 높았으며 부추김치 54.3mg%, 배추김치 27.0mg% 순으로 낮았다. 갯김치의 carotenoids는 주로 갯과 고춧가루에서 기인하는데

갓의 총 carotenoids는 4.75mg%이며 주요 carotenoids로는 β -carotene 80.91%, lutein 13.07%, lutein epoxide 3.93%로 구성되어 있으며, 고춧가루는 carotenoids가 175.6mg%로 주요성분으로는 capsanthin, β -carotene 등이 있는 것으로 알려져 있다. 비타민 C는 피부에서 콜라겐 합성에 관여하고, carotenoids는 상피점막을 유지하는데 관여하며 공통적으로 항산화제로서 피부의 산화 방지 및 자외선에 대해 보호효과가 있다. 이러한 비타민들은 김치 중에 많이 함유되어 있기 때문에 김치의 섭취는 피부 노화에 유용한 역할을 할 것으로 보인다.

다. 총 페놀 함량

페놀화합물은 항산화 물질로 불포화지방산의 산화와 lipoxygenase의 활성을 저해하며, 피부암의 치유와 예방에 많이 사용되는 물질로 김치 주재료와 김치 중의 총 페놀 함량을 측정한 결과는 Table 22와 같다. 주재료 중 총 페놀 함량은 배추 1.9mg%, 갓 2.3mg%, 부추 2.6mg%로 배추보다 갓과 부추에서 높게 나타났다. 김치의 경우 배추김치 17.8mg%, 갓김치 22.2mg%, 부추김치 25.7mg%로 부추김치에서 가장 높게 나타났다.

채소와 향신료의 항산화성은 주로 quercetin의 유도체인 flavonol에 의한 것으로, flavonol은 ascorbic acid를 파괴하는 구리와 같은 중금속 이온이 존재할 때 ascorbic acid의 안정제 역할을 하며 일부 페놀화합물은 lipoxygenase와 peroxidase의 활성을 저해한다고 보고되어 있다.

Table 21. Contents of total Vit.C and carotenoids of fresh Korean cabbage, mustard leaf, leek and their freeze-dried kimchi

Samples	(mg%)	
	Total vit.C	Crotenoids
Raw material ¹⁾		
Korean cabbage	23.6±1.0	1.8±0.1
Mustard leaf	38.3±0.2	9.2±0.1
Leek	36.7±0.3	2.5±0.2
Freeze-dried kimchi ²⁾		
Korean cabbage kimchi	885.0±1.3	27.0±2.2
Mustard leaf kimchi	1285.0±0.6	86.0±0.7
Leek kimchi	900.0±1.2	54.3±1.0

Value are Mean±S.D.

¹⁾Moisture contents of Korean cabbage, mustard leaf and leek were 93.2%, 91.0% and 92.1%, respectively.

²⁾Moisture contents of freeze-dried kimchi were 13.6%(Korean cabbage kimchi), 12.1%(mustard leaf kimchi) and 6.6%(leek kimchi), respectively.

Table 22. Contents of total phenol in Korean cabbage, mustard leaf, leek and their freeze-dried *kimchi*

	(mg %)
	Total phenol
Raw material ¹⁾	
Korean cabbage	1.9±0.2
Mustard leaf	2.3±0.3
Leek	2.6±0.2
Freeze-dried <i>kimchi</i> ²⁾	
Korean cabbage <i>kimchi</i>	17.8±0.4
Mustard leaf <i>kimchi</i>	22.2±0.8
Leek <i>kimchi</i>	25.7±1.4

Value are Mean±S.D.

¹⁾Moisture contents of Korean cabbage, mustard leaf and leek were 93.2%, 91.0% and 92.1%, respectively.

²⁾Moisture contents of freeze-dried were 13.6%(Korean cabbage *kimchi*), 12.1%(mustard leaf *kimchi*) and 6.6%(leek *kimchi*), respectively.

십자화과의 채소인 Savoy cabbage의 경우 속잎에는 quercetin과 kaempferol이 1mg/kg이 함유되어 있으나 바깥잎에는 quercetin 5mg/kg, kaempferol 29mg/kg을 함유하고 있어 속잎보다 태양광선을 많이 받는 푸른 바깥쪽 잎에 페놀 함량이 많다. 또한 부추의 바깥쪽 푸른 잎에는 가식부인 흰 부분보다 kaempferol과 quercetin glycoside가 10배나 많은 것으로 나타났다. 본 실험에서 배추김치에 비해 갓김치와 부추김치에서 페놀 함량이 높게 나타난 것은 갓과 부추가 배추보다 푸른 잎이 많은데 기인하는 것으로 사료된다.

라. 무기질 함량

동결건조한 김치 중 피부와 관련이 있는 무기질은 칼슘, 구리, 철, 아연, 황, 셀레니움 등으로 알려져 있어 이들의 함량을 측정하였다. 칼슘의 함량은 갓김치, 부추김치, 배추김치 순으로 높게 나타났다(Table 23). 칼슘은 fibroblast의 합성에 관여하며, 부족시 신체의 저항이 약해지고 신경계가 흥분하기 쉽기 때문에 피부가 불안정해지게 된다(Ohkura 1998). 칼슘의 함량은 갓김치 0.57wt(%), 부추김치가 0.38wt(%), 배추김치가 0.27wt(%) 순으로 낮게 나타나 갓김치 중의 칼슘이 가장 높게 나타났다. 식품성분표(233)에 의한 김치 중의 칼슘의 함량을 보면, 배추김치 45mg%, 갓김치 115mg%로 나타나 있으며 부추김치에 대한 자료 아직 조사되어 있지 않지만 배추

51mg%, 갓 110mg%, 부추 34mg%로 거의 유사한 양으로 비추어 보아 갓김치 중 칼슘의 함량이 배추나 부추 김치에 비해 높게 나타난 것으로 사료된다. 또한 시료김치에 사용된 부재료 중 첨가된 칼슘의 급원이 되는 것갈의 함량이 부추김치 비해 갓김치와 부추김치에서 많이 첨가되어 배추김치보다 더 높게 나타난 것도 갓김치의 칼슘 함량이 높은 원인이 되는 것으로 사료된다.

구리의 함량은 갓김치에서 가장 많았다. 구리는 hemoglobin 형성과정에 필수적인 요소로 lysyl oxidase의 구성성분이며, collagen과 elastin의 cross linkage 형성을 도와주어 정상적인 골격형성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Rayton 1979). 황과 아연은 부추김치>갓김치>배추김치 순으로 많았다. 아연은 효소의 구성요소로 여러 대사 과정에 필수적인 효소의 활성을 위해 필요하며 성장과 조직 및 골격의 형성, 피부보호, 식욕, 세포매개성 면역 등에 필수적인 영양소로 중요한데, 아연은 부추김치>갓김치>배추김치 순으로 많았다.

셀레니움의 함량은 미량이지만 갓김치가 배추김치, 부추김치에 비해 3~4배 정도 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 셀레니움은 비타민 E와 함께 항산화 작용에 관여하며, 종양형성을 억제하여 항암효과가 있으며 피부암의 치유와 예방에도 효과가 있어 피부노화에 있어 중요한 의미를 가진다고 사료된다(Vendeland 1993) 무기질 중 피부를 건강하게 유지시켜 주는 요오드는 본 실험에 사용된 시료김치 중에는 함유되어 있지 않았으나 요오드가 많이 함유되어 있는 굴, 다시마 등의 해조류를 김치에 첨가하면 피부에 더 좋은 영향을 줄 것으로 기대된다. 이러한 결과로 보아 배추김치에 비해 부추김치와 갓김치에서 피부에 유용한 무기질의 함량이 높게 나타나 부추김치와 갓김치가 피부노화 억제에 더 효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 23. Mineral content of various kinds of freeze-dried kimchi

Mineral ¹⁾	Korean cabbage kimchi	Mustard leaf kimchi	Leek kimchi
Ca(wt%)	0.27	0.57	0.38
Mg(wt%)	0.23	0.30	0.20
S(wt%)	0.43	0.48	0.64
Cu(ppm)	4.75	8.09	6.96
Zn(ppm)	14.58	18.5	38.79
Se(ppm)	0.04	0	0
		0.15	0.04

¹⁾Contents of Ca, Mg, S, Cu, Fe and Zn were measured using ICP/AES(Inductively Coupled Plasma/Atomic Spectrometer), content of Se was measured using ICP/MS(Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometer).

5. 김치첨가 식이가 hairless mouse의 피부에 미치는 영향

가. 실험동물의 체중 및 장기 무게 변화

김치 식이를 섭취하기 전 hairless mouse의 초기 체중은 대조군이 32.80g이었으며, 배추김치군은 33.20g, 갓김치군은 33.75g, 부추김치군은 32.20g이었다(Table 24). 최종 체중은 대조군이 37.74g, 배추김치군은 36.22g, 갓김치군은 34.44g, 부추김치군은 33.50g로 증가하여 김치섭취군들이 대조군에 비해 적게 나타났지만 유의적인 차이는 없었다. 체중증가율은 대조군에서 체중증가율이 가장 높게 나타났으며, 갓김치군에서 가장 낮았으며 배추김치, 부추김치 순으로 낮았다. 실험군들 간에 유의한 차이가 없었으나 체중증가율도 대조군에 비해 김치섭취군에서 낮게 나타났다.

체중 당 장기 무게의 변화를 보면 간 무게는 대조군에 비해 김치섭취군들에서 높았으며 유의적인 차이는 없었으나 갓김치군에서 다소 높게 나타났다(Table 25). 신장 무게는 군들간에 거의 차이가 없었으며, 고환과 소장의 무게는 대조군에 비해 김치섭취군들에서 높게 나타났고, 소장의 길이 또한 대조군에 비해 김치섭취군들에서 길었으나 유의성은 없었다. 장기 중 비장은 김치섭취군들에서 높게 나타났으며 유의적인 차이는 없었지만 특히 갓김치군에서 대조군에 비해 크게 나타났다. 비장은 적혈구, 백혈구, 림프구 및 대식세포 등과 같은 면역계와 관련된 세포들로 구성되어 있어 대조군에 비해 김치섭취들에서 지방의 중량이 높은 것은 이러한 면역 세포들이 증가된 것으로 추정된다.

Table 24. Changes in body weight of hairless mouse fed various kinds of *kimchi* diet¹⁾ for 20weeks

Groups		Initial weight	Final weight	Weight gain rate ²⁾
Control		32.80±3.11 ^{NS}	37.74±3.88	0.006±0.011
<i>kimchi</i>	Korean cabbage	33.20±2.95	36.22±4.36	0.004±0.018
	Mustard leaf <i>kimchi</i>	33.75±1.50	34.44±1.40	0.003±0.015
	Leek <i>kimchi</i>	32.20±2.59	33.50±3.01	0.005±0.012

Values are Means ± S.D.

^{NS}Data are not significantly different from experimental groups.

¹⁾Diet was prepared as shown in Table 4.

²⁾Body weight gain(g/day)=Increased body weight(g)/112days

Table 25. Changes in organ weight of hairless mouse fed *kimchi* diet¹⁾ for 20weeks
(g)

Organs	Control	Korean cabbage <i>kimchi</i>	Mustard leaf <i>kimchi</i>	Leek <i>kimchi</i>
Liver	4.71 ± 0.22 ^{NS}	5.83 ± 1.40	6.11 ± 1.17	4.86 ± 1.12
Kidney	1.10 ± 0.28 ^{NS}	0.83 ± 0.09	0.85 ± 0.03	1.07 ± 0.33
Spleen	0.30 ± 0.09 ^{NS}	0.98 ± 0.78	1.48 ± 1.01	0.82 ± 0.87
Testis	0.39 ± 0.13 ^{NS}	0.60 ± 0.09	0.50 ± 0.12	0.58 ± 0.10
Small intestine	2.83 ± 0.43 ^{NS}	3.20 ± 0.17	3.28 ± 0.65	2.99 ± 0.34
	(40.92 ± 6.66) ²⁾	(41.30 ± 4.22)	(44.48 ± 2.25)	(42.42 ± 5.34)

Values are means ± S.D.

^{NS}Data are not significantly different from experimental groups.

¹⁾Diet was prepared as shown in Table 4.

²⁾The value in parenthesis represents the length(cm) of small intestine.

김 등(김지연 1997)에 의하면 김치의 숙성정도를 달리하였을 때 숙성된 김치첨가군에서 첨가비가 높을수록 낮은 피하지방조직을 보였으며, 지방 배설량이 증가되었고, 비장면역세포 증식 능력을 증가시켰다고 보고하였다. 김치가 혈액성상과 면역세포 배양액에 미치는 영향에서 김치의 섭취는 면역세포의 성장에 영향을 주고 특히 숙성김치에서 비장세포수가 많았으며, 혈소판 용적비율에서 유의적으로 낮아 조혈기능에 관여한다고 보고되어 있다. 김치 재료 중 고춧가루가 체액성 면역을 증강시키는 효과가 있어 이러한 김치의 성분들이 면역기능에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

나. 피부의 표피 및 진피에 미치는 영향

1) 표피층의 변화

가) 표피의 두께 변화

일반적으로 피부가 두껍다거나 얇다고 하는 것은 표피층의 두께를 의미하며 생리적인 노화가 진행됨에 따라 표피의 두께는 감소한다고 알려져 있는데 표피의 두께를 살펴본 결과 대조군에 비해 김치섭취군들에서 두꺼운 것으로 보였다(Fig.42). 이것을 형태 측정한 결과 평균 두께는 대조군이 0.017mm, 배추김치군 0.022mm, 갓김치군 0.021mm, 부추김치군 0.023mm로 나타났다(Table 26). 표피 두께의 증가정도를 대조군에 대한 비율로 나타내면 배추김치군은 대조군에 비해 31.0%, 갓김치군은 21.6% 그리고 부추김치군은 36.8% 각각 증가한 것을 알 수 있었다.

피부가 노화되면 피부의 표피가 얇아지는 특징 외에도 표피와 진피의 경계부가 점차 평평해지며 결합이 느슨해져 영양교환이 줄어드는 것으로 알려져 있다. 본 실험에

서 표피와 진피 사이의 경계부의 뚜렷한 차이는 구별할 수 없었으나 표피의 두께가 김치섭취군들에서 더 두껍게 나타나 김치의 여러 생리활성 물질들이 피부의 노화방지에 영향을 준 것으로 사료된다.

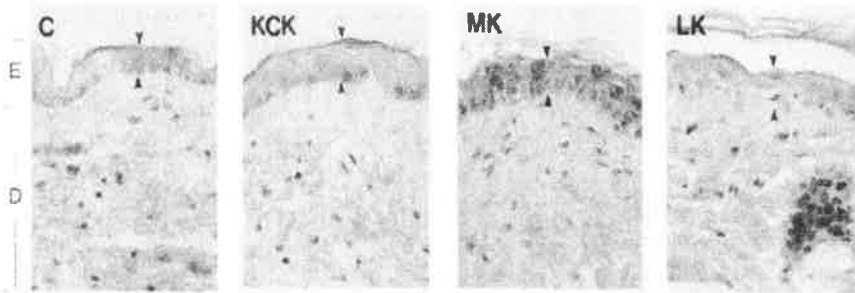


Fig. 42. Changes of epidermal thickness¹⁾ of hairless mouse fed various kind of kimchi diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Epidermal thickness was observed under light-microscopy($\times 400$) after stained with Hematoxylin & Eosin.

E: Epidermis. D: Dermis Epidermal thickness :C(Control group): 0.0171mm KCK(Korean cabbage kimchi diet group): 0.0224mm

MK(Mustard leaf kimchi diet group): 0.0207mm LK(Leek kimchi diet group): 0.0234mm

²⁾Diet was prepared as shown in Table 18.

나) 피부의 각질화에 미치는 영향

Cytokeratin은 피부의 각질층의 대부분을 차지하고 있으며 피부의 각질화에 관여하는 세포로 이것을 PAP(Peroxidase-Anti-Peroxidase) 염색한 결과 대조군에 비해 김치섭취군들에서 적게 나타난 것으로 보였다(Fig. 43).

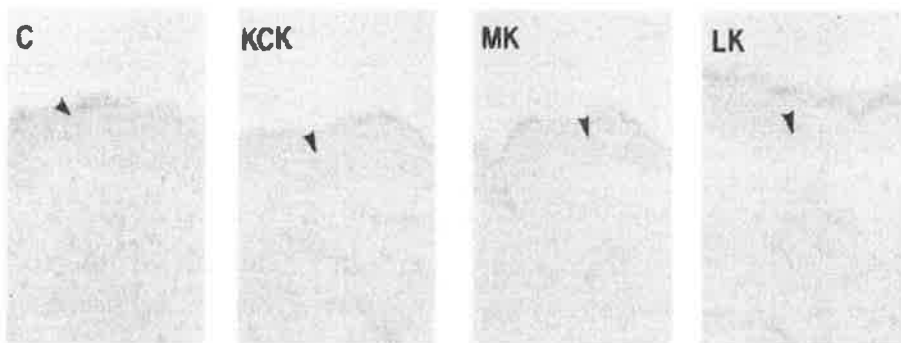


Fig. 43. Changes in epidermal cytochrome¹⁾ of hairless mouse fed various kinds

of *kimchi* diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Cytokeratin was observed under microscopy($\times 400$)after stained with Peroxidase- Anti-Peroxidases(PAP).

Bright red color is cytokeratin.

Staining area of Cytokeratin :

C(Control group): 0.0016mm² KCK(Korean cabbage *kimchi* diet group: 0.0007mm²

MK(Mustard leaf *kimchi* diet group): 0.0006mm² LK(Leek *kimchi* diet group): 0.0004mm²

²⁾Diet was prepared as shown in Table 18.

이것을 형태계측한 결과 cytokeratin의 염색 면적은 대조군 0.0016mm², 배추김치군 0.0006mm², 갓김치군 0.0007mm², 부추김치군 0.0004mm²로 나타났다(Table 26). 대조군에 대한 cytokeratin의 비율로 보면 배추김치군 -58.3%, 갓김치군 -62.2%, 부추김치군 -75.6% 순으로 모든 김치투여군들에서 cytokeratin이 대조군에 비해 50% 이상 적은 것으로 나타났다. 김치 섭취군들에서 cytokeratin이 적게 나타난 것은 김치의 성분들이 각질세포를 적게 형성하여 피부의 각질화를 적게 일어나도록 하는 것으로 사료된다.

Table 26. Image analysis on skin of hairless mouse fed various kinds of *kimchi* diet¹⁾ for 16weeks

	Control	Korean cabbage <i>kimchi</i>	Mustard leaf <i>kimchi</i>	Leek <i>kimchi</i>
Cytokeratin staining area(mm ²)	0.0016	0.0007	0.0006	0.0004
Epidermal thickness(mm)	0.0171	0.0224	0.0207	0.0234
Glycoprotein staining area(mm ²)	0.0014	0.0014	0.0012	0.0010
Type IV collagen staining area(mm ²)	0.0021	0.0020	0.0032	0.0016
Total collagen staining area(mm ²)	0.0102	0.0069	0.0057	0.0091

Data were calculates by image analysis program.

¹⁾Diet was prepared as shown in Table 4.

각질층은 피부의 제일 바깥부분으로 그 표면에서는 끊임없이 각질 조각이 벗겨져 떨어져 나가게 된다. 각질을 생성하는 keratinocyte는 표피의 90% 이상을 차지하며 barrier layer와 많은 cytokines을 생성하여 면역학적 염증분열이 활발하게 일어나 분열된 세포들은 위층으로 이동하여 표피의 세포들이 계속 교체되는데 기저층에 있

는 모든 각질세포에는 직경인 약 10nm인 filament가 포함되어 있으며 cytokeratin은 각질층에서 전체 단백질의 반 정도를 차지하게 된다(Albert 1989).

PAP 염색에 의해 나타난 cytokeratin의 변화에 근거하여 표피의 각질화 정도를 전자현미경으로 관찰한 결과 대조군에서 각질층은 중간원섬유들이 치밀하게 분포한 매우 두꺼운 각질층과 초기 각질층으로 그물조직으로 된 두꺼운 각질층이 보였으나 김치섭취군들에서는 각질층이 얇은 것으로 나타났다(Fig. 44). 즉 배추김치군에서는 대조군보다 얇고 치밀한 각질층이 2~3층으로 배열하고 있었으며 그물조직의 각질층은 거의 관찰되지 않았다.

갓김치군에서는 중간원섬유들이 덜 치밀하게 분포한 얇은 2~3층의 각질층과 치밀하지만 얇은 각질층이 보였으며 그물조직으로 된 각질층도 대체로 얇게 나타났다. 부추김치군에서는 대조군보다 얇은 치밀한 각질층이 2~3층으로 배열하고 있으며 그 위로 그물조직의 각질층이 보이면서 더 많은 각질층을 이루고 있었다. 이와같은 결과로 광학현미경상 PAP 염색에 의해 나타난 cytokeratin의 변화와 전자현미경상의 관찰에서 본 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

각질층은 겹겹의 세포로 되어있고 그 사이에 피지가 끼어 있어 이 지방질이 피부 수분의 증발을 막아줄 뿐만 아니라 유용한 성분들이 흡수되지 못하게 방해하고 표피 박리가 잘 안되면 표피 속의 불필요한 물질이나 세균들이 방출되어 나가지 못하기 때문에 피부미용에 장애가 될 수 있다. 각화가 순조롭게 진행되지 못하면 각질세포에 핵이 나타나게 되고 각질층은 두꺼워져 피부의 표면은 거칠어지게 된다. 동물성 단백질 및 비타민 A, C는 각화가 원활히 진행되도록 도와주는 것으로 알려져 있는데, 김치 속에는 비타민 C나 carotenoids 등이 많이 함유되어 있어 김치의 섭취는 피부의 각질화를 둔화시켜 피부 미용에 좋은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2) 진피층의 변화

가) Collagen 및 fibroblast의 변화

Collagen은 진피의 주된 성분으로 피부의 형태를 결정하고 피부내의 자연 보습을 담당하는 중요한 성분으로 이것을 관찰한 결과는 Fig. 45과 같다. 진피의 일정 면적당 전체 콜라겐의 염색 면적을 형태계측한 결과 대조군이 0.0102mm²인데 비하여 부추김치군 0.0091mm², 배추김치군 0.0069mm², 갓김치군 0.0057mm²의 순으로 적게 나타났다(Table 24). 결합조직은 피부세포와 분비기관들의 활동을 조정하고 피부조직의 기능을 활성화시키며 미생물의 공격으로부터 피부를 보호해주기 때문에 결합조직이 노화되면 피부기관 전체가 노쇠현상을 일으키게 된다고 할 수 있다.

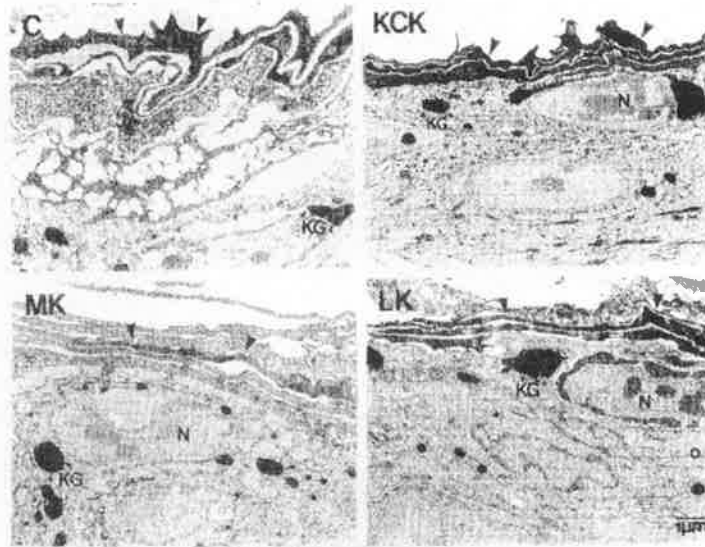


Fig. 44. Changes of desquamated keratinocyte¹⁾ in skin of hairless mouse fed various kinds of *kimchi* diet²⁾ for 16 weeks.

¹⁾Desquamated keratinocyte of stratum corneum in skin was observed under electro-microscopy ($\times 5000$) after stained with lead&acetate.

Black area represents stratum corneum, N : Nucleus KG : Keratohyalin Granule

²⁾Diet was prepared as shown in Table 3.

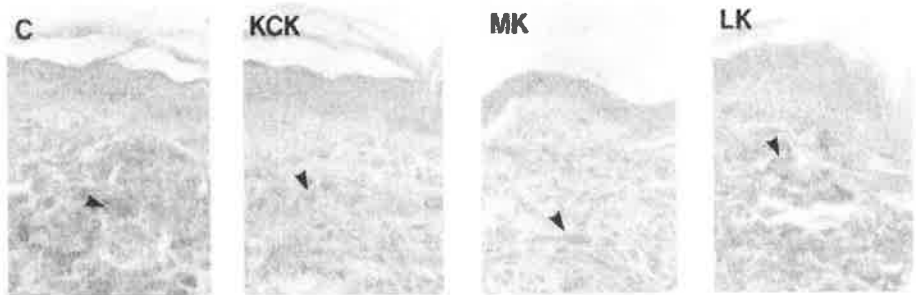


Fig. 45. Changes in dermal collagen¹⁾ of hairless mouse fed various kinds of *kimchi* diet²⁾ for 16 weeks.

¹⁾Collagen was observed under light-microscopy ($\times 400$) after stained with stained using van Gieson.

Red color is collagen.

Staining area of collagen

:C(Control group): 0.102mm^2 KCK(Korean cabbage *kimchi* diet group): 0.069mm^2

MK(Mustard leaf *kimchi* diet group): 0.057mm^2 LK(Leek *kimchi* diet group): 0.091mm^2

²⁾Diet was prepared as shown in Table 18.

Collagen의 형성에 관여하는 fibroblast의 변화를 전자현미경으로 관찰한 결과 대조군과 부추김치군에서는 세포질내 rough endoplasmic reticulum(RER)의 활성이 뚜렷하지 않았으나 갓김치군과 배추김치군에서는 활성이 증가하여 RER의 발달이 현저하였다(Fig. 46). 건강한 피부는 세포의 증식력이 활발해 새로운 세포층을 피부에 공급하여 피부를 젊게 하나 노화된 피부는 건강한 피부세포들에 비해 fibroblast의 RER의 활성이 감소되어 결국 collagen의 생성이 저하된 것으로 사료된다(Montagna 1965). Collagen을 생성하는 fibroblast는 RER이 풍부하고 그 안에는 무정형 물질이 들어있는데 이것은 procollagen 분자로 mucopolysaccharide와 함께 분비 소포의 형태로 방출되어 세포외에서 tropocollagen으로 되고 그 측면끼리의 중합으로 collagen이 형성된다.

전자현미경상 fibroblast의 RER의 활성이 대조군과 부추김치군에서는 활성이 크지 않아 이들 군에서 collagen은 재생력이 떨어져 이미 만들어져 있는 collagen이 질게 염색된 것으로 보이며, 갓김치군과 배추김치군에서는 RER의 활성이 커서 새로운 collagen을 많이 만들어 내고 있는 것으로 사료된다. Collagen의 성숙가교의 하나인 pyridinoline은 hydroxylysine 1분자와 hydroxyallysine 1분자가 결합하여 생성되는 collagen 미숙가교인 dehydrodihydroxy-lysinonorleucine과 hydroxy-allysine 1분자가 결합하여 생성되며 hydroxylysine의 생성에 비타민 C를 필요로 한다(Chan 1990). 따라서 갓김치군에서 특히 fibroblast의 RER 활성이 크게 나타난 것은 앞선 연구결과에서 collagen 합성에 관여하는 비타민 C의 함량이 갓김치에서 가장 높았던 원인으로 생각되며 비타민 C 뿐만 아니라 김치 중의 피부와 관련있는 무기질들 중 fibroblast의 합성에 관여하는 칼슘의 함량과 collagen의 cross linkage 형성을 도와주는 구리의 함량이 갓김치에서 높았기 때문으로 보인다.

나) 상피기저막의 Type IV collagen의 변화

피부의 기저막은 표피를 지탱하게 해주며 영양교환이 잘 이루어지도록 하는 역할을 하고 있으며(243), collagen 중 type IV collagen이 기저막에 많이 존재하여 영향을 주기 때문에 이것을 관찰한 결과 다른 군들에 비해 갓김치군에서 질게 염색된 것을 볼 수 있었다(Fig. 48). Type IV collagen의 염색면적을 형태계측한 결과 일정면적당 대조군에서는 0.0021mm², 배추김치군에서는 0.0020mm²으로 비슷하게 나타났으나 갓김치군에서는 0.0032mm²로 현저하게 증가되었고, 부추김치군에서는 0.0016mm²으로 감소되었다(Table 11). 대조군에 대한 비율을 보면 배추김치군과 부추김치군은 각각 -4.8%, -23.8% 감소하였으나 갓김치군에서는 52.4% 더 증가한 것을 알 수 있었다. Type IV collagen은 상피기저막의 형성에 중요한 역할을 하며 type IV collagen mRNA는 형태 유전학적인 변화가 심할 때 많이 발견된다(Simon-Assmann 1990). 이러한 결과로 보아 갓김치 성분들이 피부의 형태학적인 변화에 가장 큰 영향을 준 것으로 사료된다.

다) Glycoprotein 및 비만세포의 변화

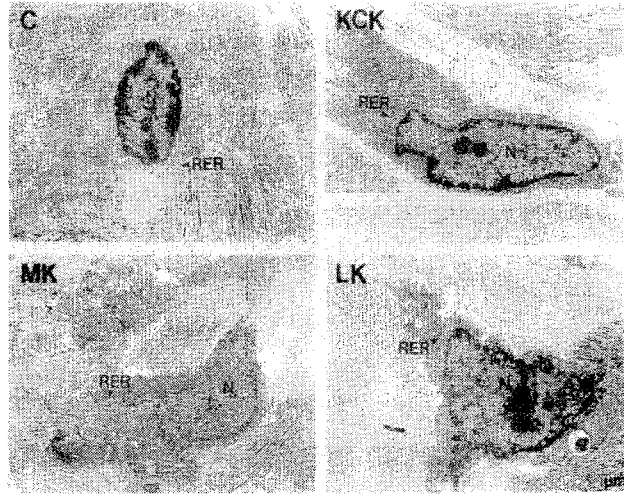


Fig. 46. Changes of rough endoplasmic reticulum¹⁾ in dermal fibroblast of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Rough endoplasmic reticulum in dermal fibroblast was observed under electro-microscopy($\times 5000$) after stained with lead&acetate.

*Means collagen fiber. RER: rough endoplasmic reticulum. N: nucleus

²⁾Diet was prepared as shown in Table 3.

피부에 존재하는 당질의 대부분은 진피에서 결합조직의 matrix에 기여하는 것으로 진피 glycoprotein의 염색면적은 대조군과 배추김치군에서는 0.0014mm^2 로 차이가 없었으나 갓김치군에서는 0.0012mm^2 (-14.3%), 부추김치군에서는 0.0010mm^2 (-28.6%)로 다소 감소하는 경향을 보였으나 군들간에 큰 차이는 없었다(Fig. 48). 피부에서 당질은 glycoprotein과 glycolipid로 plasma membrane과 desmosomes의 구성성분으로 세포기능 즉, 분화, 성장, 세포사이의 상호작용 및 receptor response 등의 많은 면에서 중요한 역할을 하고 있다.

진피의 기질은 collagen 사이를 채우는 무형물질로 점다당질이 주성분이고 이것은 아미노산 함유 다당질인 glycosaminoglycan(GAG)과 polypeptide로 구성되어 있다. GAG는 glycoprotein을 형성하기 위해 단백질 부분에 결합될 수 있다. 진피 기질의 성분으로 다당질인 GAG는 그 구조적 특성으로 인해 세포외 공간의 넓은 부분을 점유하고, 피부조직의 수분함량 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 노화에 따라 피부의 GAG 함량이 감소하게 되어 진피내 수분결합능력을 감소시켜 피부가 건조해지고 주름이 생기게 된다.

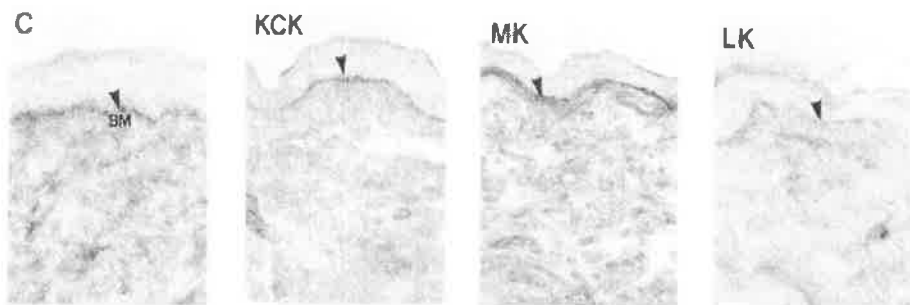


Fig. 47. Changes of Type IV collagen¹⁾ in basement membrane of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Type IV Collagen was observed under light-microscopy($\times 400$)after stained with DAKO LSAB Kit.

Red color is collagen IV. BM : basement membrane.

Staining area of Type IV collagen : C(Control group): $0.0021\mu\text{m}^2$

KCK(Korean cabbage *kimchi* diet group): $0.0020\mu\text{m}^2$

MK(Mustard leaf *kimchi* diet group): $0.0032\mu\text{m}^2$ LK(Leek *kimchi* diet group): $0.0016\mu\text{m}^2$

²⁾Diet was prepared as shown in Table 18.

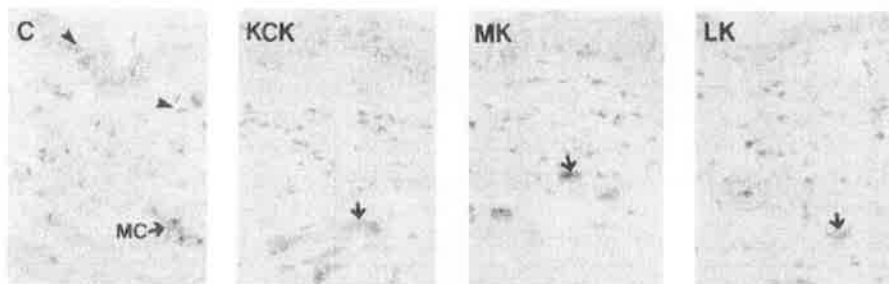


Fig. 48. Changes glycoprotein¹⁾ in skin of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Glycoprotein and mast cell was observed under light-microscopy($\times 400$)after stained with PAS-Alcian blue. Pink color represents glycoprotein. MC : mast cell

Staining area of glycoprotein :

C(Control group): 0.0014mm^2

KCK(Korean cabbage *kimchi* diet group): 0.0014mm^2

MK(Mustard leaf *kimchi* diet group): 0.0012mm^2

LK(Leek *kimchi* diet group): 0.0010mm^2

²⁾Diet was prepared as shown in Table 3.

비만세포는 heparin과 유사한 항응고제를 만들며, 모세혈관이 소정맥의 투과성을 높여주는 histamine, 그리고 민무늬근세포를 수축시키는 serotonin을 생산하여 분비하는 세포로, 대조군에서는 많은 출현을 보이지 않으며 세포의 크기가 작고 전자밀도가 치밀한 과립을 가지고 있었다(Fig. 48, 49). 김치를 투여한 군에서는 비만세포의

출현이 증가하였는데, 갓김치군에서는 짙고 치밀한 과립을 많이 가지고 있으며 배추김치군과 부추김치군에서는 짙고 치밀한 과립과 함께 옅고 큰 과립들도 많이 함유하고 있었다. 피부는 노화됨에 따라 비만세포 수가 감소하여 알레르겐이나 자극물질의 흡수가 감소되므로 알레르기의 빈도가 줄어드나 김치의 섭취는 비만세포의 활성이 대조군보다 크게 나타나 피부노화를 방지하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

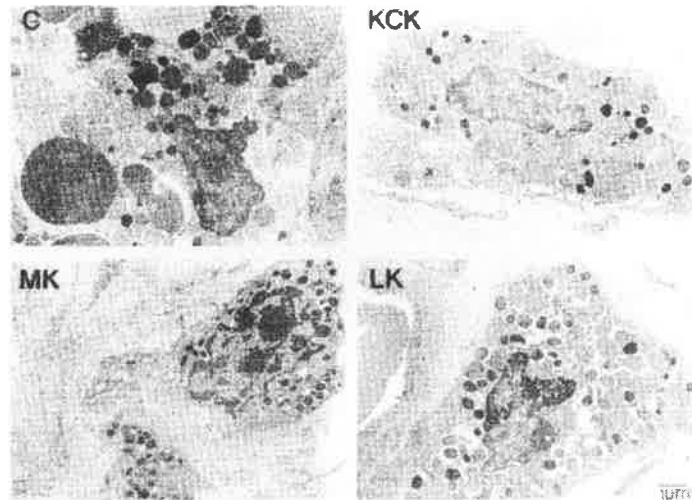


Fig. 49. Changes of mast cell¹⁾ in skin of hairless mouse skin fed various kinds of kimchi diet²⁾ for 16weeks.

¹⁾Mast cell was observed under electro-microscopy($\times 5000$) after stained with lead&acetate.

²⁾Diet was prepared as shown in Table 3.

6. 김치 식이 섭취에 의한 산화 억제 효과 및 활성산소 소거 효과

가. 김치 식이의 산화 억제 효과

1) 간 균질액에서 지질 및 단백질 산화 억제 효과

김치 식이를 20주간 섭취한 hairless mouse의 간 균질액에서의 지질산화 정도를 측정한 결과 대조군에 비해 김치섭취들에서 TBARS 함량이 모두 유의적으로($p < 0.05$) 낮게 나타났다(Fig. 50). 간균질액에 UV를 조사하였을 때 조사전보다 모든 군들에서 TBARS 함량이 증가되었는데 갓김치군과 배추김치군은 대조군보다 낮았지만 부추김치군에서는 더 높게 나타났다($p < 0.05$). 부추김치군에서 UV 조사에 의한 지질의 산화가 촉진된 것은 chlorophyll에 의한 것으로 추정되는데, chlorophyll은 녹색채소의 주색소로서 광선이 차단된 상태에서는 항산화 작용 및 free radical scavenger로 작용하여 지방질의 산화를 방지하지만 광존재 하에서는 광증감제로 작용하여 지질의 광산화를 촉진시킨다고 알려져 있어, 이러한 chlorophyll이 부추김치 중에 많이 함유되어

있었기 때문에 산화 촉진의 원인이 된 것으로 사료된다.

지질과 단백질은 생체막에 같이 존재하면서 서로 밀접한 관계를 유지하고 있다. 지질이 산화되면 지질의 peroxy radical과 이의 분해중간산물인 여러 종류의 aldehyde들이 인접한 단백질을 직접 산화시킬 것이며 간접적으로는 지질막의 유동성이 떨어져 이차적으로 막결합 단백질의 구조와 기능에 영향을 주게 된다. 따라서 세포의 산화상태 즉 노화정도를 알기 위해서는 지질과 단백질 산화를 같이 측정해야 한다. 간균질액에서 단백질 산화정도를 측정한 결과 protein carbonyl 함량은 모든 김치군들이 대조군에 비해 낮게 나타났으며, UV를 조사하였을 때 모두 단백질 산화가 증가하였으나 대조군과 유의한 차이는 없었다(Fig. 51).

2) 피부 균질액에서 지질 및 단백질 산화 억제 효과

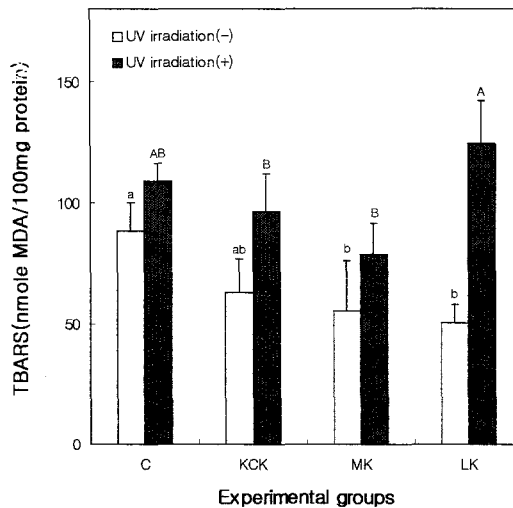


Fig. 50. Photosensitivity on lipid oxidation of liver homogenate irradiated by UV of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20weeks. ^{a, b, A, B} means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).
 C: Control group, KCK: Korean cabbage *kimchi* diet group
 MK: Mustard leaf *kimchi* diet group, LK: Leek *kimchi* diet group

김치를 섭취한 hairless mouse의 피부균질액에서 TBARS 함량을 측정한 결과 배추김치군과 갓김치군은 대조군보다 낮게 나타났으나 부추김치군은 대조군과 큰 차이가 없었다($p < 0.05$ Fig. 52). UV를 조사하였을 때 조사전보다 모든 실험군들에서 TBARS 함량이 증가되어 자외선 조사에 의해 지방의 산화가 촉진되었음을 알 수 있었는데, 갓

김치군과 배추김치군은 대조군보다 더 낮게 나타났으나 부추김치군에서는 더 높게 나타났다($p < 0.05$).

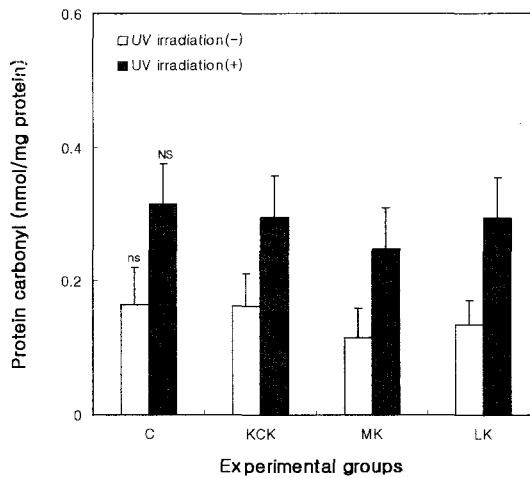


Fig. 51. Photosensitivity on protein oxidation of liver homogenate irradiated by UV of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20weeks.

NS Data are not significantly different from experimental groups.

C: Control group, KCK: Korean cabbage kimchi diet group

MK : Mustard leaf kimchi diet group, LK : Leek kimchi diet group

지질의 산화로 생성된 malondialdehyde는 amino기와 반응하여 protein과 cross-linking을 형성할 수 있어 피부의 단백질에 영향을 줄 수 있다. Davies 등 (251)에 의하면 지질의 산화시 생성되는 유리기들은 생체내의 단백질과 반응하여 이들을 파괴시킴으로서 protein carbonyl 화합물이 생성되고 이러한 단백질의 파괴는 지질 산화생성물인 hydroperoxide나 malondialdehyde 생성보다 먼저 일어난다고 하였다. 피부에서 단백질 산화 정도를 측정한 결과 UV 조사전 protein carbonyl 함량은 대조군에 비해 김치섭취군들에서 낮게 나타났으며 특히 갓김치군에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 53). UV를 조사하였을 때 조사전보다 protein carbonyl 함량이 모두 증가하였으며 대조군과 부추김치군에서는 protein carbonyl 함량이 증가정도가 컸으나 갓김치군에서는 산화정도가 낮게 나타났다. 나이가 증가함에 따라 단백질의 산화가 증가하며, UVA 조사시 피부의 단백질의 산화가 증가하게 된다. 갓김치는 다른 김치에 비해 비타민 C와 carotenoids 같은 항산화 물질이 많이 함유되어 있어 이것들이 자외선에 대한 보호효과가 있기 때문에 갓김치를 섭취한 군에서 산화가 억제된 것으로 사료된다.

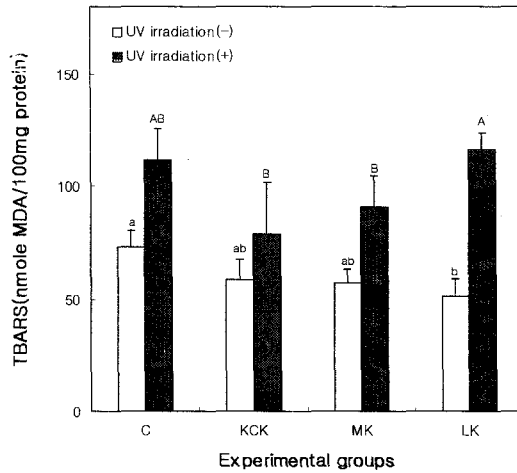


Fig. 52. Photosensitivity on lipid oxidation of skin homogenate irradiated by UV of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20weeks.

^{a-b} Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).
^{NS} Data are not significantly different from experimental groups.
 C: Control group
 KCK: Korean cabbage *kimchi* diet group
 MK: Mustard leaf *kimchi* diet group
 LK: Leek *kimchi* diet group

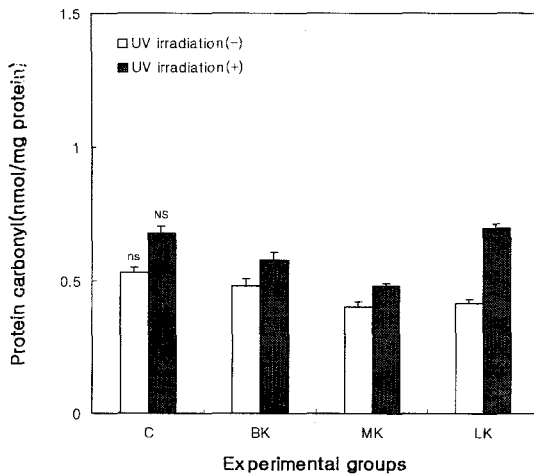


Fig. 53. Photosensitivity on protein oxidation of skin homogenate of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20weeks.
 NS Data are not significantly different from experimental groups.

C: Control group
 KCK: Korean cabbage *kimchi* diet group
 MK : Mustard leaf *kimchi* diet group
 LK : Leek *kimchi* diet group

나. 김치식이의 간에서 활성산소 소거 효과

동결건조한 김치 분말을 각각 10%씩 식이로 첨가하여 20주간 hairless mouse에 섭취시킨 후 간의 세포 소기관에서 활성산소 소거능을 측정한 결과 간의 mitochondria에서 superoxide anion 함량은 대조군에 비해 모든 김치섭취들에서 낮게 나타났으며 갓김치군에서 가장 낮았다(Fig. 54).

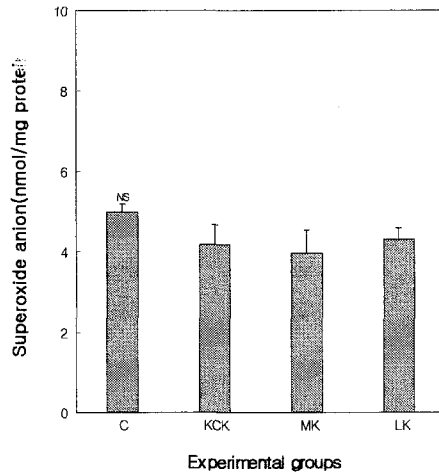


Fig. 54. Superoxide anion contents in hepatic mitochondria of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20weeks.

^{NS} Data are not significantly different from experimental groups.

C: Control group
 KCK: Korean cabbage *kimchi* diet group
 MK : Mustard leaf *kimchi* diet group
 LK : Leek *kimchi* diet group

생체내의 산화환원 과정에서 산소는 전자수용체로 관여하여 superoxide (O_2^-) 생성하고 SOD 효소에 의해 hydrogen peroxide(H_2O_2)가 생성된다. Superoxide anion은 collagen분자들의 cross-linking을 유도할 수 있어 collagen의 용해성을 변화시킬 수 있다. Collagen의 triple-helicle region은 superoxide anion radical에 의해 분열될 수 있으며, proline peptide bond의 radical에 의해 유도된 가수분해로 인해 collagen이 산화적 공격을 받기 쉽게 된다. Superoxide anion과 hydrogen peroxide는 hydroxyl radical을 형성하기 위해 함께 반응하고 이것은 모든 알려진 biomolecule을

공격하여 파괴시킬 수 있다.

간의 micrososome에서 hydrogen peroxide 함량은 모든 김치섭취군들에서 대조군보다 낮았으며 특히 갓김치에서 유의적으로($p < 0.05$) 낮게 나타났다(Fig. 55). Hydrogen peroxide는 생체내 catalase와 GSH-px와 같은 효소에 의해 제거되는데 동물에서 간과 적혈구에 많이 존재한다. 류 등에 의하면 흰쥐에 3%, 5%, 10% 수준으로 김치를 섭취시켜 간에서 항산화 효소의 활성을 측정한 결과 SOD와 GSH-px의 김치 섭취량이 높을 수록 활성이 높게 나타났다고 하였다. 따라서 catalase와 GSH-px같은 효소의 활성이 김치섭취군들에서 높아 hydrogen peroxide의 분해가 촉진되어 그 함량이 적게 나타난 것으로 추정된다.

Superoxide anion가 순차적으로 환원되어 생성되는 활성산소 중 hydroxyl radical 은 반응성이 매우 높아 생체의 상해에 있어 중심적인 역할을 하기 때문에 간의 mitochondria에서 hydroxyl radical 함량을 측정한 결과 갓김치군에서 가장 낮게 나타났다으나 실험군들간의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 56).

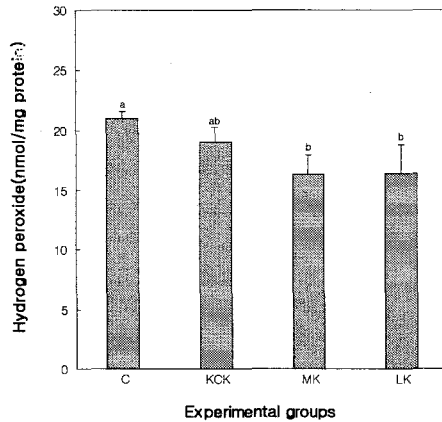


Fig. 55. Hydrogen peroxide contents in hepatic microsomes of hairless mouse fed various kinds of kimchi diet for 20 weeks.

^{a, b} Means with the different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

C: Control group

KCK: Korean cabbage kimchi diet group

MK: Mustard leaf kimchi diet group

LK: Leek kimchi diet group

활성산소는 핵산, 지질, 단백질 그리고 탄수화물 등과 반응하여 조직에 직접적인 상해를 유발하고 peroxy radical이나 과산화물들을 반응산물로 생성하여 이차적인 연쇄 반응을 일으키게 되는데, 생체가 radiation에 노출되거나 내부 효소반응에 의해서

생성되는 free radical은 단백질의 -SH기와 반응해서 효소의 활성을 잃게 하거나 가교결합을 촉진시키고, DNA, RNA, 효소, 세포막에 손상을 일으키게 된다. 생체내에는 유리기들에 의한 과산화적 손상으로부터 생체를 보호하는 비효소적, 효소적 항산화 방어계가 존재하며, 식품 중에는 비타민 C, tocopherol, 페놀화합물, carotenoids, selenium, mannitol 등이 있다. 김치 중에는 이미 밝혀진 바와 같이 이러한 항산화 물질들이 많이 함유되어 있어 김치의 섭취가 활성산소를 소거하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

7. 김치용매획분의 피부노화 억제 효과

가. 김치 용매획분 중의 피부노화 관련 성분 함량

Carotenoids는 지용성 색소로 hexane 층에 분리되어 나오기 때문에 hexane 층 중의 carotenoids 함량을 측정한 결과 배추김치 247.5mg%, 갓김치 603.0mg%, 부추김치 287.5mg%로 갓김치에서 가장 높게 나타났다(Table 27).

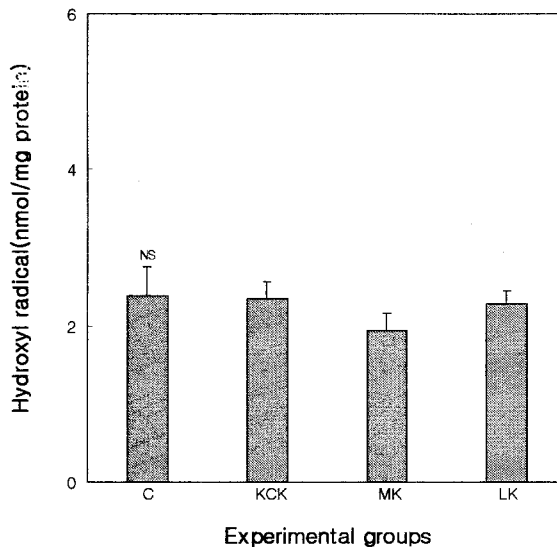


Fig. 56. Hydroxyl radical contents in hepatic mitochondria of hairless mouse fed various kinds of *kimchi* diet for 20weeks.

^{NS}Data are not significantly different from experimental groups.

C: Control group

KCK: Korean cabbage *kimchi* diet group

MK : Mustard leaf *kimchi* diet group

LK : Leek *kimchi* diet group

Table 27. Contents of carotenoids and total chlorophyll in hexane fraction of various kinds of freeze-dried kimchi

(mg%)

Samples	Hexane fraction	
	Carotenoids	Total chlorophyll
Korean cabbage kimchi	247.5±1.5	37.4±2.5
Mustard leaf <i>kimchi</i>	603.0±3.6	1125.9±173.4
Leek <i>kimchi</i>	287.5±2.5	3283.6±685.9

Values are Means ± S.D.

이러한 결과는 김치 주재료와 동결건조한 김치 중의 carotenoids 함량이 갓김치에서 가장 높게 나타난 것과 일치하였다.

Hexane 층 중의 총 chlorophyll 함량은 배추김치 37.4mg%, 갓김치 1125.9mg%, 부추김치 3283.6mg%로 부추김치가 배추김치에 비해 89배, 갓김치에 비해 3배 정도 높게 나타났다. 배추김치는 갓김치와 부추김치에 비해 녹색부분이 적고 발효되는 과정 중에 chlorophyll이 pheophytin으로 전환되어 chlorophyll이 많이 잔존하지 않은 것으로 추정되며, 갓김치와 부추김치에서는 chlorophyll 분해가 적게 일어나 그 함량이 많은 것으로 사료된다. 김 등에 의하면 김치 발효중의 chlorophyll 및 그 유도체의 함량 변화는 비타민 C에 의해 영향을 받으며 비타민 C의 함량이 많고 발효 중의 감소가 적은 김치에서 chlorophyll의 분해가 억제된다고 보고되어 있다.

비타민 C는 수용성으로 획분 중 EtOAc 층, BuOH 층, H₂O 층 중의 총 비타민 C의 함량을 측정한 결과 배추김치에서는 EtOAc 층 1390.0mg%, BuOH 층 1925.5mg% 그리고 H₂O 층에서는 280.0mg%로 BuOH 층에서 가장 높게 나타났다(Table 28). 갓김치 중의 총 비타민 C 함량은 EtOAc 층에서 2674.5mg%로 가장 높게 나타났고, BuOH 층에서는 2353.5mg% 그리고 H₂O 층에서는 802.5mg%로 나타났다. 부추김치 중의 총 비타민 C 함량은 EtOAc 층에서 1518.5mg%, BuOH 층에서는 1893.0mg%, H₂O 층에서는 1279.0mg%로 나타났다. 배추김치와 갓김치의 경우 EtOAc 층과 BuOH 층에 주로 비타민 C가 많이 들어 있었으며 H₂O 층에는 많이 남아 있지 않았다. 부추김치의 경우도 BuOH 층에 많았으나 H₂O 층에도 많이 들어 있었다.

배추와 갓, 부추와 같은 십자화과 채소 중에는 천연 항산화제인 페놀 화합물이 많이 함유되어 있어 용매별 김치 추출물들의 총 페놀 함량을 측정한 결과 배추김치는 CH₂Cl₂ 층에서 468.3mg%로 가장 높았으며 그 외의 획분층에서는 유사하게 나타났고 H₂O 층에서 가장 낮게 나타났다(Table 29). 갓김치는 EtOAc 층에서 381.3mg%로 가장

높게 나타났으며 다음으로 CH₂Cl₂ 층에서 높게 나타났고 hexane 층에서 가장 낮았다. 부추김치는 CH₂Cl₂ 층이 가장 높게 나타났으며 다음으로 EtOAc 층이 높았고, BuOH 층에서 가장 낮게 나타났다. 세 종류의 김치 획분 중 총페놀 함량은 부추김치의 CH₂Cl₂ 층과 EtOAc 층에서 가장 높게 나타났다.

Table 28. Contents of total Vit. C in various solvent fraction of freeze-dried Korean cabbage, mustard leaf and leek *kimchi* (mg%)

Samples	Solvent fractions		
	EtOAc fr.	BuOH fr.	H ₂ O fr.
Korean cabbage <i>kimchi</i>	1390.5±1.0	1925.5±0.8	284.0±1.1
Mustard leaf <i>kimchi</i>	2674.5±1.2	2353.5±1.1	802.5±0.8
Leek <i>kimchi</i>	1518.5±0.8	1893.0±1.0	1279.0±0.9

Values are Means ± S.D.

Table 29. Contents of total phenol in solvent fractions of Korean cabbage, mustard leaf and leek *kimchi* (mg%)

	Korean cabbage <i>kimchi</i>		Mustard leaf <i>kimchi</i>		Leek <i>kimchi</i>	
Hexane fr.	192.0	±14.2	93.8	±4.0	206.7	±22.2
CH ₂ Cl ₂ fr.	468.3	±25.5	300.7	±22.4	792.6	±44.6
EtOAc fr.	197.1	±4.5	381.3	±2.5	506.6	±16.1
BuOH fr.	208.3	±3.3	223.4	±76.3	118.9	±8.0
H ₂ O fr.	116.4	±8.5	113.1	±3.3	280.2	±14.0

Values are means ± S.D.

나. 김치 메탄올 추출물의 항산화성

산화 변질된 유지 중에 존재하는 과산화물은 주로 hydroperoxide이며, 이밖에 고리화된 peroxide와 이들의 중합체 및 과산화수소 등이 함유된다. Hydroperoxide는 유지의 자동산화 반응에서 생성되는 1차 생성물로서 과산화물의 측정(peroxide value)은 유지의 변질 정도를 알아내는 유력한 방법중의 하나이다.

세 종류 시료김치의 메탄올 추출물을 linoleic acid에 넣어 50°C에서 저장하면서 경시적으로 과산화물가를 측정한 결과 저장기간에 따라 과산화물가가 증가하는 경향이였다(Fig. 57) 저장 2일까지는 군간의 차이가 없었으나 저장 4일째 배추김치의 메탄올 추출물에서 급격한 증가를 보인 반면 갓, 부추김치의 메탄올 추출물에서는 비교적 완만한 증가를 보였다. 저장 6일째까지 배추김치는 계속 과산화물가가 증가하는 추세였지만 갓김치와 부추김치에서는 큰 변화가 없었다. 갓김치 속에는 비타민 C와 carotenoids 등이 배추김치나 부추김치에 비해 많이 함유되어 있으며 부추

김치도 배추김치에 비해 chlorophyll, 비타민 C와 페놀화합물 등과 같은 항산화 물질이 많이 함유되어 있어 지질산화를 억제하는 효과가 크게 나타난 것으로 보이며, 본 연구에서 고춧가루 등과 같은 부재료가 배추김치보다 많이 첨가되어 항산화성에 영향을 준 것으로 사료된다.

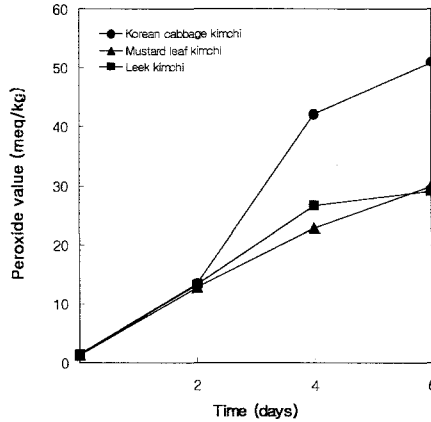


Fig. 57. Changes in peroxide value of linoleic acid emulsion incubated at 50°C for 6days in the presence of methanol extracts of various kinds of *kimchi*.

3) 김치 종류별 용매획분의 유리기 소거 효과

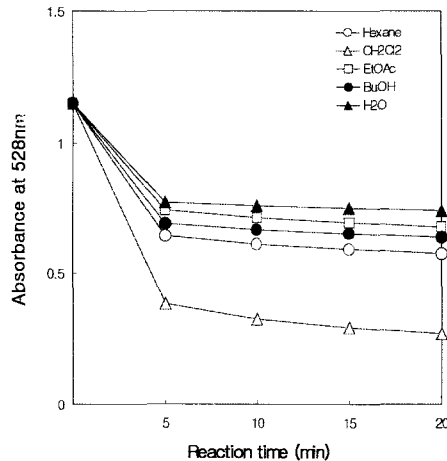


Fig. 58. Free radical scavenging effect of solvent fraction of Korean cabbage *kimchi* using 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH).

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 안정한 free radical로서 비타민 C, tocopherol, aromatic amine(ρ -phenylenediamine, aminophenol 등), polyhydroxy aromatic compounds(hydroquinone, pyrogallol 등)과 cysteine, glutathione과 같은 함유황아미노산 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되기 때문에 수소공여제나 free radical scavenger로서 항산화성을 측정하는데 사용되고 있다.

배추김치의 용매별 추출물의 수소공여성은 CH_2Cl_2 층에서 가장 높게 나타났으며, hexane층 > BuOH층 > EtOAc층 > H_2O 층의 순으로 수소공여성이 크게 나타났다(Fig. 58). 갓김치의 경우 EtOAc 층에서 가장 수소 공여성이 높게 나타났으며, CH_2Cl_2 층 > BuOH층 > H_2O 층 > hexane층의 순으로 수소공여성이 크게 나타났다(Fig. 59). 김에 의하면 생청갓과 청갓 김치의 EtOAc 층과 CH_2Cl_2 층이 methanol 추출물보다 항산화 효과가 높게 나타났고 특히 EtOAc 층이 DPPH 유리기에 대해 강력한 소거작용이 있다고 하였다.

부추김치의 경우 배추김치와 마찬가지로 CH_2Cl_2 층에서 가장 수소 공여성이 높게 나타났으며, EtOAc 층 > hexane 층 > H_2O 층 > BuOH 층의 순으로 낮게 나타났다(Fig. 60)

각 김치의 용매획분 중 주로 CH_2Cl_2 층과 EtOAc 층에서 유리기 소거능이 크게 나타나 이 획분층에 있는 성분들이 피부의 노화 억제와 자외선에 의해 유도된 광산화를 억제하는데 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

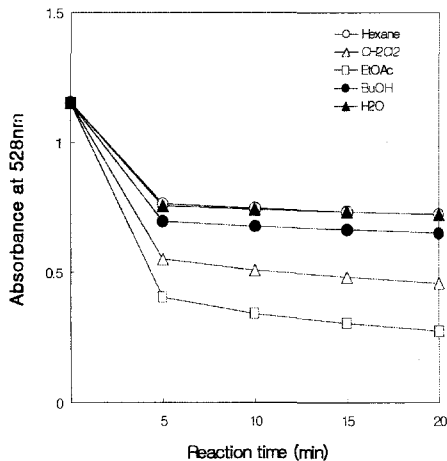


Fig. 59. Free radical scavenging effect of solvent fraction of mustard leaf kimchi using 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH).

다. 김치 용매획분의 광산화 억제효과

김치용매 획분을 피부 균질액에 일정농도로 첨가하여 UV를 조사하여 광산화를 유도한 후 지질과산화물의 함량을 측정한 결과 배추김치는 hexane 층과 H₂O 층에서 TBARS 함량이 높게 나타났으며, EtOAc 층에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 61).

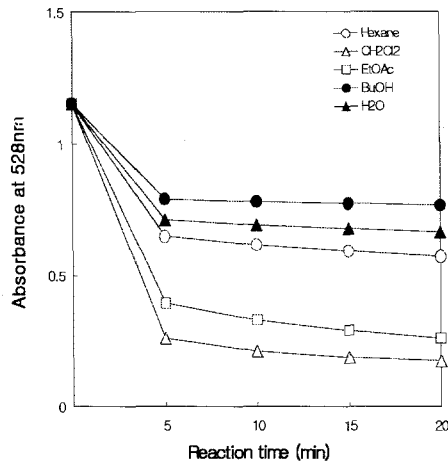


Fig. 60. Free radical scavenging effect of solvent fraction of leek *kimchi* using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH).

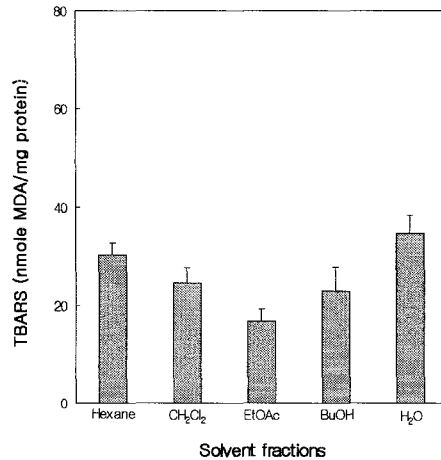


Fig. 61. Antioxidant effect of solvent fraction of Korean cabbage *kimchi* on UV irradiated mouse skin homogenates.

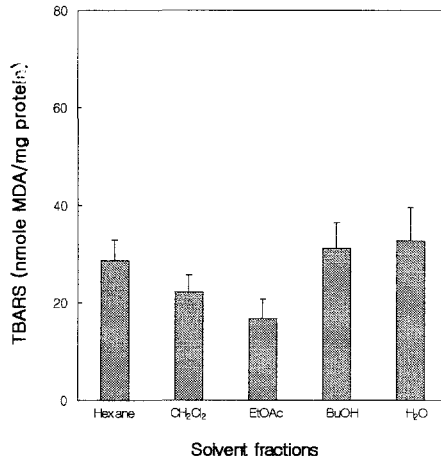


Fig. 62. Antioxidant effect of solvent fraction of mustard leaf *kimchi* on UV irradiated mouse skin homogenates.

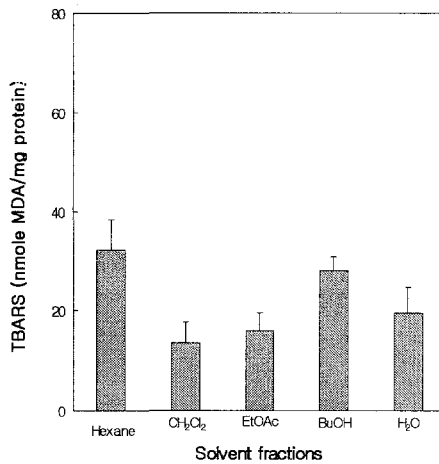


Fig.63. Antioxidant effect of solvent fraction of leek *kimchi* on UV irradiated mouse skin homogenates.

갓김치의 경우 BuOH 층, H₂O 층, hexane 층에서 TBARS 함량이 높게 나타났으며 EtOAc 층과 CH₂Cl₂ 층에서 낮게 나타났다(Fig. 62). 부추김치의 경우 hexane 층과 BuOH 층에서 TBARS 함량이 높게 나타났으며(Fig. 63), EtOAc 층과 CH₂Cl₂ 층에서 낮게 나타났다. 이러한 결과 대부분 항산화성이 높은 획분층에서 지방 산화가 적게

일어난 것을 알 수 있었으며 갓김치와 부추김치의 hexane 층에서 지질산화가 많이 일어난 것은 chlorophyll 등의 감광 물질의 광산화 작용에 의한 것으로 추정된다.

광선의 조사는 지방질의 산화를 촉진시킨다고 알려져 있으며 송의 연구결과에서 갓김치의 carotenoids 획분이 암소에서는 과산화물가와 conjugated dienoic acid 형성을 저해하여 높은 항산화 활성을 나타내었으나 광선 조사하에서는 과산화물가와 conjugated dienoic acid 함량이 크게 또한 지방질의 산화동안 chlorophyll과 carotenoids의 함량 변화를 측정했을 때 chlorophyll이 carotenoids보다 안정하여 chlorophyll류가 지방질의 산화를 촉진시킨 것으로 보고 있다.

라. 김치 용매획분 크림의 동물도포후 UV 조사에 의한 홍반억제효과

홍반(erythema)은 자외선을 오래 쬐게 되면 피부가 붉어지는 현상으로 UVB, UVC에서 주로 발생한다. 이런 반응은 자외선이 직접 혈관벽에 작용하여 생기거나 각질 형성세포에서 분비되는 히스타민, 프로스타글란딘 등이 혈관을 확장시키고 혈관벽의 투과력을 증가시켜 발생된다. 김치용매 획분들을 크림에 첨가하여 hairless mouse의 등에 일정량 도포하고 UVB를 조사하면서 홍반 여부를 관찰한 결과 배추김치의 경우 erythema relative index는 크림만을 바른 대조군에서 60.2%, hexane 층 33.1%, CH₂Cl₂ 층 15.8%, EtOAc 층 27.3%, BuOH 층 30.9% 그리고 H₂O 층에서는 25.4%였다(Fig. 64). 배추김치의 모든 획분층이 대조군보다 홍반이 적게 생성되었고 특히 CH₂Cl₂ 층에서 홍반생성 억제효과가 가장 크게 나타났다. 배추김치에서 홍반생성이 적었던 CH₂Cl₂ 층은 수소 공여성이 가장 크게 나타났던 획분 층과 일치하여 김치 속의 항산화 물질들의 항산화 작용에 의해 자외선에 대한 보호 효과가 크게 나타난 것으로 사료된다.

갓김치의 경우 erythema relative index는 대조군에서 55.5%, hexane 층 84.1%, CH₂Cl₂ 층 22.1%, EtOAc 층 15.2%, BuOH 층 36.7% 그리고 H₂O 층에서는 16.5%로 나타났다(Fig. 65). Hexane 층을 첨가한 크림에서는 대조군보다 홍반이 많이 생성되었으며 나머지 획분층은 대조군보다 모두 낮았고, 특히 EtOAc 층을 첨가한 크림에서 홍반생성 억제효과가 가장 큰 것을 알 수 있었다. 부추김치의 경우 erythema relative index는 대조군이 67.9%, hexane 층 86.6%, CH₂Cl₂ 층 45.1%, EtOAc 층 32.0%, BuOH 층 60.3% 그리고 H₂O 층에서 18.1%로 갓김치와 마찬가지로 hexane 층을 첨가한 크림은 홍반생성 억제에 효과가 없었으며, 항산화성이 컸던 획분층과 H₂O 층에서 홍반이 적게 생성되었다(Fig. 66).

전체적으로 볼 때 배추김치와 갓김치에 비해 부추김치에서 홍반이 많이 생성되었으며 부추김치의 hexane 층에서 홍반이 가장 많이 생성된 것을 알 수 있었다. 배추김치의 경우 hexane 층에서는 홍반이 많이 형성되지 않았으나 갓김치와 부추김치의

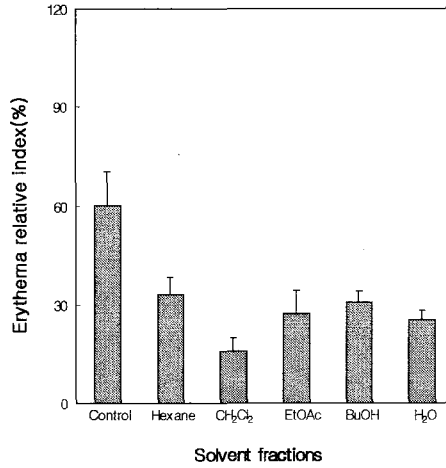


Fig. 64. Inhibiting effect of skin cream containing solvent fractions of Korean cabbage *kimchi* on erythema formation¹⁾ at hairless mouse skin after UV irradiation.

¹⁾Erythema formation was expressed as erythema relative index(%)

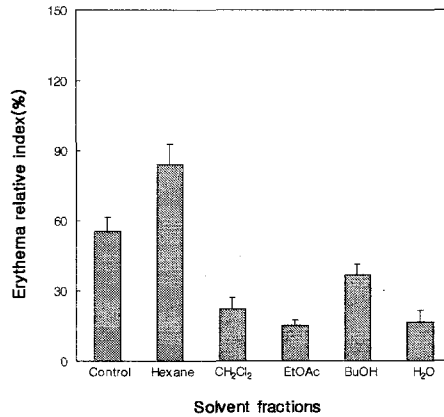


Fig. 65. Inhibiting effect of skin cream containing solvent fractions of mustard leaf *kimchi* on erythema formation¹⁾ at hairless mouse skin after UV irradiation.

¹⁾Erythema formation was expressed as erythema relative index(%)

경우 hexane 층에서 홍반이 크게 나타난 것은 chlorophyll의 감광작용에 의한 것으로 추정된다. 갓김치와 부추김치는 배추김치에 비해 항산화 및 광보호 효과가 있다고

알려져 있는 carotenoids가 많이 함유되어 있었으나 chlorophyll 또한 많이 함유되어 있어 carotenoids 단독으로는 광보호 효과가 있으나 chlorophyll과 함께 있을 경우는 chlorophyll의 감광작용을 억제하는데는 효과가 없었던 것으로 보인다.

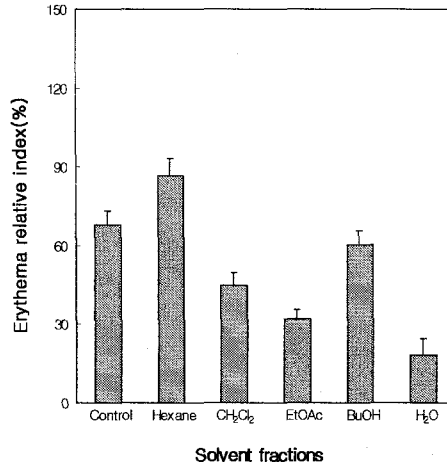


Fig. 66. Inhibiting effect of skin cream containing solvent fractions of leek kimchi on erythema formation¹⁾ at hairless mouse skin after UV irradiation.

¹⁾Erythema formation was expressed as erythema relative index(%)

배추김치의 CH₂Cl₂ 층과 갓김치의 EtOAc 층에서 홍반형성 억제효과가 크게 나타난 것은 수소 공여성이 가장 크게 나타났던 획분 층과 일치하여 비타민 C와 페놀화합물 등의 항산화 물질들이 많이 함유되어 있어 항산화 작용에 의한 것으로 보인다. *In vitro*에서 광산화 억제 결과에서는 큰 효과를 나타내지 않았으나 갓김치와 부추김치의 경우 H₂O 층에서도 홍반 억제 효과가 크게 나타난 것은 비타민 C 등의 항산화 성분의 영향으로 보이며, 김치의 항산화 물질 중 페놀화합물도 홍반생성 억제에 큰 영향을 준 것으로 추정되어 이에 대한 연구가 더 필요하리라 본다.

제 4 절 결론

한국인이 보편적으로 많이 섭취하고 있는 배추김치, 갓김치 그리고 부추김치 세 종류를 선정하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 김치의 피부노화 억제 효과를 살펴보았다. 먼저 김치와 김치재료 중 피부노화를 억제시키는 효과가 있는 항산화 성분인 chlorophyll, 페놀화합물, 비타민 C, carotenoids, 무기질 등의 함량을 분석하였으

며, 세 종류의 김치를 각각 식이의 10%씩 첨가하여 hairless mouse에 공급하였다. 사육 기간별로 피부에 나타나는 변화와 간에서의 활성산소 농도, 간과 피부의 균질액에 자외선 조사 후 광산화 억제효과, 용매분획 후 피부노화 억제 성분을 분석, 광산화 억제효과 및 홍반생성 억제능에 대한 실험을 행하였다. 그 결과 김치를 섭취한 hairless mouse의 피부는 피부두께가 두껍고 각질화가 적게 일어났으며, collagen이 합성이 활발해 특히 갓김치군과 배추김치군은 대조군에 비해 피부노화에 억제효과가 있었다. 김치 섭취시 활성산소 소거능을 측정한 결과는 간의 mitochondria에서 superoxide anion 함량은 대조군에 비해 모든 김치 투여군들이 낮게 나타났으며 갓김치군에서 가장 낮았다. 또한 항산화물질인 비타민 C 및 carotenoids 함량과 칼슘, 구리, 셀레늄의 무기질 함유량은 갓김치군에서 가장 높았다. 진피에서 collagen 형성에 관여하는 rough endoplasmic reticulum 활성에서는 갓김치와 배추김치군에서 현저히 발달하였으며, UV 조사후 갓김치군과 배추김치군은 대조군보다 광산화가 억제되었다. *In vitro*에서 확인된 김치의 피부노화억제에 관한 활성물질을 확인하기 위하여 갓김치의 메탄올 추출물의 과산화물가를 측정한 결과 항산화성은 갓김치에서 높았다. 이처럼 김치 속에는 많은 생리활성물질들과 항산화물질이 들어 있어 김치의 섭취는 피부 미용에 효과가 있고 더 나아가 피부 노화를 방지할 수 있다고 할 수 있는데 특히 세 가지 김치 실험군 중 피부 미용성이 가장 높은 것은 갓김치로 나타났다.

제 5 절 참고문헌

1. 최홍식 : 김치의 생화학적 특성. *동아시아식생활학회지*, 5(2), 89~99(1995)
2. 박건영, 최홍식 : 김치의 항돌연변이성 및 항암성. *김치의 과학*, 한국식품과학회 편, 서울, pp.205~225(1994)
3. Champion, R. H., Burton, J. L. and Ebling, F.J.G. : *Textbook of dermatology blackwell scientific publication.*(1992)
4. Gange, R.W. and Parrish, J.A. : Acute effects of ultraviolet radiation upon the skin. In *Photoimmunology*. Plenum Medical Book Co., New York, pp.77~94(1983)
5. Harman, D. : Aging : A theory based on free radical and radical chemistry. *J. Gerontology*, 11, 298~300(1956)
6. Albert, B., Baray, D., Lewis, J. and Raff, M. : *Molecular biology of the cell*, 2nd ed., New York ; Garland, pp.802~834(1989)
7. Chan, D., Lamanda, S.R., Cole, W.G. and Bateman, J.F. : Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix acculmulation *in vitro*. *Biochem.J.*, 269, 175~

181(1990)

8. Montagna, W.W. : Morphology of the aging skin ; cutaneous appendages. In Advances in the Biology of the skin. Oxford Pergamon Press, vol.6, pp.1~16(1965)
9. Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Freund, J. N., Perrin-Schmitt, F. and Kedinger, M. : Type IV collagen mRNA accumulates in the mesenchymal compartment at early stages of murine developing intestine. *The Journal of Cell Biology*, 110, 849~857(1990)
10. 곽연주, 전희정, 김정상 : 부추의 수확시기에 따른 클로로필, 무기질 및 superoxide dismutase 유사활성의 변화. *한국조리과학회지*, 14(5), 513~155(1998)
11. Gentile, J. M. and Gentile, G. J. : The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll containing plant extracts ; The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutation Res.*, 250, 79(1972)
12. Ohkura, K., Hori, H. and Terada, H. : Effect of extracellular calcium on the intracellular calcium level of newborn rat skin basal cells. *Biol, Pharm. Bull.*, 21(1), 1~4(1998)
13. Rayton, J.K. and Harris, E.D. : Introduction of lysyl oxidase with copper. *J. Biol. Chem.*, 254, 621~626(1979)
14. Vendeland, S.C.M., Belilstein, M.A. and Chen, C.L. : Purification and properties of selenoprotein from rat muscle. *J. Biol. Chem.*, 268, 17103~17107(1993)
15. 김지연, 이연숙 : 김치의 급여가 흰쥐의 체내 지질함량과 비장면역세포 증식능력에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 26(6), 1200~1207(1997)

제7장 항동맥경화성 김치무리의 개발

제 1 절 서 설

동맥경화는 혈관 내벽에 지질 및 기타 물질이 축적되어 발생하는 질환으로 심장질환 및 뇌졸중 등의 성인병질환을 일으키는 중요한 원인이기 때문에, 이의 발생을 억제하기 위한 많은 노력이 있어 왔다. 일반적으로 동맥경화의 발생을 억제하는 방법으로는 지질물질의 섭취저하, 흡수저하 및 배설을 촉진시키는 방법과, 체내 LDL 산화 및 간에서의 콜레스테롤 합성을 억제하는 HMG-CoA 환원효소의 활성을 억제시키는 방법이 알려져 있는데, 특히 항산화성이 높은 식품을 섭취하여 체내 LDL 산화를 억제하여 동맥경화를 예방하고자 하는 방법이 많이 사용되고 있다. 이에 식품을 섭취하여 동맥경화를 예방하고자 하였으며, 이러한 목적으로 동맥경화 예방용 식품을 개발하기 위해 연구를 거듭한 결과, 한국인의 심혈관계 질환의 발병율은 서구인에 비해 낮은 편이고, 이는 한국인의 항산화성 식이, 특히 한국인이 김치를 항상 섭취하고 있기 때문이라는 사실에 기초하여, 동맥경화를 예방할 수 있는 물질을 분리·동정하고 이에 기능성 김치를 제조하기 위한 기초연구로 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 김치섭취가 흰쥐의 동맥경화 예방에 미치는 영향

가. 실험동물의 사육 및 식이제조

3주령의 S.D 숫컷 36마리를 1주일간 고형사료로 적응시킨후 체중이 비슷한것이 4개의 군에 골고루 배치되도록 하여 각각 9마리씩 대조군, 3%, 5%, 그리고 10% 김치첨가군으로 나누어 한마리씩 대사 cage 에 넣어 사육한다. 김치속의 영양소량을 감안하여 에너지 level이 동일하게 식이를 조성하고 흰쥐의 체내 지방합성반응을 촉진시키기 위해 사료 100g 에 대해 당질로 설탕을 40g 씩 첨가하고, 지질로는 lard 를 사료 100g 에 대해 각각 10g 씩으로 첨가하여 사료를 조성한다. 동물은 6주간 사육하고, 1주일간격으로 흰쥐의 체중을 재고 사료 잔사량을 재어, 사료섭취량을 계산한다.

나. 실험동물의 처리 및 시료수집

흰쥐는 희생하기 14시간전부터 절식시키고 dry ice로 마취하여 개복하였다. 개복후 EDTA 10mg을 넣은 10cc용 주사기를 이용하여 심장에서 채혈하였고, 간장은 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하고 중량을 측정하여 액체 질소에 담근 후, -70℃에서 냉동 보관하였다.

Table 30. Composition of experimental diets (%)

	Control	Kimchi 3%	Kimchi 5%	Kimchi 10%
Casein	20	19.94	19.90	19.81
Sucrose	40	40	40	40
Corn starch	15.3	13.53	12.36	9.42
Corn oil	5	4.91	4.86	4.72
Lard	10	10	10	10
Cellulose	5	4.38	3.97	2.94
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
AIN-76 vitamin mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76 mineral mixture	1	1	1	1

토끼는 희생전 24시간 절식시킨 후, sodium pentobarbital(50mg/kg)을 후이개정맥에 주사하여 마취시킨 후 개복하였다. 헤파린으로 처리한 멸균주사기를 이용하여 복부하 대정맥에서 약 50ml 정도의 혈액을 수집하였다. 그리고 간과 심장, 대동맥 등의 조직을 적출하여 지방조직을 제거한 후, 각 장기의 무게를 측정하였고 생리 식염수로 혈액을 제거한 뒤, 바로 액체 질소에 넣어 얼린 후 deep freezer에 보관하면서 시료로 사용하였다.

다. 혈장과 지단백 획분의 분리

혈액을 10℃에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장만을 취하여, -20℃에서 냉동 보관하면서 분석용으로 사용하였다. 혈장으로부터 지단백 획분의 분리는 fixed angle rotor를 사용하여 초원심분리에 의한 sequential flotation method로 혈장으로부터 밀도가 다른 VLDL, LDL 그리고 HDL의 세 획분을 얻었다. 장시간의 초원심분리로 인한 지단백질의 변성을 방지하기 위하여 전 처리로서 혈장 2ml에 5,5'-dithio-(bis)-(2-nitrobenzoic acid) 0.08g을 용해시킨 후, VLDL과 동일한 밀도로 조제한 완충용액^a(d=1.006)을 8ml씩 가하고 fixed angle rotor를 이용하여 160,000g에서 1시간 30분 동안 초원심분리시켜서 VLDL 획분을 얻었다. 남은 혈장에 계산된 양의 고체 KBr을 첨가하여 LDL의 밀도가 되게 맞춘 다음 d=1.063으로 조절된 완충용액^b을 2ml씩 가하고 같은 조건에서 16시간 초원심분리시킴으로써 LDL fraction을 얻었다. 동일한 방법으로 나머지 용액에 고체 KBr을 첨가하여 HDL의 밀도가 되게 맞춘 다음 HDL과 동일한 밀도로 조제한 완충용액^c(d=1.161)을 가하고 24시간 동안 초원심분리시켜 HDL획분을 얻었다. 분리된 각 지단백 획분은 즉시 분석용 시료로 사용하였다.

라. 혈장 및 지단백의 지질성분 분석

1) 콜레스테롤 농도 측정

혈장 및 지단백중의 총 콜레스테롤 함량은 효소법에 의한 정량용 kit 시약 (Cholesterol E kit BC 108-E, 영동제약)으로 측정하였다. 시료 0.02m씩에 조제한 반응시약 3ml씩을 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 37℃의 water bath에서 5분간 반응시켜 500nm에서 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도값을 다음식에 대입하여 혈장 및 각 지단백분획의 콜레스테롤 함량을 구하였다.

$$\text{Cholesterol}(\text{mg}/100\text{m}\ell) = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{시료의 흡광도}} \times 300$$

2) 중성지방 농도 측정

혈장 및 지단백중의 총 중성지방 함량은 효소법에 의한 정량용 Kit 시약 (Triglyceride kit BC 118, 영동제약)으로 측정하였다. 실험방법은 총 콜레스테롤 측정시와 동일하고, 중성지방 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 546nm에서 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도값을 다음식에 대입하여 혈장 및 각 지단백 분획의 중성지방 함량을 계산하였다.

$$\text{Triglyceride}(\text{mg}/100\text{m}\ell) = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 300$$

마. 혈액의 정상

김치의 섭취가 혈액성상에 미치는 효과를 알아보기 위하여 김치섭취 흰쥐에서 백혈구 수, 적혈구수를 비롯하여 헤모글로빈, 헤마토크리트, 평균 적혈구 용적, 평균 혈색소량, 평균 혈색소 농도, 적혈구 분포폭, 혈소판수, 혈소판 분포폭, 평균 혈소판 용적, 혈소판 용적 비율을 자동혈액분석기인 Coulter Counter(Model : S-PLUS IV, COULTER Co., USA)를 사용하여 측정하였다. 그리고 혈액의 혈전용해능에 미치는 효과도 검사하였다.

바. Cell culture를 이용한 면역기능 연구

김치의 섭취가 혈액의 성상에 영향을 미친다면, 면역기능에 관계하는 비장, 골수 및 흉선 세포의 cell culture시 김치 추출물이 이들 세포의 생육에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 생쥐로부터 분리한 흉선, 비장과 골수를 grind하여 세포를 배지로 방출시키고(primary cell culture), cell pellet에 RBC lysis buffer를 넣고 방치하여

원심분리하였다. 상등액을 취한후, 세포수가 1×10^6 되게한 후 24 well plate에 넣는다. 5% CO₂ incubator, 37°C에서 DMEM 10% FCS 배지를 갈아주면서 배양한다. 배양시 방금 담긴 김치와 발효가 진행중인 김치 추출물을 첨가하여 배양한다. 대조군으로는 소금에 절인 배추 추출물을 이용하였다.

사. 혈액의 fibrin 용해능 조사

김치 섭취 흰쥐의 혈액에서 혈전 형성에 관여하는 fibrin 용해능을 '평판배양법과 disc를 이용한 평판법으로 비교 확인하였다. 그 효과가 김치의 섭취에 의해 유도된 plasminogen activator 생성때문인지, 다른 단백질합성증가에 의한 것인지 규명하였다.

아. *In vitro* 에서의 fibrin 용해능에 김치 부재료가 미치는 영향

김치 부재료 즉 배추, 고추, 마늘, 생강등의 추출물(methanol extract, petroleum ether extract, water extract)이 fibrin 용해능에 미치는 영향을 조사하여 혈전의 용해에 효과적인 성분을 preparative TLC로 확인하였다.

2. 김치재료가 토끼의 동맥경화 예방에 미치는 영향

김치의 혈중콜레스테롤 및 혈중 중성지방 강하효과를 세밀히 살펴보기 위하여 식이성 콜레스테롤로부터 쉽게 동맥경화판막을 형성하는 토끼를 실험동물로 하여 동맥경화를 유도하기 위해 식이에 1% cholesterol를 첨가하였다. 실험기간은 12주간으로 정하였고, 토끼는 각 군당 6 마리씩 control(pellet + cholesterol), 배추군(배추 8% + cholesterol 1%), 고추군(고추 1% + cholesterol 1%), 마늘군(마늘 1% + cholesterol 1%)로 나누었다. 실험기간별로 혈액을 채취하여 총콜레스테롤 (Sigma kit, No. 352-50) 및 중성지방(Sigma kit, No. 339-20)을 측정하였다. 혈장 중성지방 농도는 효소법으로 측정하고, 단백질의 농도는 modified Lowry 법으로 측정한다. 간조직의 지방은 Folch 등의 방법으로 추출하고, 총콜레스테롤, 그리고 중성지방 정량은 혈장 분석과 같은 효소법을 이용하되 turbidity에 의한 오차를 줄이기 위해 Sale 등의 방법으로 측정하였다.

가. 간의 지방 정량

토끼의 간을 2g씩 취하여 Folch 등의 방법을 수정하여 지방을 추출하고, chloroform으로 25ml이 되도록 정용하여 시료로 사용하였다. 간지방 추출액의 총 콜레스테롤 함량은 효소법에 의한 정량용 kit 시약(cholesterol E kit BC 108-E, 영동 제약)으로 측정하였다. 먼저 간지방 추출액을 0.1ml씩 취하여 wath bath에서 용매를 모두 휘발시킨 뒤 0.2ml의 ethanol에 용해하였다. 반응액과의 혼탁을 방지하기 위하

여 0.5% Triton X-100 0.5ml을 넣고 반응시약 0.5ml을 첨가하여 교반하였다. 이것을 37°C 수조에서 5분간 반응시켜 발색시킨 후, 증류수를 가하여 3ml이 되도록 하여 500nm에서 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 대입하여 혈장에서의 함량과 동일한 방법으로 총 콜레스테롤 함량을 구하였다. 간 지방 추출액중의 중성지방 함량은 효소법에 의한 정량용 kit 시약(Triglyceride kit BC 118, 영동제약)으로 측정하였다. 실험방법은 간의 총콜레스테롤 측정시와 동일하며 중성지방 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도값을 대입하여 중성지방 함량을 구하였다. 간지방 추출액중의 인지질 함량은 효소법을 이용하여 kit 시약(PL-E(OM), Iatron, Japan)으로 측정하였다. 간지방 추출액을 0.1ml씩 취하여 비등수 중에서 용매를 모두 휘발시킨 뒤 0.2ml의 증류수를 가하여 혼합하고 37°C의 water bath에서 5분간 반응시켜 발색한후 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 인지질 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도값을 다음식에 대입하여 인지질 함량을 계산하였다.

$$\text{인지질량(mg/dL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 300$$

나. CCK(Cholecystokinin)농도 측정

사육 8주째에 각군의 토끼를 24시간 절식시킨 후, 토끼의 후이개 정맥에서 혈액을 취한 뒤, 5분 동안 식이를 공급하고, 그 후, 15, 30, 45, 60분 간격으로 채혈하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 Sep-Pak cartridge를 통과시킨다. 췌장의 acini cell을 분리하기 위해 SD rat 수컷을 절식시킨 다음, 희생시켜 췌장을 취한다. 용출된 혈장에 acini cell 및 procion yellow starch를 넣고 37°C에서 배양한 뒤, acini cell에서 방출되는 amylase에 의해 procion yellow starch가 분해되면서 생성되는 발색물질의 생성량을 흡광도로 측정하여 CCK 농도를 계산하는 Liddle에 의한 bioassay법으로 측정하였다

다. CETP 활성 측정

CETP 반응기질인 CE-donor로서는 합성 HDL(HDLR), CE-acceptor로는 합성 LDL(LDLR)을 제조하며, 합성 HDLR은 agarose에 고정시켜 사용하였다. CE transfer활성 측정을 위해 [3H]-CE 로 표식된 [3H]-CE-HDLR을 CE-donor로, 그리고 동위원소 표식이 없고 cholesteryl ester 성분이 거의 없는 상태로 합성되어진 LDLR을 CE-acceptor로 사용하였으며, CETP source는 2주 단위로 수집한 혈장을 사용하였다. 또한 negative

control로는 토끼혈장 대신 phosphate buffered saline (pH7.4)를 넣었을 때 이동되는 CE의 방사능량을 측정하였다. 먼저 CETP 최적 반응조건을 찾았을 때 반응시간은 30분이 적합하였다. 배양이 끝난 반응액을 3000g에서 5분간 원심 분리하여 [3H]-CE-HDLR-agarose를 제거하고 상등액중 일부를 scintillation vial에 옮겨 5ml의 scintillation cocktail solution(Aquasol-2)을 넣었다. 각 시료의 방사능 활성은 liquid scintillation counter로 측정하였고 CETP 활성은 [3H]-CE-HDLR-agarose에서 LDLR로 이동되어진 % CE transfer로 나타내었다.

라. Microsomal HMG-CoA reductase 활성 측정

간에서 HMG-CoA reductase의 활성은 간조직으로부터 microsomes을 분리한 다음 homogenization buffer B로 가용화하였다. 가용화된 microsomes의 활성 변화를 측정하기 위하여 2mM NADPH 100 μ l, 1mM HMG-CoA 100 μ l 및 microsomal fraction 2.8ml를 혼합하여, spectrophotometer를 이용하여 350nm에서 시간에 따른 흡광도의 감소를 측정하였다.

마. 김치부재료 투여가 apolipoprotein 농도에 미치는 영향

Apolipoprotein 은 혈장에서 지질을 운반하는 운반체인 lipoprotein 을 구성하는 단백질이다. 각 lipoprotein 은 각각 특이한 조성의 apolipoprotein pattern 을 가지고 있으며, 식이의 종류에 따라 혈장 apolipoprotein 의 분포와 농도에 변화가 생긴다고 알려져 있다. 따라서 김치부재료별의 hypocholesterolemic effect 는 김치부재료 투여가 apolipoprotein의 합성이나 대사에 영향을 미침으로써 혈장 lipoprotein 의 농도에 변화를 초래하는 것으로 설명할 수 있을지도 모른다. 이를 검증하기위해 본 연구에서는 각군당 김치부재료를 투여하여 식후 상태에 있는 흰쥐의 간에서 apolipoprotein 분포를 조사하고자 한다.

바. 동맥조직의 지방침착도 측정

1) Sudanophilia

동맥은 희생한 토끼의 동맥판막(aortic valve)에서 회장의 분기점(iliac bifurcation)까지 절단하여 PBS buffer로 동맥혈을 씻어낸 후, 고정(fixation)전 준비단계로 formalin sucrose로 다시 세척하였다. 혈관조직에 붙어 있는 이 물질을 조심스럽게 제거한 뒤, 미세한 microscissors를 사용하여 종단을 개봉하였다. 개봉된 동맥을 70% ethanol로 세척한 후, 염색용액(0.5% sudan IV, 35% ethanol, 50% acetone)에 5~6분 염색시킨 후 80% ethanol 용액으로 탈색시켰다. 탈색된 혈관을 wax paper에 핀으로 고정시켜 두 식이군간 동맥내벽 형태를 비교하였다. 염색된 동맥경화성 병변을 촬영하여 사진으로 나타내었다.

2) SEM을 이용한 대동맥 내막의 미세구조 관찰

대동맥 조직을 1mm^3 으로 절단한 뒤, 0.1M-phosphate buffer(pH7.4)로 조제한 5% glutaraldehyde 및 0.1 M osmium tetroxide(OsO_4)로 고정한 뒤, 0.1M-phosphate buffer(pH7.4)와 증류수로 세척한 뒤, 30%, 60%, 90%, 100%의 acetone농도로 탈수한 뒤 critical point dryer을 이용하여 건조하였다. 건조된 조직은 ion sputter(Hitachi, Japan)을 이용하여 gold coating 하여 10kV에서 SEM(Hitachi S-4200, Japan)으로 미세구조를 관찰하였다.

사. 항산화효소계 측정

간조직에 대해 10배의 냉 50mM phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 glass teflon homogenizer로 균질화하였다. 간 균질액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 세포질 획분인 상층액은 catalase와 glutathione peroxidase 측정용 시료로 사용하였다. 세포질 획분을 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액은미토콘드리아 획분을 얻었다. 그 상층액은 Cu,zn-SOD를, 침전물은 Mn-SOD측정용 시료로 사용하였다. 분석 시까지 -80°C 에서 냉동보관하였다.

1) Catalase 활성측정

3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 간추출액의 상층액 $100\mu\text{l}$ 에 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0ml을 가하였다. 여기에 30mM H_2O_2 용액을 1.0ml을 가하여 240nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하여 catalase활성을 측정하였다.

2) Glutathione Peroxidase(GSH-px) 활성 측정

GSH-px 활성은 Flohe 등의 방법에 의해 기질로 H_2O_2 를 이용한 coupled enzyme assay 방법으로 측정하였다. GSH-px는 환원형 GSH를 GSSG로 산화시키며, 이것이 다시 GSH-reductase에 의해 GSH으로 환원될 때 NADPH는 산화되는데, 이런 NADPH의 산화 정도를 340nm에서의 흡광도 감소속도로 측정하였다. GSH-px의 활성은 NADPH의 분자흡광 계수 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 시료 0.1ml에 대해 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.0) 0.5ml, glutathione reductase(2.4U/ml) 0.1ml, 10mM GSH 0.1ml을 혼합하여 37°C 에서 10분간 preincubation 하여 1.5mM의 NADPH 0.1ml 가하고 1.5mM의 hydroperoxide solution 0.1ml을 가하여 340nm에서 3분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 비효소적 반응은 위와 같은 조건에서 1.5mM H_2O_2 를 가하지 않고 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소활성은 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 뺀 값을 다음식에 의해서 계산하였다.

$$A = 0.868(\Delta [\text{NADPH}] / [\text{GSH}]_{\text{ot}})(V_i/V_s)$$

A: 효소 활성, Δ [NADPH] : NADPH 농도변화, [GSH]₀: GSH의 처음농도, τ : 반응시간, V_i : 반응액 용량 및 V_s : 효소액 용량이다.

3) Cu, Zn-SOD, Mn-SOD 활성 측정

Oyanagui의 방법으로 사용하였으며 간조직액을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 농도별로 희석하여 시료로 사용하였다. 시료용액 0.5ml 또는 blank는 65mM phosphate buffer(pH 7.8) 0.5ml를 취한 후 50 μ l 75mM sodium-xanthine와 50 μ l 10mM hydroxylamine hydrochloride를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 preincubation 시켰다. 0.1unit/ml의 xanthine oxidase 0.2ml를 가한후 20분간 배양시키고, sulfanilamide용액 1ml와 0.02%(w/v)N-(1-naphthyl)ethylen diamine 1ml을 가하여 실온에서 20분간 방치 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 Cu, Zn-SOD 값을 구하였다. 본 방법의 SOD 1 NU(Nitrate Unit)는 측정계에서 생성되는 superoxide에 의한 반응이 검체중의 SOD에 의해 50% 저해될 경우의 반응역 중의 검체량(ID₅₀)을 나타낸다. Mn-SOD 활성은 간 조직액의 13,000rpm, 20min 원심 분리하여 얻은 침전물을 0.1% triton X-100에 녹인 것을 농도별로 희석하여 시료로 사용하였다. preincubation 하기전 4mM KCN 0.2ml을 첨가하였으며 Cu, Zn-SOD 측정과 동일하게 실시하였다.

아. 담즙 및 콜레스테롤 흡수에 미치는 영향

김치부재료 투여에 따른 콜레스테롤, 중성지방, 그리고 담즙의 흡수능을 조사하기 위해 해당재료를 투여한 실험동물을 대사 cage 에 수용하고 대변을 48시간 동안 수집하여 냉동건조시킨 후 -20 $^{\circ}$ C 에 보관한다. 대변중의 스테롤은 walter et al 의 방법으로 추출하고 콜레스테롤은 효소법으로 측정한다. 중성지방은 soxhlet 에 의해 추출된 total fat 에서 효소법으로 측정한다.

3. 김치의 수용성 및 지용성 성분의 LDL에 대한 항산화성

LDL의 산화를 억제시키는 것은 동맥경화를 억제시키는 것과 직접적인 관련이 있는 것으로 보고되고 있고 이에 김치의 물 및 지용성 성분을 추출하여 사람의 LDL에 대한 항산화성을 측정하였다.

가. *in vitro* 상에서 항산화력 측정

정상인으로부터 공복시 혈액을 채취한 다음 혈장을 분리하고, 혈장의 density를 1.21로 KBr로 높인 다음 50,000g에서 2시간동안 원심분리하여 LDL fraction을 얻었다. LDL의 단백질 농도가 100ug/ml, Cu⁺⁺의 농도가 2 μ M이 되게하고, 여기에 김치 물 추출 및 p-ether 추출물을 일정 농도 넣어 반응시킨 후 lipid peroxide 함량을 측정하였고, 동일한 반응 시스템으로 conjugated diene kinetics study를 하였다.

나. Bovine endothelial cell culture

동맥내벽 cell line을 이용하여 세포에 의한 LDL 산화를 유도 시킨 다음 여기에 김치 추출물을 첨가하여 LDL 산화에 의한 세포 손상을 어느정도 억제시키는가를 측정하였다.

4. 김치의 활성획분의 분리 및 LDL에 대한 항산화성 측정

김치 중 동맥경화 억제능이 있는 활성성분을 찾기위하여 용매로 추출하여, 헥산, 메탄올, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수층을 얻어 이들의 항산화력을 측정하였다. 사람으로부터 LDL을 분리하여 Cu^{++} 로 산화시킨 다음 이들 용매층을 첨가하여 산화정도를 lipid peroxide 및 conjugate diene kinetics로 측정하였다.

5. 배추의 동맥경화 예방 활성물질의 분리 및 활성획분 확인

앞의 실험에서 김치의 동맥경화를 예방할 수 있는 활성 물질이 무엇인지 확인하기 위하여 배추김치를 담근 다음 5°C에서 2주간 발효숙성시켰다. 이때 김치의 pH는 4.13, 산도는 0.75%, 염도 2.24%이었다. 동결건조한 김치는 용매별로 획분하여 헥산, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, butanol, 그리고 수층을 얻었으며 이들 각 획분의 LDL에 대한 항산화성을 TBARS의 측정과 conjugated diene kinetics 연구로 진행하였고, 활성이 큰 획분을 선택하여 콜레스테롤 1%와 김치 5%에 해당되는 활성획분의 양을 계산하여 식이에 첨가하여 토끼를 사육하면서 동맥경화 요인에 미치는 영향을 살펴보고, 여기에서 확인된 획분을 가지고 최종 활성물질을 분리동정 하였다.

가. 간의 인지질 지방산 조성 분석

Folch 등의 방법에 준하여 2g의 간조직에 50배의 chloroform-methanol(2:1, v/v)을 가하여 지질을 추출한 후 용매를 휘발시켜 TLC용 시료로 사용하였다. Silica gel 60G(Merck)를 사용한 TLC plate에 spot한 다음 전개용매(petroleum ether: ethyl ether: acetic acid, 82: 18: 1, v/v/v)로 전개시켜 TLC plate를 충분히 건조시킨 후 UV lamp를 쬐어 형광색으로 발색된 인지질 획분을 시험관에 긁어내어 모아, 여기에 chloroform : methanol = 2:1(v/v)용액을 넣고 vortex한 후, 여과(Toyo No.7)하고 질소 gas로 농축하였다. Lepage 방법에 의해 농축된 인지질 분획을 methylation 시키기 위해 BF_3 -methanol(14%) 용액 2.5ml과 혼합하여 100°C에서 60분간 가열하였다. 이것을 찬물에서 식힌 다음 6% K_2CO_3 5ml을 천천히 첨가하고 여기에 hexane 1ml을 가하여 혼합하고 10분간 3000rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 시료를 질소 gas로 농축한 후, 냉동고에 보관하면서 실험직전 hexane 1ml을 혼합하여 지질을 녹인 다음 1 μ l를 취하여 gas chromatography로 분석하였다.

나. 과산화물 측정

1) TBARS 측정

간에서의 TBARS 함량 측정은 다음과 같다. 0.4% TBA, 15% TCA, 2.5% HCl이 함유된 TBARS solution을 만든다. 조직 추출액 1ml에 TBARS solution 2ml을 가하여 95~100°C water bath에서 20분간 반응시켰다. 뜨거운 시료를 vortex해서 기포를 제거하고 찬물에서 식힌 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 TBARS의 농도는 malonaldehyde(MDA) 표준곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.

2) POV 측정

간에서의 POV함량 측정은 다음과 같다. 간 균질액을 5ml의 chloroform : methanol(2:1) 혼합액과 섞은 후 1,000g에서 5분간 원심분리해서 chloroform층 3ml을 취해 수기에 넣고 진공회전증발기로 45°C에서 건조시켰다. 여기에 acetic acid : chloroform(3:2/v:v) 혼합액 1ml 넣은 후, 제조한지 30분 이내의 냉장상태 KI 0.5ml을 첨가하여 혼합한 뒤 시료를 암실에서 5분간 방치하고, 0.3ml cadmium acetate를 첨가하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액을 353nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량곡선은 cumene hydroperoxide로 작성하였다.

다. LDL 산화능 측정

1) LDL 분리

12시간 절식한 건강한 사람으로부터 채취한 혈액을 10°C에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻은 다음 그 혈장으로부터 LDL을 분리하였다. 혈장으로부터 지단백 핵분을 분리하는 방법으로는 침전법, 전기 영동법, 초원심분리법 등 여러 가지가 있으나, *in vitro* 상에서 LDL 산화능을 측정하기 위한 실험용으로는 fixed angle rotor를 사용하여 초원심분리에 의해 LDL 만을 분리시켰다. 먼저 혈장의 비중을 1.30 g/ml로 높이기 위해 필요한 양의 KBr을 계산하여 이를 혈장에 첨가하여 녹인 다음 혈장 2ml씩 centrifuge tube에 취한 후, NaCl-EDTA 10ml을 혈장과 섞이지 않도록 조심스럽게 tube에 넣는다. 이를 12°C, 50,000rpm에서 2.5시간 원심분리하여 tube의 중간에 형성되는 LDL층을 분리시켜서 0.15M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 pH 7.4인 0.01M phosphate buffer로서 24시간 투석한 후, 0.45 μ m syringe-mountable filter에 통과시켜 살균하여 사용하였다. LDL의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 사용하여 Lowry법으로 정량하였다. 얻어진 LDL은 냉장보관하여 즉시 실험에 사용하였고, 한번 분리한 LDL은 3일 이상 사용하지 않았다.

2) LDL 산화능 측정

간 균질액과 0.1mg/ml의 LDL 단백질이 함유된 반응액에 LDL의 산화를 위해 Cu²⁺의 최종농도가 2μM가 되도록 첨가하여 2시간 동안 40℃에서 산화시킨 후 간에서의 TBARS 함량 측정과 동일하게 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 김치섭취가 흰쥐의 동맥경화 예방에 미치는 효과

가. 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

각 실험식으로 흰쥐를 6주간 사육하면서 실험식이 섭취량, 체중증가량 및 식이효율을 측정하였다. 실험기간중의 식이섭취량과 체중증가량은 김치를 3% 첨가한 군에서 대조군에 비해 각각 1.5%, 12% 증가를 보였을 뿐, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 식이섭취량에 대한 체중증가량을 백분율로 계산한 식이효율에 있어서는 대조군에 비해 3% 김치첨가군에서는 9%, 5% 김치첨가군에서는 12%, 10% 김치첨가군에서는 6%의 증가를 보였지만, 유의적인 차이는 없었다.

나. 혈장의 지질 및 단백질 함량

Table 31. Concentration of plasma lipids and protein of rat fed kimchi diet¹⁾ for 6 weeks

	Lipids(mg/dL)			
	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid	Protein
Control	88.43±6.36 ^a	72.02±15.06 ^a	207.96±26.20 ^a	86.35±3.72
Kimchi 3%	74.38±2.58 ^b	57.98±10.46 ^b	181.44±26.75 ^b	87.55±3.50
5%	66.89±3.88 ^b	65.44±4.26 ^{ab}	181.58±27.65 ^b	86.58±3.55
10%	73.92±9.06 ^b	42.35±15.71 ^b	184.26±30.47 ^b	83.15±3.69

Values are means ± SD(n=9).

^{ab} Data in columns were significantly different by one way ANOVA followed Scheffe's post hoc test at the 0.05 level of significance.

¹⁾ See the legend of Table 30.

흰쥐 혈장내 중성지질은 10% 김치를 먹인군에서 32% 저하하였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 혈장의 총 콜레스테롤 함량은 김치를 3%, 5%, 그리고 10% 먹인군에서 각각 16%, 24% 그리고 16% 저하됨이 관찰되었다(p<0.05) 따라서 김치의 섭취가

혈중 콜레스테롤농도를 낮출수 있는 것으로 나타났다.

다. 혈액의 thyroxine 농도

흰쥐의 혈장에서의 Thyroxine 중 Thyroxine(T₃)는 대조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 먹인군에서 각각 190%, 220%, 그리고 170% 증가함이 관찰되었다(p<0.05). Thyroxine (T₄)는 대조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 먹인군에서 각각 11%, 7%, 그리고 11% 증가함이 관찰되었으나 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 32. Concentration of plasma thyroxine hormone in rat fed kimchi diet¹⁾ for 6 weeks

	Thyroxine (μg thyroxine/dL)	
	Triiodothyronine	Thyroxine
Control	0.26±0.21 ^a	8.12±1.42
Kimchi 3%	0.76±0.23 ^b	9.00±2.06
5%	0.83±0.29 ^b	8.67±2.05
10%	0.70±0.35 ^{ab}	9.02±1.70

Values are means ± SD(n=9).

¹⁾ See the legend of Table 30

^{ab} Data in columns were significantly different by one way ANOVA followed scheffe's post hoc test at the 0.05 level of significance.

라. 간의 지질 및 단백질 함량

간장의 콜레스테롤함량과 중성지질함량을 측정하였다. 콜레스테롤 함량은 대조군에 비해 김치를 3%, 5% 그리고 10% 먹인군에서 각각 21%, 30%, 그리고 27% 감소됨이 관찰되었다(p<0.05). 중성지질의 함량은 대조군에 비해 김치를 3%, 5% 그리고 10% 먹인군에서 각각 14%, 36%, 그리고 37%로 감소됨이 관찰되었다(p<0.05). 따라서 간에서도 김치를 첨가한군에서는 농도의존적으로 콜레스테롤과 중성지방함량이 감소되는 현상이 관찰되었다. 간에서의 단백질함량은 대조군에 비해 김치를 3%, 5%, 그리고, 10% 첨가한군에서 각각, 26%, 30%, 그리고 33% 로 유의적으로 감소함이 관찰되었고 (p<0.05), 총지질함량도 대조군에 비해 김치를 3%, 5%, 그리고 10% 첨가한 군에서 각각 3%, 18%, 그리고 22% 로 유의적으로 감소함이 관찰되었다(p<0.05).

Table 33. Concentration of hepatic lipids of rat fed kimchi diet¹⁾ for 6 weeks

	Lipids(mg/dL)			
	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid	Total lipid
Control	20.24±4.15 ^a	11.10±2.24 ^a	1.16±0.10	73.3±20.3 ^a
Kimchi 3%	16.09±2.18 ^b	9.53±1.24 ^{ab}	1.27±0.12	65.9±13.1 ^{ab}
5%	14.22±3.07 ^b	7.15±1.92 ^b	1.27±0.16	55.8±10.9 ^b
10%	14.85±2.79 ^b	6.99±1.27 ^b	1.19±0.12	54.5±6.00 ^b

Values are means ± SD(n=9).

¹⁾ See the legend of Table 30

^{ab} Data in columns were significantly different by one way ANOVA followed scheffe's post hoc test at the 0.05 level of significance.

마. 간의 apolipoprotein 함량

간장에서의 apoprotein A 와 apoprotein B 함량을 측정한 결과는 Table 34와 같다. Apoprotein A 의 함량은 대조군에 비해 김치를 식이에 각각 3%, 5%, 그리고 10% 첨가한 군에서 각각 15%, 51%, 그리고 41%로 유의적으로 증가함이 관찰되었다(p<0.05). Apoprotein B 함량은 대조군에 비해 김치를 식이에 3%, 5%, 그리고 10% 첨가한군에서 각각 2%, 15%, 그리고 20%로 농도의존적으로 유의적으로 감소함이 관찰되었다(p<0.05). 한편, Apo A/Apo B 의 비를 조사한 결과, 대조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 첨가한 군에서 각각 19%, 74%, 그리고 78% 로 농도의존적으로 유의적으로 증가함이 관찰되었다(p<0.05).

Table 34. Concentration of hepatic apoA-1, and apo B and its ratio of rat fed kimchi diet¹⁾ for 6 weeks

	Apo A-1 (mg/g)	Apo B (mg/g)	ApoA-1/ApoB
Control	1.62±0.47 ^c	16.35±2.90 ^a	0.14±0.03 ^p
Kimchi 3%	2.47±0.24 ^{bc}	14.61±2.79 ^a	0.17±0.04 ^b
5%	3.72±1.21 ^a	12.83±2.52 ^b	0.27±0.08 ^a
10%	3.11±0.58 ^{ab}	12.52±0.93 ^p	0.24±0.03 ^a

Values are means ± SD(n=9).

¹⁾ See the legend of Table 30

^{ab} Data in columns were significantly different by one way ANOVA followed scheffe's post hoc test at the 0.05 level of significance.

바. 분변의 지질 함량

분변에서 콜레스테롤과 중성지방, 총지방함량을 측정하였다. 콜레스테롤 함량은 대

조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 첨가한 군에서 농도의존적으로 각각 6%, 34%, 그리고 38%로 유의적으로 증가함이 관찰되었다($p < 0.05$). 증성지질의 함량은 대조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 첨가한 군에서 농도의존적으로 각각 55%, 66%, 그리고 120%로 현저한 증가가 관찰되었다($p < 0.05$). 총지방함량은 대조군에 비해 3%, 5%, 그리고 10% 김치를 첨가한 군에서 각각 40%, 35%, 그리고 44%로 유의적으로 증가함이 관찰되었다($p < 0.05$).

사. HMG-CoA reductase 활성

김치군의 HMG-CoA reductase 활성은 김치 3, 5, 그리고 10%군에서 3.99, 3.52, 그리고 3.69 nM/min/mg microsomal protein으로 대조군에 비해 김치군에서 농도 의존적으로 활성이 낮게 나타났다(Fig. 67, $p < 0.05$). HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성을 조절하는 효소로서 이 효소의 활성이 떨어진다는 것을 콜레스테롤의 생합성이 잘 되지 않기 때문에 혈중 콜레스테롤 농도를 떨어뜨릴 수 있는 기작으로 작용할 수 있게 된다. 따라서 본 실험에서도 김치군에서 혈중 지질농도가 대조군에 비해 감소했던 이유 중에는 HMG-CoA reductase가 김치군에서 활성이 억제되었기 때문으로 생각된다.

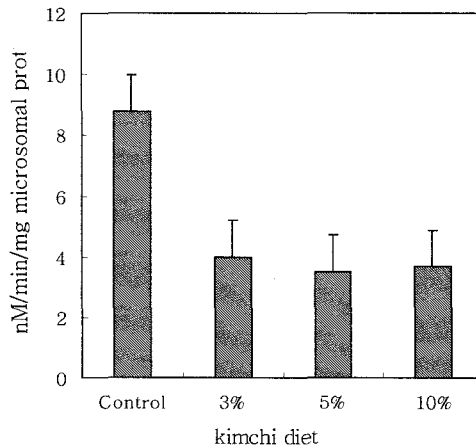


Fig. 67. Hepatic HMG-CoA reductase activity of rat fed kimchi diet for 6 weeks.

2. 김치가 혈액성상과 혈전용해능에 미치는 영향

가. 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

각 실험식이로 흰쥐를 6주간 사육하여 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율을 측정하였다. 실험기간 중의 식이섭취량과 체중증가량은 대조군에 비해 김치 5% 섭취군과 김치 10% 섭취군은 거의 비슷한 결과를 나타내었고 김치 3% 섭취군에서는 식이섭취량이 1.5%, 체중증가량이 12%의 증가를 보였으나, 유의적인 차이는 없었다. 식이섭취량

에 대한 체중증가량을 백분율로 계산한 식이효율에 있어서는 대조군에 비해 유의적인 차이는 없었으나 김치 3% 섭취군에서는 9%, 5% 섭취군에서는 12%, 그리고 10% 섭취군에서는 6%의 증가를 보였다. 이러한 결과로 부터 김치의 특성, 가령 매운맛, 익은 것 갈항 등은 흰쥐의 식이섭취량과 체중증가를 다소 감소시키긴 하였으나, 식이효율은 도리어 증가시켰다고 생각된다(Table 35).

Table 35. Food intake, body weight gain and feeding efficiency in rats fed kimchi-free diet or diets containing of 3%, 5%, and 10% kimchi.

	Control	Kimchi 3 %	Kimchi 5 %	Kimchi 10 %
Body weight gain(g/day) ¹⁾	5.4 ± 1.0 ^{1)NSZ)}	6.0 ± 0.7	5.8 ± 1.0	5.3 ± 0.9
Food intake(g/day) ⁴⁾	16.9 ± 2.4 ^{NS)}	17.1 ± 2.1	15.7 ± 1.8	15.7 ± 1.7
Feeding efficiency(%) ⁵⁾	0.32 ± 0.03 ^{NS)}	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.04

1) Values are means ± SD(n=9).

2) Not significant

3) Body weight gain (g/day) : increased body weight g/42 days

4) Food intake (g/day) : total food intake g/42 days

5) Feeding efficiency (%) : (Body weight gain g/Food intake g) × 100

나. 혈액 정상

6주간 사육된 생쥐에서 얻어진 혈액으로 행한 검사는 아래 Table 36 와 같다. 표에서와 같이 김치를 섭취한 군이 대조군에 비해 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트(Hct), 평균 적혈구 용적(MCV), 평균 혈소판 용적(MPV)이 높게 나타났고 적혈구 분포폭 (RDW), (PCT)는 감소시켰다. 특히 김치 10% 섭취군에서는 대부분의 지표들이 대조군에 비해 높게 나타났으며 백혈구 수에서 김치를 섭취한 군이 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였으며 특히 김치 10% 섭취군에서는 큰 차이를 나타내었다. 또 적혈구와 관련된 지표들 즉, RBC, Hct, MCV, RDW가 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였고 혈소판과 관련된 지표 중 평균 혈소판 용적(MPV), (PCT)에서 김치 10% 섭취군이 유의적인 차이를 보였다. 이와 같은 사실에서, 백혈구의 증가는 김치 자체의 각종 성분에서 기인하거나 유기산 발효에 의해 생성된 lactate, succinate 등의 비휘발성 유기산, acetate, propionate같은 휘발성 유기산, 또 호기성 세균, 효모, 곰팡이들이 관여하는 다른 발효과정으로도 생성될 수 있는 당류, 아미노산류 등의 2차 대사적 생리 활성 물질이 면역에 어떤 영향을 미칠 수 있음을 보여주며, 적혈구 관련 지표의 전반적인 상승에서 김치가 조혈작용에도 관여할 수 있다는 가능성을 보여주었다.

Table 36. WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, PDW, MPV, PCT in blood of rats adapted to a kimchi-free diet or diets containing kimchi of 3%, 5%, and 10%

	Control	김치 3% 섭취군	김치 5% 섭취군	김치 10% 섭취군
WBC($\times 10^9/L$)	14.33 \pm 1.52 ^a	13.67 \pm 1.73 ^a	16.50 \pm 2.18 ^{ab}	17.04 \pm 2.36 ^b
RBC($\times 10^{12}/L$)	7.42 \pm 1.45 ^a	7.86 \pm 0.92 ^a	7.89 \pm 0.88 ^a	9.03 \pm 0.27 ^b
Hgb(g/dL)	12.53 \pm 1.31 ^a	13.25 \pm 1.03 ^{ab}	13.43 \pm 0.72 ^{ab}	14.44 \pm 1.16 ^b
Hct(Ratio)	35.14 \pm 4.56 ^a	37.62 \pm 4.81 ^{ab}	37.52 \pm 4.99 ^{ab}	42.24 \pm 5.62 ^b
MCV(fL)	46.02 \pm 0.93 ^a	47.90 \pm 1.52 ^a	47.49 \pm 2.34 ^a	49.58 \pm 4.34 ^b
MCH(pg)	16.32 \pm 0.42	16.60 \pm 0.72	16.54 \pm 0.63	16.83 \pm 0.92
MCHC(g/dL)	35.46 \pm 1.06	34.67 \pm 1.45	34.89 \pm 1.48	34.07 \pm 1.19
RDW-CV(* *)	34.81 \pm 4.80 ^a	35.16 \pm 5.83 ^a	30.97 \pm 7.71 ^a	21.28 \pm 4.68 ^b
PLT($\times 10^9/L$)	820.22 \pm 56.83	865.11 \pm 66.70	878.56 \pm 19.58	857.33 \pm 79.24
PDW(%)	14.61 \pm 0.52	14.71 \pm 0.65	14.46 \pm 0.44	14.34 \pm 1.01
MPV(fL)	9.47 \pm 0.92 ^a	9.18 \pm 1.01 ^b	9.04 \pm 0.57 ^b	10.21 \pm 1.77 ^c
PCT	0.88 \pm 0.04 ^a	0.80 \pm 0.09 ^b	0.79 \pm 0.05 ^b	0.74 \pm 0.10 ^c

¹⁾Values are means \pm SEM(n=9), All groups were sacrificed after 24hrs fasting. Data were analyzed by one-way ANOVA and Fisher's significant difference test whether mean were different between groups.

²⁾WBC(white blood cells), RBC(red blood cells), Hgb(hemoglobin), Hct(hematocrit), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW-CV(red distribution width), PLT(platlet), PDW(platlet distribution width), MPV(mean platlet volume), PCT(pletcrit)

3. 김치가 *in vitro* 에서 생쥐의 면역활성에 미치는 영향

가. 생쥐의 비장세포 배양에 미치는 영향

절인 배추, 갓 담근 김치, 숙성김치의 추출물이 첨가된 배양액으로 생쥐의 비장세포를 배양한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 37). 대조군의 경우 배양기간이 경과함에 따라 세포수가 빠른 속도로 줄어들어 배양 12일째는 처음의 28% 수준으로 되었으며, 절인 배추는 비교적 완만하게 감소하는 경향을 보여 거의 반 정도로 줄었다. 갓 담근 김치와 숙성김치의 경우는 약간의 차이는 있으나 세포수가 그다지 줄지 않고 일정 수준을 유지하는 경향을 나타내었다.

Table 37. Spleen cell culture

days	Cells $\times 10^4$ / ml , mean \pm S.D. (n=4)			
	A	B	C	D
0	245.0 \pm 12.4	223.3 \pm 3.8	217.3 \pm 2.5	233.0 \pm 4.6
4	165.5 \pm 4.1	213.0 \pm 4.8	255.5 \pm 1.9	239.5 \pm 7.7
8	113.5 \pm 4.1	141.0 \pm 4.2	234.5 \pm 3.8	331.5 \pm 1.9
12	69.0 \pm 2.6	117.5 \pm 1.9	213.5 \pm 1.9	253.0 \pm 5.3

A : Control , B : Brined chinese cabbage

C : Fresh kimchi , D : Fermented kimchi for 1 week

비장은 생체내에서 혈액을 통하여 침투한 항원이 대식세포와 B 림프구, T 림프구 등과 상호 작용하여 면역반응이 일어나는 장소로 잘 알려져 있는데 위의 결과로 볼 때 김치는 비장의 면역관련 세포들의 성장에 좋은 영향을 미쳤다고 볼 수 있다.

나. 생쥐의 골수세포배양에 미치는 영향

절인 배추, 갓 담은 김치, 숙성된 김치 추출물을 첨가한 배양액에서 생쥐의 골수세포를 배양한 결과 Table 38 같은 결과를 얻었다. 대조군의 경우 배양기간이 경과함에 따라 세포수가 80% 이상 현저히 감소되었고, 절인 배추는 세포수가 비교적 완만히 감소하였다. 갓 담은 김치와 숙성김치는 배양 8일째까지 세포수가 증가하다가 12일째 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 김치가 골수의 stem cell의 분화와 성숙에 영향을 주었는지 성숙한 면역세포의 생존을 연장시켰는지는 정확히 알 수 없으나, 비장세포의 경우처럼 골수에 존재하는 여러 가지 면역세포의 성장에 영향을 미쳤기 때문이라 생각된다. 골수세포에 대한 이러한 효과는, 김치가 면역세포의 성숙에 영향을 미칠수 있으며, 결과적으로 면역반응에도 영향을 미칠 수 있음을 시사하는 것이라 하겠다.

Table 38. Bone marrow cell culture

days	Cells $\times 10^4$ / ml , mean \pm S.D. (n=4)			
	A	B	C	D
0	192.0 \pm 4.0	197.6 \pm 2.5	203.0 \pm 2.6	194.5 \pm 2.5
4	140.5 \pm 4.1	219.5 \pm 2.5	178.0 \pm 1.6	241.5 \pm 6.6
8	117.5 \pm 3.0	182.0 \pm 2.8	225.0 \pm 8.9	277.0 \pm 2.6
12	35.0 \pm 1.2	122.0 \pm 2.8	195.5 \pm 3.8	251.0 \pm 5.3

A : Control , B : Brined chinese cabbage

C : Fresh kimchi , D : Fermented kimchi for 1 week

다. 생쥐의 흉선세포의 배양에 미치는 영향

비장, 골수세포와 같은 방법으로 생쥐의 흉선세포를 배양한 결과 다음과 같다 (Table 39). 전 배양기간에 걸쳐 대조군의 경우는 세포수가 40% 정도의 감소를 보였고 절인 배추는 세포수가 처음과 비슷한 수준으로 유지된 데 비해 갓 담은 김치와 숙성김치는 앞의 두 실험의 결과와 약간의 차이는 있으나 세포수가 증가하는 경향을 나타내었다. 흉선은 항원과 림프구가 만나서 면역반응이 일어나는 곳이 아니라 주로 T 림프구의 성장과 분화가 일어나는 곳으로 잘 알려져 있는데 이 실험으로부터 김치가 미성숙 면역세포의 성장과 분화에 있어 영향을 미칠 수 있다고 추측되어진다.

Table 39. Thymus cell culture

days	Cells $\times 10^4$ / ml , mean \pm S.D. (n=4)			
	A	B	C	D
0	100.2 \pm 3.9	100.5 \pm 3.0	93.8 \pm 1.7	92.5 \pm 2.5
6	94.0 \pm 2.2	98.3 \pm 1.3	140.8 \pm 3.8	276.3 \pm 4.9
14	81.5 \pm 1.9	158.8 \pm 5.0	211.0 \pm 1.8	164.5 \pm 2.5
20	59.5 \pm 1.3	124.3 \pm 1.3	109.0 \pm 2.6	110.0 \pm 2.9

A : Control , B : Brined chinese cabbage

C : Fresh kimchi , D : Fermented kimchi for 1 week

이상의 세 가지 면역 관련 세포의 배양실험에서 보듯이, 김치가 면역세포의 성장에 영향을 줄 수 있다고 생각된다. 비장세포에 대한 영향으로는 김치가 항체생산을 증가시키는 것과 같은 방법으로 면역반응 자체에 관여할 수도 있을 것으로 보여지며 흉선과 골수세포에 대한 영향은 김치가 미성숙한 면역세포의 성장과 분화에 기여할 수 있으리라 추측된다. 한편, 김치의 담금에서 숙성과정에 있어서의 세 단계인 절인 배추, 갓 담은 김치, 및 숙성김치가 면역 관련 세포의 배양에 미친 영향을 종합적으로 고찰해 본다면, 대조군이 배양기간의 경과에 따라 세포수가 빠른 속도로 감소한 데 비해 절인배추의 경우는 세포수의 감소를 느리게 진행되도록 하였고, 갓 담은 김치와 숙성 김치는 계속해서 생존하게 하거나 더 잘 자라도록 영향을 미쳤다고 할 수 있다. 또, 숙성 김치가 갓 담은 김치에 비해 배양 말기까지 더 많은 세포를 생존시키기는 했으나 둘 사이에 큰 차이는 없는 것으로 보여진다. 김치가 면역세포의 성장, 분화 뿐 아니라 면역반응 자체에도 관여할 수 있는 가능성을 확인했기에, 실험동물을 길러 김치 투여 후 실험동물에서의 항체생성, T-cell 반응 등과 같은 여러 가지 면역지표에 어떠한 변화가 나타나는가에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

4. 김치와 김치부재료 추출물의 fibrin 분해능

가. *In vivo* 상에서의 fibrin 분해능

한편 fibrin 분해효과를 살펴보기 위하여 혈액에서 신속히 분리한 혈장으로 fibrin 분해능을 알아본 결과 김치 3% 섭취군은 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았고, 5% 섭취군은 약간 더큰 활성이 나타났으나, 김치 10% 섭취군에서는 매우 큰 활성이 나타났다. 이러한 결과는 *in vivo* 상에서 김치가 혈전용해능을 나타내었다는 것이다.

나. *In vitro* 상에서의 fibrin 분해능

김치와 김치의 부재료들의 물 또는 methanol 추출물을 이용해 *in vitro*에서 fibrin 분해능을 알아본 결과는 다음과 같았다(Table 40). 즉 물추출물의 fibrin 분해활성은

미나리가 가장 높았으며, 파, 무에서도 비교적 활성이 높았다. Methanol 추출물의 fibrin 분해활성은 고추가 월등히 높았으며, 무, 김치, 파에서도 활성이 높게 나타났다. 멸치 젓갈은 fibrin 분해활성을 나타내지 않았고, 발효중 생성되는 유기산은 fibrin 분해활성을 보였으나 pH를 7 주변으로 조정하였을 때, fibrin 분해활성을 보이지 않았다(Table 41).

Table 40. Fibrinolytic activity of water or methanol extracts of kimchi and its ingredients with or without disk

Samples	Water Extracts		Methanol Extracts	
	W/O Disk	W/ Disk	W/O Disk	W/ Disk
	활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$)	활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$)	활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$)	활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$)
김 치	0. 08	1. 23(약하게)	0. 75	0. 87(약하게)
고 추	—	—	1. 32	1. 23
마 늘	—	—	—	—
무	0. 28	—	0. 64	0. 34
미 나 리	0. 55	0. 87	—	—
배 추	0. 08	—	0. 16	—
부 추	0. 13	0. 66	—	—
생 강	0. 07	—	—	—
젓 갈	—	—	—	—
파	0. 33	0. 49	0. 50	—
기 넥 신 ^(*)	—	—	—	—
명 심 ^(*)	3. 41	4. 12	1. 94	0. 99

† 김치 ~ 기넥신^(*)은 disk를 사용하지 않을 경우 동일하게 20 μ l씩, 명심^(*)은 2 μ l를 취하고, disk를 사용한 경우 앞의 시료들은 40 μ l씩, 명심^(*)은 2 μ l를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 18hr경과 후 활성을 측정했음.

† 활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$) : a는 장축의 반지름, b는 단축의 반지름임.

Table 41. Fibrinolytic activity of selected organic acids (Citrate, Lactate, Oxalate and Succinate)

Samples	Fibrinolytic Activity	
	pH not adjusted	pH adjusted about 7
Citrate	0. 66	—
Lactate	0. 44	—
oxalate	0. 45	—
Succinate	0. 71	—

† 시료는 동일하게 20 μ l씩 사용했으며 37 $^{\circ}$ C, 18hr. 경과 후 활성을 측정했음.

† 활성도 ($\pi \times a \times b \text{ cm}^2$) : a는 장축의 반지름, b는 단축의 반지름임.

† 각 시료의 pH는 cit.(2.84), lac.(2.72), oxa.(1.20) ,suc.(3.38)임.

5. 김치부재료의 섭취에 따른 토끼의 항동맥경화 효과에 관한 연구

가. 기간별 혈중콜레스테롤의 농도변화

동물사육 시작시 실험동물의 혈중콜레스테롤농도는 대조군이 50.35, 배추를 첨가한 군에서 72.11, 고추를 첨가한 군에서 69.56 그리고 마늘을 첨가한 군에서 99.64mg/dL으로 대조군에 비해 배추, 고추, 그리고 마늘을 각각 첨가한 군이 다소 높았다. 그리고 사육기간이 경과함에 따라 혈중 콜레스테롤농도는 증가하였는데 12주째에는 대조군이 2624.56, 배추를 첨가한 군에서 2016.56, 고추를 첨가한 군에서 2091.93, 그리고 마늘을 첨가한 군에서 2117.89 mg/dL 로 대조군에 비해 배추, 고추, 그리고 마늘을 각각 첨가한 군에서는 608, 532, 그리고 506.67 mg/dL정도 혈중 콜레스테롤의 농도가 떨어짐을 관찰하였고 통계적으로 유의하였다($P < 0.05$). (Fig. 68)

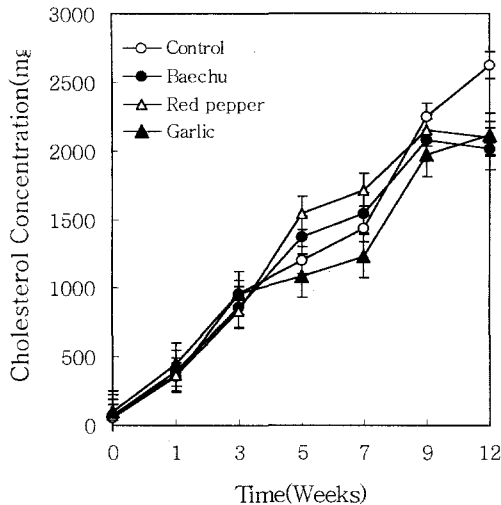


Fig. 68. Changes in cholesterol concentration of rabbit fed kimchi ingredient diet for 12 weeks.

나. 기간별 혈중 중성지방 농도변화

동물사육기간이 경과함에 따라 혈중중성지방의 농도가 증가하였고 사육 3주째 이후부터는 혈중 중성지방의 증가양상에 두드러진 차이가 났다. 즉, 배추, 고추, 마늘을 각각 첨가한 군이 대조군에 비해 다소 떨어지면서 혈중 중성지방이 증가하였고, 사육 5주째에는 이러한 결과가 통계적으로 유의하였다. ($P < 0.05$) 그리고 12주째의 혈중 중성지방농도는 대조군이 598.32, 배추, 고추, 그리고 마늘을 첨가한 군이 각각 428.37, 303.84, 그리고 383.43 mg/dL로 대조군에 비해 김치부재료를 첨가한 군에서 혈중 중성지방의 농도가 현저히 떨어지는 데, 그 차이를 고추나 마늘을 첨가한 군과

대조군을 비교해 볼 때, 각각 294.48, 그리고 214.89 mg/dL로 큰 차이를 보였다. 이러한 결과는 김치를 흰쥐의 식이에 첨가시켜 사육한 뒤, 혈중중성지방농도를 측정하였을 때, 대조군에 비해 김치를 첨가한 군에서 혈중 중성지방의 농도가 크게 떨어졌던 전 연도의 연구 결과와 비교해 볼 때, 김치 부재료의 배추, 고추, 그리고 마늘이 서로 복합적으로 작용하였을 것이라는 추측을 확신시켜 주었다(Fig. 69).

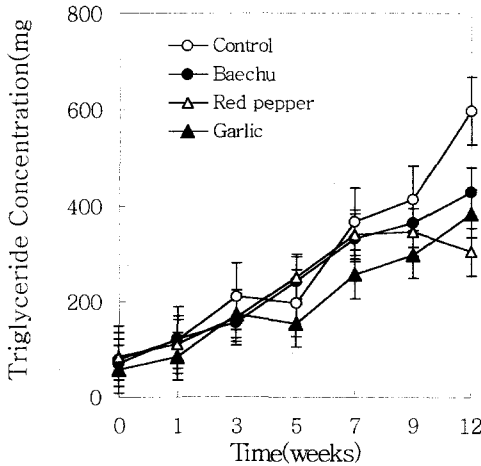


Fig. 69. Changes in plasma triglyceride concentration of rabbit fed kimchi ingredient diet for 12 weeks.

다. 혈장에 있어서 동맥경화 관련 요인에 대한 김치 재료의 효과

1) 혈장 CETP활성의 변화

12주 동안 사육한 후 HDL 분획에서 CETP 활성을 살펴본 결과 마늘을 섭취한 군의 CETP 활성은 대조군의 약 55% 정도로 가장 낮았으며, 배추와 고춧가루군의 활성도 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 콜레스테롤이 많은 식사를 하게되면 혈장에서의 CETP의 활성은 일반적으로 증가하여 잉여의 혈장 cholesterol을 HDL이 LDL로 옮겨주게 되어 동맥경화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 마늘, 배추 그리고 고춧가루를 섭취한 군 모두에서 CETP의 활성이 낮아짐으로서 김치를 섭취하였을 때 혈장 CETP 활성의 감소에 따른 동맥경화 예방 효과가 있을 것으로 사료된다 (Fig. 70).

2) 지단백 분획에서 콜레스테롤 농도 변화

VLDL 분획에서의 콜레스테롤의 농도는 사육기간이 경과함에 따라 증가하는 데 특히 사육 3주이후 부터는 그 증가 수준이 각 군간에 유의적인 차이를 나타내면서 증가하였으며($P < 0.05$) 사육 12주 후의 VLDL 콜레스테롤 농도는 대조군이 1169.30, 배추를

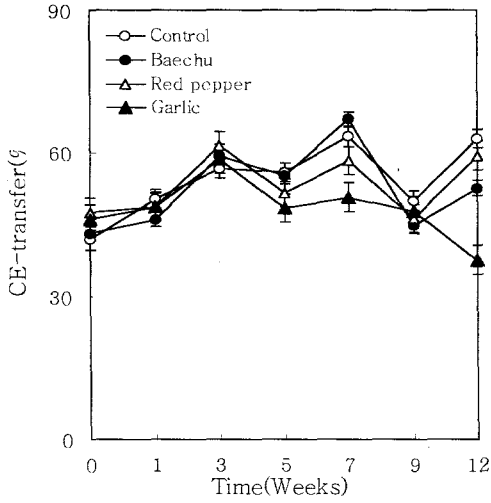


Fig. 70. Changes in CETP activity of rabbit fed kimchi ingredient diet for 12 weeks

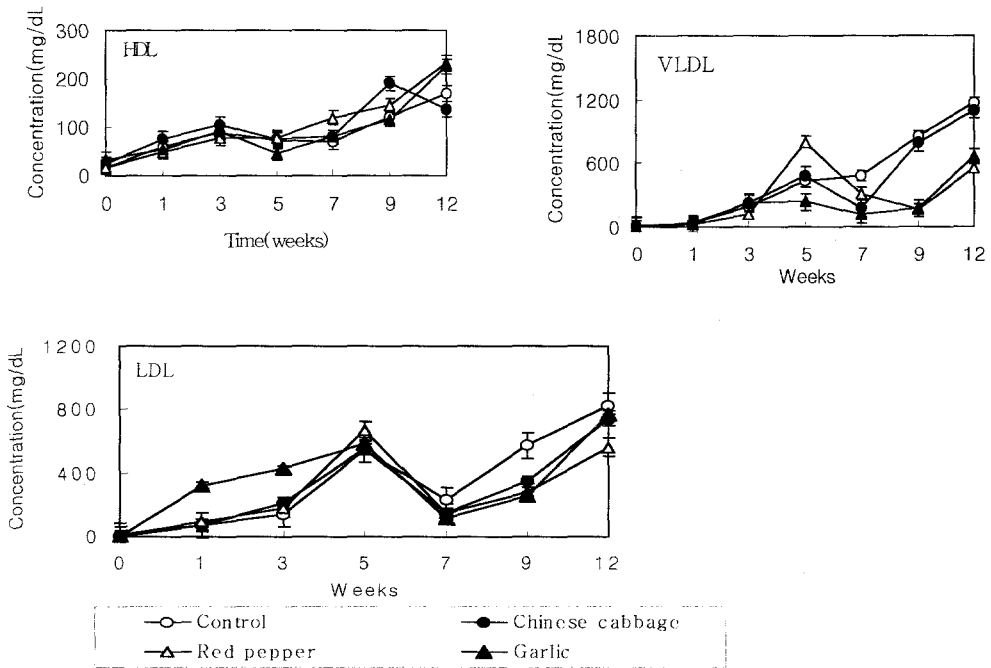


Fig. 71. Changes in lipoprotein cholesterol concentration of rabbit fed kimchi ingredient diet for 12 weeks

첨가한 군은 1103.71, 고춧가루를 첨가한 군에서는 432.41, 그리고 마늘을 첨가한 군에서는 559.26 mg/dL으로 고추와 마늘이 VLDL 콜레스테롤을 떨어뜨리는 효과는 배추에 비하여 현저하였다(Fig. 71). LDL 분획에서의 콜레스테롤의 농도는 대조군에 비해 배추, 마늘 그리고 고춧가루를 첨가한 군에서 증가수준이 낮았고, 특히 12주째의 고추섭취군은 대조군 보다 32% 정도, 배추군은 11%, 마늘군은 7% 정도 콜레스테롤 농도가 낮았다. 이는 2차년도에서 얻어졌던 결과인 김치를 섭취한 흰쥐의 혈중 콜레스테롤 농도가 떨어졌던 것을 설명할 수 있는 기초 자료가 될 것으로 생각된다. 토끼에게 콜레스테롤을 우유에 분산시켜 이를 12주간 tube feeding한 군과 여기에 마늘즙을 첨가하여 투여한 군의 콜레스테롤 농도를 비교하였을 때 고콜레스테롤 식이에 의한 HDL 콜레스테롤 농도의 차이는 없었으나 LDL 콜레스테롤 농도는 4주 후 투여전의 약 37배 증가되었으며, 12주 후에는 약 40배 이상 증가되었고, 마늘즙을 첨가한 군에서는 투여 4주 후 부터 LDL 콜레스테롤 농도가 유의적으로 저하되기 시작하여 12주 까지 계속해서 LDL 콜레스테롤 농도가 떨어짐을 보고하여 본 연구와 유사한 보고를 하였다. 혈장 콜레스테롤중 가장 많은 양이 LDL 콜레스테롤 속에 함유되어 있어 동맥경화의 가장 위험인자로 보고되어 있음을 생각할 때 이들 김치 재료의 LDL 콜레스테롤 감소 효과는 동맥경화를 예방할 수 있는 중요한 의미를 갖는다고 생각한다.

HDL 분획에서의 콜레스테롤 농도는 사육 12주째에는 대조군에 비해 고춧가루와 마늘군에서 37% 그리고 33% 씩 증가하였다. HDL 콜레스테롤이 증가는 혈중 또는 조직에 존재하는 잉여상태의 콜레스테롤을 간조직으로 역운반함으로써 혈중 콜레스테롤 농도를 떨어뜨려 동맥경화의 발생빈도를 낮추는 작용이 있음이 잘 알려져 있다. 2% 콜레스테롤 첨가식으로 12주간 사육한 토끼(실험군)에 있어서 HDL콜레스테롤 농도와 총콜레스테롤에 대한 HDL콜레스테롤의 퍼센트비는 대조군(콜레스테롤 무첨가군)에 비해 유의적으로 높았으며, 동맥경화지수는 실험군이 39.48, 대조군이 5.08으로 실험군의 동맥경화지수가 높고, 총콜레스테롤중 HDL의 콜레스테롤이 차지하는 비중이 낮아짐으로써 혈장 환경이 동맥경화를 쉽게 발생할 수 있는 상태로 변화되었다고 보고하여 본 실험과와 유사 결과를 보고하였다.

3) 지단백분획에서 중성지방 농도의 변화

VLDL내 중성지방의 농도는 사육 초기에는 군간에 차이 유의적이지 않았으나 7주가 경과하면서 대조군이 152.59mg/dL 인데 비해 배추군은 77.71, 고춧가루군은 109.17, 마늘군은 71.00 mg/dL로 모든 김치재료군에서 감소하였다($p < 0.05$). 또한 사육 12주째에는 대조군이 293.16, 배추군은 210.77, 고춧가루군은 196.55, 마늘군은 182.74mg/dL로 대조군에 비해 배추군은 28%, 고춧가루군은 33%, 마늘군은 38% 정도 VLDL 중성지방 농도가 감소하였다($p < 0.05$). 이는 배추, 고춧가루 그리고 마늘 등의 김치 재료가 VLDL 분획에서 중성지방의 농도를 감소시킴으로써 혈중 중성지방 농도를

감소시키는 효과가 있음을 보여주며 결과이며, 또한 2차년도에 보고한 김치가 흰쥐의 혈중 중성지방을 농도 의존적으로 감소시켰던 사실을 확인해 주고 있다.

4) 동맥경화지수

콜레스테롤 첨가 식이로 사육한 토끼의 동맥경화지수는 모든군에서 사육기간중 초기단계에 비해 상승하였고, 사육 12주 후 각군간의 동맥경화지수를 비교하였을 때 대조군이 12.44, 배추군이 16.3, 고춧가루군이 6.62, 마늘군이 11.47로 대조군에 비해 고추나 마늘을 섭취한 군이 동맥경화지수가 낮았고, 특히 고춧가루 섭취군의 동맥경화지수는 대조군 지수의 약 50% 정도 수준으로 상당한 동맥경화 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 예상한 바와는 달리 세계적으로 인정되고 있는 마늘의 동맥경화 억제 효과보다 약 2배 정도 큰 효과로 실험의 재현성 및 고추의 어떤 성분들이 동맥경화를 억제할 수 있는가를 집중적으로 연구해보아야 할 흥미있는 결과라고 생각한다.

5) Cholecystokinin hormon 농도

CCK는 담즙의 분비를 촉진시키는 호르몬으로 본 연구에서는 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 기전 중의 하나인 담즙 생성 및 분비에 연구의 초점을 두고 배추, 마늘 그리고 고춧가루가 혈중 CCK 호르몬에 미치는 효과를 조사하였다. 사육 8주째 각군의 토끼를 2마리씩 선정해서 24시간 절식시켜 공복상태로 만든후, 실험동물에 5분간 해당식이를 섭취케 한 후, 0, 15, 30, 45, 60분 간격으로 채혈하여 혈장을 분리한 뒤, 이를 CCK정량에 이용하였다. 대조군은 15분째 CCK농도가 32.45 fmol 로 최고치를 달 하면서 감소하는 경향을 보였고, 배추섭취군은 15분째 최고치인 22.75 fmol 수준으로 상승하다가 다시 감소하는 경향을 보였고, 고춧가루군은 30분째 최고치인 11.43 fmol 에 달하다가 감소하는 경향을 보였다. 한편 마늘 섭취군에서는 45분째 CCK농도가 41.27fmol로 최고치에 달하다가 감소하였다. 따라서 각군에 있어서 CCK 농도가 최고가 되는 시간은 달랐지만, 마늘을 섭취한 군의 CCK 농도가 대조군에 비해 27% 정도 높았다. CCK 방출이 낮아지면 담낭을 비우는 시간이 감소되고 liver cholesterol의 담즙산으로의 전환도 감소되어 liver cholesterol은 증가하고 LDL cholesterol uptake는 감소하여 혈장 콜레스테롤 농도가 증가한다고 보고되어 있다.

라. 간의 지질 농도 변화에 대한 김치재료의 효과

1) 간의 총지방, 콜레스테롤 그리고 중성지방 함량

12주간 김치 재료의 섭취에 따른 간의 지방, 콜레스테롤 및 중성지방의 농도의 변화를 Table 42에 나타내었다. 간의 총지방 함량은 대조군이 92.90, 배추군이 85.10, 고춧가루군이 78.10 그리고 마늘군이 65.80%였고, 대조군에 비해 배추, 고추, 마늘군

에서 총지방량이 떨어졌고, 특히 마늘 첨가군이 대조군에 비해 29% 낮음을 관찰하였다($p < 0.05$). 간 콜레스테롤 농도는 대조군이 19.07, 배추 섭취군이 21.02, 고춧가루 섭취군이 18.35, 마늘 섭취군이 19.51 mg/g이고, 콜레스테롤을 전혀 섭취하지 않은 군에서는 간 콜레스테롤 함량이 12.45mg/g 으로 콜레스테롤을 섭취한 군과 그렇지 않은 군간에 유의적인 차이가 관찰되었으나($p < 0.05$), 대조군과 김치 재료를 섭취한 군간에 간콜레스테롤 농도는 2차년도에 보고한 혈장 콜레스테롤 농도에 유의적인 차이가 있었던 것과는 달리 차이를 보이지 않았다. 10개월된 SD rats에 0.5% 콜레스테롤을 첨가한 식이를 대조군식으로, 여기에 3% 마늘가루를 섞은 식어로 사육하여 4주간 사육한 실험에서 간의 콜레스테롤농도를 측정된 결과 간의 콜레스테롤농도는 마늘에 의해 영향을 받지 않았고, 이는 마늘이 간의 콜레스테롤 합성보다는 중성 또는 산성 sterol로 전환되었기 때문이라는 보고가 있는 반면 2~4% 수준의 마늘가루가 1%의 고콜레스테롤 식이로 사육된 쥐의 간의 콜레스테롤 수준을 30% 정도 감소시켰다는 상반된 보고도 있다. 간의 중성지방 농도는 대조군이 5.70, 배추군이 5.41, 고춧가루군이 4.18, 마늘군이 3.68으로 특히 마늘을 섭취한 군에서 중성지방 농도가 현저하게 낮아 대조군에 비해 35%나 떨어졌고, 그외, 고춧가루 섭취군이 27%, 배추섭취군이 5% 정도 떨어짐을 관찰하였다(Table 42, $p < 0.05$). 이러한 결과는 1차년도 보고한 김치를 섭취한 쥐가 농도의존적으로 중성지방이 감소한 사실을 뒷받침하는 결과라 생각된다. 간에 있어서 중성지방 농도의 감소는 VLDL의 생성을 억제하고 그 결과 혈장을 순환하는 지단백질의 농도를 낮춤으로서 궁극적으로 동맥경화를 억제할 수 있다. 따라서 마늘이 간의 중성지방의 농도를 현저하게 낮출 수 있는 효과는 학계에서 널리 인정하고 있는 마늘의 동맥경화 예방 효과를 설명할 수 있는 기전 중의 하나라고 사료된다.

Table 42. Liver cholesterol, triglyceride, and total lipid concentration of rabbits fed kimchi ingredients for 12 weeks

	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)	Total lipid(%)
Control	18.79 ± 0.82	5.70 ± 2.08 ^a	92.90 ± 18.20
Baechu	21.02 ± 0.93	5.41 ± 1.34 ^{ab}	85.10 ± 21.80
Red pepper	18.94 ± 1.21	4.18 ± 1.01 ^{bc}	78.10 ± 19.40
Garlic	19.68 ± 1.32	3.68 ± 0.29 ^{bc}	65.80 ± 12.60

Values are means ± SD(n=6)

Values in rows without common superscripts are significantly different($p < 0.05$)

2) HMG-CoA reductase activity

간의 HMG-CoA reductase activity는 대조군은 0.94, 배추섭취군은 1.21, 고춧가루 섭취군은 1.13, 마늘 섭취군은 1.33 n mol/min/mg microsomal protein으로 대조군에 비해 배추섭취군은 29%, 고춧가루섭취군은 20%, 마늘 섭취군은 45%정도 증가하였으

며, 특히 김치재료중 마늘이 HMG-CoA reductase 활성을 높여주었다(Fig 72 p<0.05). 콜레스테롤을 생합성하는 단계중 율속효소로 작용하는 중요한 효소로서 본 실험의 결과는 1차년도의 쥐의 실험과는 상반된 결과이나 이는 외부에서 다량의 콜레스테롤이 혈장과 조직으로 공급되었기 때문에 대조군에서는 HMG-CoA reductase 활성이 김치재료군에 비해 감소하였고, 김치재료인, 배추, 고춧가루, 특히 마늘이 대조군에 비해 혈중지질 농도를 감소시킬 수 있는 능력이 컸으므로 생체내 필요한 콜레스테롤을 일정수준 유지하기 위한 상보적인 작용으로 이들 효소의 활성이 증가한 것으로 사료된다.

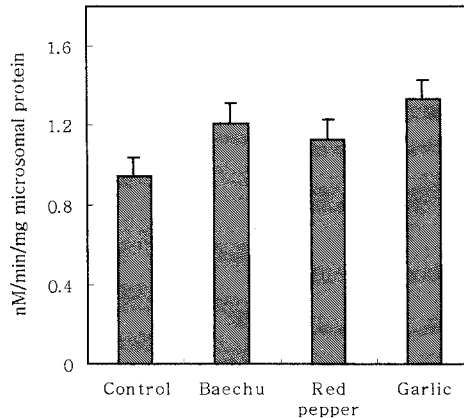


Fig. 72. HMG-CoA reductase activity of rabbit fed kimchi ingredient diet for 12weeks.

마. 김치 재료를 섭취한 토끼의 대동맥(Aorta)의 콜레스테롤, 중성지방, 총지방함량

희생한 토끼의 동맥판막(aorta valve)에서 회장의 분기점(iriatic bifurcation)까지 절단한 대동맥 조직의 지질 함량을 분석한 결과를 Table 43에 나타내었다. 대동맥의 콜레스테롤 함량은 대조군이 17.93, 배추섭취군이 23.40, 고춧가루섭취군이 17.06, 마늘섭취군이 11.74mg/g 으로 특히 마늘을 첨가한 군이 타군에 비해 콜레스테롤 농도가 낮았고 대조군에 비해 35% 정도나 낮아 마늘의 동맥경화 예방 효과를 직접적으로 확인할 수 있는 결과였다(p<0.05). 대동맥 조직에서의 중성지방농도는 대조군이 1.27, 배추군이 2.68, 고춧가루군이 1.48, 마늘군이 1.63 mg/g 었이고 총지질의 함량은 대조군이 7.12, 배추섭취군이 9.96, 고춧가루섭취군이 6.38, 그리고 마늘섭취군이 5.71%으로 대조군에 비해 배추섭취군은 40% 증가하였고, 고춧가루섭취군은 10%, 마늘섭취군은 20% 감소하였다. (p<0.05) 이러한 결과는 동맥조직의 병변을 관찰하였을 때 고춧가루나 마늘군에서는 지질침착이 거의 발견되지 않았던 결과와 일치하였다.

Table 43. Cholesterol, Triglyceride, and total lipid concentration in aorta of rabbit fed Chinese cabbage, garlic, or red pepper powder

	Cholesterol (mg/g aorta)	Triglyceride (mg/g aorta)	Total lipid (%)
Control	17.43 ± 0.42 ^b	1.24 ± 0.08 ^c	70.10 ± 4.20 ^b
Baechu	27.92 ± 0.20 ^a	2.84 ± 0.34 ^a	99.70 ± 6.70 ^a
Red pepper	18.06 ± 0.11 ^b	1.55 ± 0.01 ^b	63.80 ± 1.21 ^c
Garlic	12.74 ± 0.32 ^c	1.75 ± 0.29 ^b	57.10 ± 1.10 ^d

Values are means ± SD(n=6)

Values in rows without common superscripts are significantly different(p<0.05)

Chinese cabbage and garlic are freeze dried and powdered before diet preparation.

바. 분변의 콜레스테롤, 중성지방 및 총지방함량

콜레스테롤의 분변으로의 분비는 혈중내 지질의 농도를 떨어뜨릴 수 있는 또 다른 기전으로 이를 살펴 보았다. 사육 12주째 이틀동안 수집한 분변을 살펴 본 결과 분변의 콜레스테롤은 대조군이 65.06, 배추섭취군이 86.37, 고춧가루섭취군이 56.77, 그리고 마늘 섭취군이 54.34 mg/g이었다. 한편, 콜레스테롤을 전혀 섭취하지 않은 토끼군은 36.51mg/g이었다. 이러한 사실은 체내 콜레스테롤 농도가 높으면 이를 조절하는 기전으로 분변으로의 콜레스테롤 배설량이 증가한다는 사실을 뒷받침 해 준다. 특히 대조군에 비해 배추섭취군에서 콜레스테롤 배설량이 33%나 증가하였는데 이는 배추속의 식이섬유의 작용으로 분변으로의 콜레스테롤 배설이 늘어난 것 같고, 마늘이나 고춧가루섭취군에서는 대조군에 비해 혈중 콜레스테롤 농도가 낮았기 때문에 분변으로의 콜레스테롤 배설량도 상대적으로 떨어졌다고 사료된다. 분변의 중성지방은 대조군이 123.51, 배추군이 162.95, 고춧가루군이 142.86, 마늘군이 141.37mg/g으로 특히 배추를 섭취한 군에서 분변으로의 중성지방 배설량이 대조군에 비해 32% 증가하였다. (p<0.05) 이는 배추의 pectin등의 식이섬유가 중성지방을 흡착하여 분변으로 배설시켜 혈중 중성지방농도를 떨어뜨리는 기작과 관련이 있을 것으로 사료되고, 고춧가루섭취군에서는 대조군에 비해 16%, 마늘을 섭취한 군에서는 15% 정도 증가하였다. 이는 고추, 마늘이 분변으로 중성지방 배설에 관계한 것으로 사료된다.

분변의 총지방 함량은 대조군이 5.42, 배추섭취군이 7.78, 고춧가루섭취군이 15.92, 마늘섭취군이 8.13 mg/g이었다. (p<0.05) 대조군에 비해 배추섭취군은 43%, 고춧가루섭취군은 194%, 마늘섭취군은 50% 증가함을 관찰하였다.

사. 김치재료의 섭취가 토끼의 지질 과산화에 미치는 영향

1) 혈장, 간에서의 과산화지질함량

사육 12주후의 혈장의 MDA 함량은 대조군이 2.82, 배추섭취군이 3.47, 고춧가루섭

취균이 1.78, 마늘섭취균이 1.35 nmol/ml plasma으로 대조군에 비해 배추섭취균은 23% 높았고, 고춧가루섭취균은 37%, 마늘섭취균은 52% 낮았다(Table 44, $p < 0.05$). 희생후 토끼간의 MDA농도 및 POV농도는 대조군은 20.85, 배추섭취균은 12.97, 고춧가루섭취균은 12.48, 마늘섭취균은 10.26 nmol/g tissue로 김치재료 섭취시 대조군에 비해 MDA함량이 낮음을 관찰하였고, 배추섭취균은 38%, 고춧가루섭취균은 40%, 마늘섭취균은 51%정도 MDA함량이 대조군보다 낮았다. 간 조직의 POV(peroxide value)는 대조군이 33.24, 배추섭취균이 14.84, 고춧가루섭취균이 10.98, 마늘 섭취균이 13.68 nmol/g tissue으로 대조군에 비해 배추섭취균이 55%, 고춧가루섭취균이 67%, 마늘섭취균은 59% 낮았다($p < 0.05$). 생체내에서의 과산화지질은 세포내 구성성분과 작용하여 생화학적 변화를 일으키며 이로 인해서 최근에는 동맥경화를 비롯한 퇴행성 질환을 촉진시키는 물질로 주목받고 있다. 본 연구에서 얻어진 결과에 의하면 김치 및 김치재료는 섭취시 체내의 지질산화를 억제할 수 있는 항산화성이 있음이 밝혀져 동맥경화를 예방할 수 있는 또 다른 가능성이 있음을 시사하고 있다.

Table 44. Peroxide values(POV) and malondialdehyde(MDA) contents in liver tissue of rabbits fed control and kimchi ingredients

	MDA(nM/g tissue)	POV(μ M/ g liver)
Control	20.85 \pm 4.76 ^a	33.24 \pm 12.40 ^a
Baechu	12.97 \pm 3.22 ^{ab}	14.84 \pm 2.41 ^b
Red pepper	12.48 \pm 0.32 ^{ab}	10.98 \pm 0.58 ^b
Garlic	10.72 \pm 0.71 ^b	13.68 \pm 1.77 ^b

Values are means \pm SD(n=6)

Values in rows without common superscripts are significantly different($p < 0.05$)

2) 간의 Protein carbonyl value

단백질의 산화정도는 대조군이 1.55, 배추섭취균이 0.83, 고춧가루섭취균이 1.20, 마늘 섭취균이 1.32이었다. 이는 대조군에 비해 배추섭취균이 47%, 고춧가루섭취균이 23%, 마늘섭취균이 15% 정도 Protein carbonyl value가 낮았다($p < 0.05$). 본 결과는 1차년도 연구에서 김치를 3%, 5%, 10% 농도로 슛컷 SD rats에 6주간 공급하였을 때 간의 protein carbonyl value는 각군간의 유의적인 차이는 없었지만 김치섭취균이 대조군에 비해 그 값이 낮았던 결과를 확인하고 있다. 대사과정 중 생성된 활성산소나 지질의 과산화물이 지니고 있는 유리기에 의한 생체내 손상을 측정하는 방법에 있어 민감하게 손상정도를 나타내어 줄 수 있는 protein carbonyl value 측정법은 지질의 산화시 생성되는 유리기들이 생체내의 단백질과 반응하여 이들을 파괴시킴으로서 protein carbonyl compound가 형성되고 이러한 단백질의 파괴는 지질산화생성물이 hydroperoxide나 malondialdehyde 생성보다 먼저 일어난다고 하여 생체내 지질 산화

를 측정하는 방법으로 이용되고 있다.

3) LDL 의 TBARS값

콜레스테롤 식이에 의해 사육한 토끼의 LDL 의 TBARS값은 시간이 경과함에 따라 각군에서 증가하나 그 증가수준은 마늘섭취군은 대조군에 비해 다소 완만하게 증가하였다. Coronary atherosclerosis group(35 young men)에 있어서 copper-mediated oxidation에 대한 LDL 의 민감도간에 상관성이 관찰되었고, Oxidized LDL(Ox-LDL)에 대한 혈장의 autoantibodies가 30대 남성에게 있어서 carotid atherosclerosis의 진행과 비례적 관계가 있다고 보고되어 있으며, 또한 peripheral vascular disease를 가진 환자는 Ox-LDL에 대한 autoantibodies의 역가가 증가함을 보여주었다. 사람과 Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits의 complicated atherosclerotic plaque를 관찰하였을 때 MDA-LDL에 대한 autoantibodies가 이미 염증반응 형태로 환자들에게 존재하고 있었다고 보고하여 LDL 산화와 동맥경화 발생간의 직접적인 관련성을 보고하고 있다.

아. 김치재료 섭취가 토끼간의 항산화계 효소 및 항산화 영양소에 미치는 효과
생체는 산화적 손상에 인한 정상적인 기능을 보호하기 위하여 진화과 더불어 이를 방어할 수 있는 기전이 발달되어 온 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 배추, 마늘 그리고 고춧가루가 항산화계 효소 및 항산화 영양소에 미치는 영향을 살펴보았다.

1) SOD활성

간조직의 Cu,Zn-SOD활성은 Table 45에 나타내었다. 대조군이 1.32, 배추섭취군이 1.65, 고춧가루섭취군이 1.78, 마늘섭취군이 0.77 NU/mg protein으로 대조군에 비해 배추섭취군은 25%, 고춧가루섭취군은 35% 증가, 그리고 마늘 섭취군은 42% 감소하였다. 한편 콜레스테롤을 첨가하지 않은 고형식이를 한 토끼에 있어 Cu,Zn-SOD 함량은 0.93 NU/mg protein이었다. 간조직의 Mn-SOD 함량은 대조군이 0.14, 배추섭취군이 0.15, 고춧가루섭취군이 0.18, 마늘섭취군이 0.08 NU/mg protein으로 대조군에 비해 배추섭취군은 별 차이를 보이지 않았으며, 고춧가루 섭취군은 29% 증가하였지만, 마늘 섭취군은 43% 감소함을 관찰하였다. 한편 콜레스테롤을 첨가하지 않은 고형식이를 한 토끼에 있어 Mn-SOD함량은 0.15 NU/mg protein이었다. 본실험에서는 고콜레스테롤 식이로 인해 병리적인 상태를 유발하였기 때문에 콜레스테롤을 전혀 첨가하지 않았던 군에 비해 SOD활성이 높았다. 그러나 이중에서도 김치재료인 배추나 고춧가루를 섭취한군에서는 대조군에 비해 그 활성이 더 높았다. 이는 배추나 고춧가루가 가지는 항산화 물질에 의한 작용으로 사료된다

2) 간의 Catalase와 Glutathione peroxidase 활성

대조군이 0.036, 배추섭취군이 0.029, 고춧가루섭취군이 0.043, 마늘섭취군이 0.074 Unit/mg protein으로 대조군에 비해 배추섭취군은 19% 감소, 고춧가루섭취군은 19%, 마늘섭취군은 106% 증가하였다(Table 45, $p < 0.05$). 한편 콜레스테롤을 첨가하지 않은 고형식을 한 토끼에 있어 catalase 함량은 0.065 Unit/mg protein이었다. 김치를 스킷 SD rats에 3%, 5%, 10% 농도로 식이에 첨가하여 6주간 사육하였을 때 간 조직의 catalase 활성은 각군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하고 있다. 본 실험에서 catalase 활성이 고춧가루나 마늘을 섭취한 군에서 증가한 것은 SOD의 작용에 의해 생성된 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 전환시켜 H_2O_2 를 제거하여 산화적 손상을 방지할 수 있는 능력이 크다는 것을 의미하고 이는 김치재료중, 고춧가루, 마늘에서 그 작용이 있다는 것으로 사료된다.

Glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 대조군은 58.05, 배추군은 58.78, 고춧가루섭취군은 57.23, 마늘섭취군은 53.92 unit/mg protein/min으로 각 군간의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 콜레스테롤을 첨가하지 않은 식이를 섭취한 토끼군의 GSH-px 활성은 41.92으로 콜레스테롤을 첨가식을 한군에서 그렇지 않은 군에 비해 다소 높은 경향을 보였다. 이는 고콜레스테롤 식이로 인한 산화적 스트레스를 제거하기 위해 GSH-px활성 높았던 것으로 사료되며 한편 김치재료에 있어서는 고춧가루나 마늘에서는 GSH-px활성이 유의적이지 않지만 낮아진 것은 대조군에 비해 고춧가루나 마늘을 섭취한 군이 산화적 스트레스를 덜 받았기 때문인 것으로 사료된다.

Table 45. Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Catalase and Glutathione reductase (GSH-px) activity in liver tissue of rabbits fed kimchi ingredients.

	Cu, Zn-SOD (NU/mg protein)	Mn-SOD (NU/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	GSH-px (U/mg protein/min)
Control	1.43 ± 0.23 ^a	0.14 ± 0.04	0.035 ± 0.004 ^{bc}	41.92 ± 4.04
Baechu	1.65 ± 0.53 ^a	0.15 ± 0.01	0.031 ± 0.005 ^c	58.05 ± 13.40
Red pepper	1.78 ± 0.69 ^a	0.18 ± 0.07	0.043 ± 0.004 ^d	57.23 ± 22.37
Garlic	0.77 ± 0.22 ^b	0.08 ± 0.05	0.076 ± 0.006 ^a	53.92 ± 14.48

Values are means ± SD(n=6)

Values in columns without common superscripts are significantly different($P < 0.05$)

3) 비타민 E 와 β -carotene 농도

사육 12 주후의 혈장 비타민 E농도는 대조군 0.86, 배추섭취군은 1.22, 고춧가루섭취군은 1.50, 마늘섭취군은 1.51 $\mu\text{g/ml}$ plasma으로 대조군에 비해 배추섭취군은 30%, 고춧가루섭취군은 75%, 마늘섭취군은 76% 정도 증가하였다. 간조직의 비타민 E농도는 대조군은 0.11, 배추섭취군은 0.20, 고춧가루섭취군은 0.39, 마늘섭취군은 0.13 $\mu\text{g/g}$

liver 으로 대조군에 비해 배추섭취군은 82%, 고춧가루섭취군은 255%, 마늘섭취군은 18%정도 높았다. ($p < 0.05$) 이는 위의 결과들에 미루어 볼 때 김치재료가 항산화능이 있음을 확인시켜주었다.

비타민 E는 조직, 혈장과 LDL속에 가장 풍부하게 존재하는 지용성 항산화제로 peroxy free radical을 trapping 함으로써 산화를 방지하므로 지질과산화에 대해 first-line에서 방어하는 역할을 한다. 비타민 E은 또한 LDL의 주요한 항산화제로 동맥경화의 직접적인 원인으로 꼽히고 있는 LDL 산화를 막아주는 중요한 항산화제이다.

Vitamin E는 LDL에 존재하는 가장 풍부한 항산화제로 비타민E 농도의 변화는 산화에 대한 LDL의 susceptibility의 변화를 유발하게 된다. Severe carotid atherosclerosis를 가진 환자군과 지질이상증후군 및 고혈압, 당뇨병, 동맥경화증이 전혀없는 대조군과의 혈중 비타민 E 효율 (vitamin E efficient)를 비교한 결과 환자군에서 비타민 E 효율이 9.59 ± 4.2 min lag phase/n mol vitamin E 였고, 대조군에서는 30.2 ± 7.6 min lag phase/n mol vitamin E 즉, 대조군에서 1 nmol vitamin E/mg LDL 은 약 30분간의 lag phase가 약 30분이었음에 비해 carotid atherosclerosis를 가진 환자에서는 단지 9분이었다. 이는 LDL을 산화로부터 보호할 수 있는 능력이 70%나 감소함을 나타내는 것으로 동맥경화 환자에 있어서 LDL 산화를 억제하는데 비타민 E가 주된 역할을 한다는 보고도 있다. 실제 사람을 대상으로 한 코호트 연구에서도 비타민 E가 동맥경화에 의한 심혈관계 질환을 낮춘다는 효능이 검증되고 있다. 이러한 사실에 근거해 볼 때, 본 실험에서의 대조군에 비해 김치재료 첨가군에서 혈중 비타민 E 농도가 높게 나타난 것은 김치재료인 배추나 고추, 마늘 성분각각이 가지는 항산화작용으로 인해 혈중 비타민 E 절약작용에 의한 결과로 사료된다

4) β -carotene 농도

간에서의 β -carotene농도는 대조군은 0.813 mg/g liver, 배추섭취군은 0.921, 고춧가루섭취군은 0.824, 마늘 섭취군은 0.838 mg/g liver로 대조군에 비해 배추섭취군은 13%, 고춧가루섭취군은 1%, 마늘섭취군은 3% 정도 높았을 뿐 각군간에 유의적 차이는 나타나지 않았다(Table 46).

β -carotene은 항산화력이 있으므로 동맥경화를 예방할 것이라는 많은 연구들이 있으나 직접적으로 동맥경화를 예방하는 효과들은 아직 밝혀지지 않고 있다.

Table 46. Liver vitamin E and β -carotene concentration of rabbits fed kimchi ingredient

	Vitamin E ($\mu\text{g/g}$ liver)	β -carotene
Control	0.12 \pm 0.01 ^b	0.81 \pm 0.12
Baechu	0.20 \pm 0.00 ^b	0.92 \pm 0.13
Red pepper	0.33 \pm 0.17 ^a	0.82 \pm 0.08
Garlic	0.11 \pm 0.01 ^b	0.84 \pm 0.04

Values are mean \pm SD(n=9)

Values in rows without common superscripts are significantly different(p<0.05)

6. 김치의 수용성 및 지용성 성분의 LDL 산화억제 효과

김치를 섭취시킨 쥐 및 토끼에 있어서 지질대사를 억제하는 효과가 앞의 연구결과 얻어졌으므로 이를 기초로 하여 김치의 성분이 동맥경화를 유발하는 강력한 기전 중의 하나로 알려진 LDL 산화를 억제하는 항산화 효과가 있는지를 알아보려고 하였다. 본 연구는 정상적인 사람의 혈액으로부터 LDL을 분리하고(매주 분리함) 여기에 동결 건조한 김치로부터 추출한 석유에틸로 추출한 지용성층과 물로 추출한 수용성층을 농도별로 첨가하여 *in vitro*상에서 Cu ion의 존재하에 LDL를 산화시키면서 이들의 산화 민감도를 conjugated diene kinetics와 지질산화생성물 생성정도로 측정하였다. 그리고 이들의 산화민감도를 bovine aorta endothelial cell line을 이용하여 cell culture system을 이용하여 김치의 LDL에 대한 항산화성을 재확인하였다. 실험의 재현성을 위하여 매 실험시 대조군으로 에스트로전 호르몬의 항산화성도 같이 측정하였다. 에스트로전은 심혈관계 질환을 낮추는 효과가 큰 것으로 잘 알려져 있는데 그 기전중의 하나가 항산화제로서의 역할 때문이라고 보고되고 있다. 그리고 김치추출물의 항산화성은 마늘의 항산화능과 비교하였다. 실험의 재현성을 위해 모든 실험은 각기 달리 분리한 LDL로 6회 이상 실험하였다. 각 실험시 시료는 triplicate로 행하였다.

가. Cell free system에서의 김치 추출물의 LDL 산화억제 효과

1) Conjugated diene kinetics

지질 산화의 양상은 지질산화 유도기(lag phase), 전파기(propagation phase) 그리고 말기(termination phase)의 전형적인 3단계로 나눌 수 있다. 지질산화 과정중 생성되는 이중결합(conjugated diene)의 양을 일정한 간격으로 측정하게 되면 전형적인 지질 산화양상을 나타내는 데 이러한 원리를 이용한 conjugated diene kinetics는 지질산화를 연구하는 방법중 민감한 도구로서 사용되고 있다. 특히 동맥경화와 관련한 연구에서 LDL 산화 민감도를 억제시키는 항산화성 물질의 연구에 널리 이용되고 있고

연구 결과를 인정받을 수 있는 대표적인 방법으로 알려져 있다. 본실험에 사용된 LDL은 Cu ion의 존재하에서 전형적인 산화양상을 띄웠으며 김치의 추출물을 첨가하였을 때 LDL 산화는 모든 추출물에서 농도 의존적(5, 25, 50mg/ml)으로 억제되어 항산화제의 효능을 보였다. 분리된 LDL에 김치추출물 및 에탄올들을 생체시스템과 유사하게 첨가하고 Diode Array spectrophotometer (model 8452A, Hewlett Packard, USA)로 매 10분 마다 conjugated diene 함량을 측정하여 kinetic 연구를 하였을 때 이중결합의 생성속도는 김치의 지용성 및 수용성층 추출물을 농도별로 첨가하였을 때 대조군에 비해 약 32-72% 정도 억제되었고(Table 47, $p < 0.01$) 마늘은 약 15-54% 정도 억제되었으며($p < 0.05$) 0.1 μ M estrogen에 의해서는 약 40% 정도 억제되어 김치추출물의 항산화성이 마늘의 항산화능 및 에스트로겐의 항산화성과 비교할 만한 고무적인 결과를 보여주었다. 이러한 김치 추출물의 항산화성은 LDL 산화 유도기(lag phase)를 연장시켰으며, 김치의 지용성 성분을 첨가하였을 때 약 1.2-1.6배, 수용성층의 첨가시에는 1.2-1.9배 연장되었고, 마늘의 지용성층은 1-1.3배, 수용성층은 1.1-1.5배 증가시켜 김치의 항산화성은 마늘보다 컸으며, 김치 추출물 중에서는 지용성 성분 보다는 수용성 추출물의 항산화력이 더 컸다. 0.1 μ M 에스트로겐은 LDL 산화유도기를 1.3배 정도 연장시켜 김치의 항산화력이 상당히 큼을 재확인하였다. 김치의 용매 추출물의 항산화 활성 물질에 대한 연구는 앞으로 진행되어야 겠으나 비타민 A, 베타카로틴, 페놀화합물, 비타민 E 등이 지용성층의 항산화성을 주는 활성물질로 생각되고, 비타민 C, 수용성 페놀화합물, flavonoid 등은 수용성추출물에서 항산화성을 갖는 물질로 생각된다.

2) Lipid peroxide content

Conjugated diene kinetics 와 연구 동일하게 시료를 만든 다음 이를 37°C water bath상에서 LDL 산화를 촉진시켜 hydrogen peroxide의 표준검량곡선을 이용하여 과산화물의 농도를 구하였다. 산화생성물의 생성과정을 시간별로 lipid peroxide 함량을 측정하여 time course 연구를 한 다음 과산화물의 생성이 최대치에 다다르기 전의 시간대, 즉 과산화물이 다른 저급의 물질로 분해되기 전의 안전한 시간대를 택하여 모든 실험에서 일정한 시간동안 산화를 진행시켰다. 김치 지용성 추출물의 과산화물 생성억제능은 대조군에 비해 20-46%, 수용성 추출물에서 16-80%이었고, 마늘의 지용성층은 5-18%, 그리고 수용성 추출물에서는 21-71%의 산화억제능을 보였고 0.1 μ M estrogen은 약 29%의 과산화물 생성을 억제하였다(Table 47). 본 연구에서도 김치는 마늘 및 에스트로겐과 비교할 만큼 항산화성을 보였으며 역시 수용성 추출물에서 상당히 높은 항산화성을 보였다.

Table 47. Effect of Kimchi and Garlic extract on LDL susceptibility to oxidation

	CD formation rate (% of control)	Lag Phase (% of control)	Lipid Peroxide (% of control)
Control	0	100	0
Kimchi			
PEK 1	-32.89 ^a ± 12.15	116.35 ^a ± 13.81	-20.17 ^a ± 13.74
PEK 5	-52.6 ^{ab} ± 11.54	138.53 ^{bc} ± 9.65	-33.87 ^a ± 20.84
PEK 10	-72.51 ^b ± 6.83	159.2 ^c ± 6.7	-46.55 ^a ± 18.95
WEK 1	-34.58 ^a ± 12.83	125.45 ^a ± 32.33	-16.44 ^a ± 8.14
WEK 5	-45.09 ^{ab} ± 10.99	143.85 ^{ab} ± 41.39	-47.74 ^b ± 16.91
WEK 10	-70.56 ^b ± 9.89	186.83 ^b ± 37.5	-80.41 ^c ± 13.41
Garlic			
PEG 1	-15.98 ^a ± 2.54	108.2 ^a ± 2.28	-5.31 ^a ± 2.87
PEG 5	-29.63 ^{ab} ± 7.7	118.74 ^a ± 1.25	-12.8 ^{ab} ± 7.83
PRG 10	-46.94 ^b ± 13.16	128.35 ^a ± 11.92	-18.37 ^b ± 5.95
WEG 1	-16.12 ^a ± 5.1	114.95 ^a ± 16.88	-21.16 ^a ± 7.21
WEG 5	-40.72 ^b ± 5.66	120.88 ^a ± 26.65	-29.92 ^a ± 8.48
WEG 10	-53.73 ^c ± 4.78	148.48 ^a ± 36.22	-71.24 ^b ± 11.62
Estrogen			
0.1uM	-39.51 ± 6.42	126.38 ± 1.76	-29.38 ± 22.99

나. Bovine aorta endothelial cell culture system에서 세포 매개성 LDL 산화에 대한 김치추출물의 산화억제 효과

Bovine aorta endothelial cell을 24 또는 48 well plate에 2-4 x 10⁵ cell이 되도록 분주하여 2-3일간 성장시킨 후 실험일날 이들 성장 배양액을 제거하고 phenol red를 포함하지 않는 Ham's F10로 LDL 용액을 준비하여 well 당 0.15mg/ml 이 되도록 첨가하였다. 여기에 0.5uM Cu를 넣고 김치 및 마늘 추출물을 넣어 37°C incubator에서 20-24시간 세포 매개성 산화를 진행시켰으며 산화반응을 종결하기 전에 전자현미경을 이용하여 LDL 산화 정도를 확인한 다음 산화를 종결시켰다. 반응액을 얻어서 지질과 산화물의 함량 측정하고 전기영동을 행하고, 나머지 세포에는 MTT 용액을 첨가하여 세포에 대한 김치 추출물의 독성을 검사하였다. 세포에 대한 김치의 지용성 및 수용성 성분은 모든 농도군에서 독성이 없었다. LDL 과산화물가는 김치의 지용성 성분 첨가시 대조군에 비해 약 40% 정도 감소되었고 이는 농도에 의존적이지 않았다. 그러나 수용성 성분을 첨가하였을 때 과산화물가는 70-97% 정도 감소되어 cell free system에서의 보다 훨씬 더 큰 항 산화성을 보여주었다 (Table 48). 이에 비해 마늘 지용성 성분의 과산화물가는 2-45% 정도 낮았으며 수용성 추출물의 첨가 시에는 46-91% 정도의 산화 억제능을 보였다.

Table 48. Effect of Kimchi and Garlic extract on LDL susceptibility to oxidation in BAEC

		Lipid Peroxide (% of control)	MTT (% of control)
Control		0	100
Estrogen	0.1uM	-66.85 ± 10.54	463.26 ± 198.63
Kimchi	PEK 1	-42.21 ^a ± 11.24	183.18 ^a ± 60.24
	PEK 5	-44.23 ^a ± 9.83	320.26 ^a ± 152.31
	PEK 10	-42.29 ^a ± 11.51	312.96 ^a ± 106.43
	WEK 1	-69.42 ^a ± 2.31	187248 ^a ± 14.74
	WEK 5	-84.14 ^b ± 8.04	242.45 ^{ab} ± 56.35
	WEK 10	-96.97 ^c ± 5.11	438.68 ^b ± 209.81
Garlic	PEG 1	-1.5 ^a ± 1.07	108.71 ^a ± 15.65
	PEG 5	-2.51 ^a ± 1.21	182.03 ^a ± 59.57
	PEG 10	-44.54 ^b ± 12.43	653.49 ^b ± 258.61
	WEG 1	-48.82 ^a ± 18.98	108.61 ^a ± 8
	WEG 5	-75.92 ^{ab} ± 13.46	177.53 ^a ± 59.62
	WEG 10	-90.99 ^b ± 7.55	368.97 ^b ± 70.36

0.1uM estrogen 첨가 시 약 67%의 산화억제 효과를 보였다. MTT assay로 cell viability를 측정하였을 때 LDL 산화에 따른 세포의 사멸은 김치 및 마늘 첨가 군에서 LDL 산화를 억제함으로써 세포의 사멸을 방지하는 효과가 관찰되었다. 김치 및 마늘추출물의 첨가 시 세포생존율은 첨가 농도에 의존적으로 높아졌으며 김치의 지용성 추출물에서는 대조군에 비해 약 1.8-3.2배, 수용성 추출물에서는 1.9-4.4배, 그리고 마늘의 지용성 추출물은 1.1-6.5배, 그리고 수용성 추출물에서는 1.1-3.7배, 0.1uM estrogen 첨가시에는 4.6배 정도 세포생존율을 높였다. 이 결과는 마늘의 지용성 추출물에 LDL 산화를 억제하는 물질이외에 세포를 보호하는 성분이 있는 것으로 생각된다. 산화된 LDL의 electrophoretic movement을 agarose gel로 electrophoresis한 후 이들의 움직임을 native한 LDL의 이동거리에 대한 상대적인 거리 (relative electrophoretic movement)로 나타내었을 때 산화된 LDL의 rem이 3.71 이었고 여기에 김치 및 마늘의 추출물을 첨가하였을 때 산화된 LDL의 rem이 농도의존적으로 감소하였다(Table 49). 이상의 김치 추출물에 대한 LDL에 대한 산화억제 효과를 살펴보았을 때 김치의 항산화성은 마늘의 항산화성과 비교할 때 결코 적지 않음이 확인되었고 0.1uM estrogen의 항산화 효과 보다도 큰 것으로 밝혀져 앞의 동물실험에서 얻어진 지질대사억제 효과와 더불어 동맥경화를 예방하는 효과가 있는 것으로 확인된다.

Table 49. Relative electrophoretic movement of oLDL in the presence of kimchi and garlic extracts in BAEC

			REM
Control		0	3.71
Kimchi	p-ether extract	5 μ g/ml	3.57
		25 μ g/ml	3.28
		50 μ g/ml	3.00
	Water extract	5 μ g/ml	3.57
		25 μ g/ml	3.00
		50 μ g/ml	2.85
Garlic	p-ether extract	5 μ g/ml	3.57
		25 μ g/ml	3.57
		50 μ g/ml	2.57
	Water extract	5 μ g/ml	3.43
		25 μ g/ml	3.00
		50 μ g/ml	2.85

7. 배추의 동맥경화 예방 활성획분의 분리 및 활성물질 확인

1,2차년도 및 3차년도에서 확인된 김치의 동맥경화를 예방할 수 있는 활성 물질이 무엇인지 확인하기 위하여 배추김치를 담금 다음 5°C에서 2주간 발효숙성시켰다. 이때 김치의 pH는 4.13, 산도는 0.75%, 염도 2.24%이었다. 동결건조한 김치는 용매별로 획분하여 hexan, methanol, dichloromethan, ethyl acetate, butanol, 그리고 수층을 얻었으며 이들 각 획분의 LDL에 대한 항산화성을 TBARS의 측정과 conjugated diene kinetics 연구로 진행하였고, 활성이 큰 획분을 선택하여 콜레스테롤 1%와 김치 5%에 해당되는 활성 획분의 양을 계산하여 식이에 첨가하여 토끼를 사육하면서 동맥경화 요인에 미치는 영향을 실험하고 있는 중이며, 여기에서 확인된 획분을 가지고 4차년도에는 최종 활성물질을 분리동정할 계획이다

가) 배추김치의 용매 분획 및 수율

용매 획분별 수율은 hexan층 1.93, 메탄올층 49.1, dichloromethan층 1.66, ethyl acetate 층 1.12, butanol 층 2.97, 수층 43.38% 이었다.

나) 배추김치 용매획분의 LDL에 대한 항산화 효과

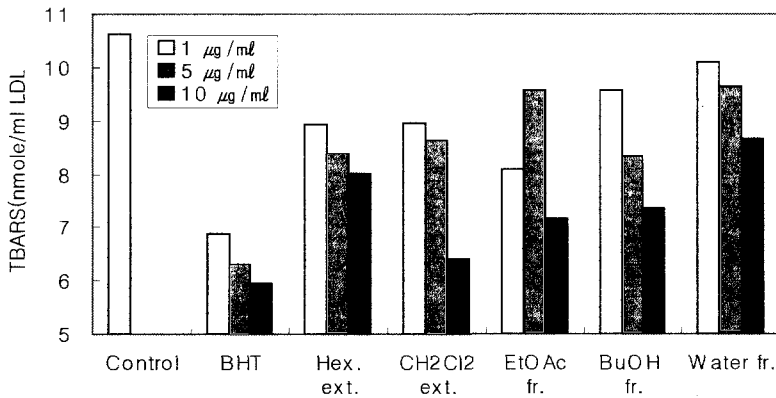


Fig. 73. Antioxidative effect of each fractions extracted from kimchi on the oxidation of LDL.

배추김치의 활성 획분별 동맥경화 억제 효과를 *in vitro* 상에서 살펴보기 위하여 건강한 성인에게서 공복시에 채혈한 혈액으로부터 LDL을 분리한 다음 Cu^{++} ion의 존재 하에서 산화를 진행시켜 LDL 산화생성 양상을 TBARS 농도 및 conjugated diene kinetics 연구에 의한 산화유도기의 연장시간으로 나타내었다. TBARS의 생성은 김치의 여러 활성 획분들의 존재하에서 모두 농도의존적으로 감소되었으며 (Fig. 73) 이중 dichloromethan 층의 항산화 효과는 가장 컸으며, $50 \mu\text{mol}$ 의 농도에서는 동일 농도로 첨가한 BHT의 항산화 효과의 90.6% 정도의 항산화 효과가 나타나 상당한 LDL 산화억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 50. Antioxidative effect of kimchi fractions against LDL oxidation in the presence of $2\mu\text{M Cu}^{++}$

	Lag phase(% of control)
Control	100
Water fr.	116.42 ± 10.87
EtOAc fr.	123.21 ± 16.61
Hexane fr.	137.07 ± 13.01
BuOH fr.	141.73 ± 11.86
CH ₂ Cl ₂ fr.	215.37 ± 41.95

The concentration of sample in the experiment was $25\mu\text{l}$

TBARS에서 얻어진 LDL에 대한 항산화 효과는 conjugated diene kinetic 연구에서도 모든 김치의 용매 획분에 LDL에 대한 항산화성이 있음이 확인이 되었으며 이중 dichloromethane 층의 항산화성이 가장 컸고, 항산화 효과를 산화유도기로 표현하였을 때 동일 농도의 control에 비해 산화유도기가 215%나 연장이 되어 상당한 효과가 있음을 나타내었다.

8. 김치용매 획분의 동맥경화 예방효과

김치의 항동맥경화성에 관한 실험을 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 실시한 결과 혈장과 지단백 획분으로부터 증성지질 및 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 있었고, 이를 대동맥궁 촬영에 의하여 확인하였으므로, 이러한 동맥경화를 억제시키는 데 관여하는 물질의 확인을 하고자 하였다.

가. 김치의 활성 용매 획분이 토끼의 혈중 지질 조성에 미치는 영향

1) 김치추출물의 분획

실험에 사용된 김치는 담근 후 상온에서 하루 둔 다음 냉장온도에서 15일간 숙성시켰다. 숙성된 김치의 pH는 4.13이고 산도는 0.75%로 발효숙성이 잘 된 맛이 좋은 상태였고, 염도 2.24, 환원당 1.26 그리고 젖산균수 9.07 이었다. 용매분획을 하기 위하여 동결건조한 배추김치의 일반성분은 수분 16.28, 조회분 0.03, 조단백 5.94, 조지방 1.28 그리고 식이섬유소는 18.55이었다. 활성성분을 분리하기 위해 동결건조한 김치 3kg을 헥산으로 추출하여 탈지한 다음 100% 메탄올로 추출하여 극성이 다른 용매 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH, Water로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물의 수득량은 Hexane 추출물 57.9, MeOH 추출물 1503.8, CH₂Cl₂ 획분 49.8, EtOAc 획분 33.7, BuOH 획분 89.0, Water 획분 1331.3이다.

2) *In vitro* 에서 김치 추출물 및 분획물의 LDL 산화 억제효과

김치의 용매별 분획물의 항동맥경화성을 LDL산화를 억제하는 정도를 살펴보았다. 건강한 성인으로부터 공복시에 채혈한 혈액에서 분리한 LDL에 김치 용매별 분획물을 농도를 달리하여 첨가하고 CuSO₄의 존재하에 산화시켰다. 김치 분획물을 첨가한 군과 대조군의 산화민감도를 산화유도기를 측정하여 대조군의 유도기를 100%로 표현하였을 때 H₂O획분 116.42, EtOAc획분 123.21, Hexane획분 137.07, BuOH획분 141.73 그리고 CH₂Cl₂획분이 215.37%로 모든 김치 분획물에서 산화유도기를 연장시키는 효과가 있었으며(p<0.05) 특히 CH₂Cl₂층은 산화유도기를 2배 가량 연장시키는 강력한 항산화력이 있었다(Table 51).

Table 51. The antioxidant effect of solvent fraction of kimchi on LDL oxidation expressed in lag phase

Fraction	Lag phase(% of control)
Control	100 ^a
H ₂ O fr.	16.61 ^{ab}
EtOAc fr.	137.07 ± 13.01 ^b
Hexane fr.	141.73 ± 11.86 ^b
BuOH fr.	215.37 ± 41.95 ^c
CH ₂ Cl ₂ fr.	

Values are means ± SD.

^{a-c}Data in columns were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

3) *In vivo* 에서 김치획분이 혈중지질농도 및 LDL산화능에 미치는 영향
이러한 LDL 산화억제력을 TBARS 방법으로 측정한 결과를 Fig. 74에 나타내었다.

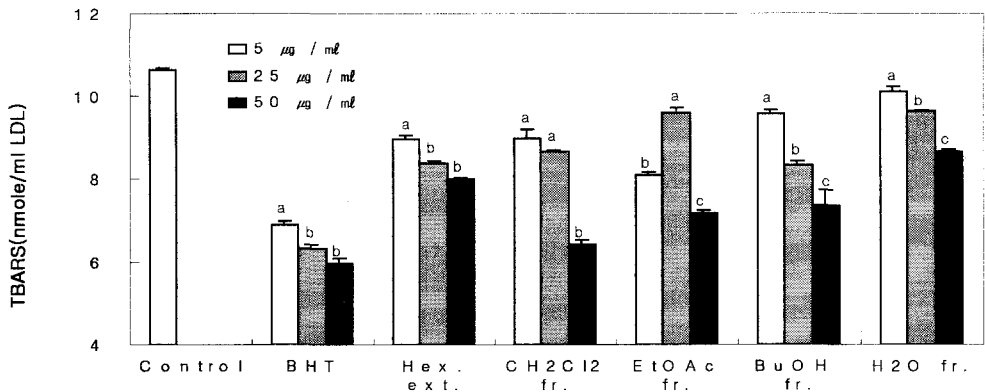


Fig. 74. Antioxidative effect of solvent fraction of *kimchi* on the susceptibility of LDL to oxidation

TBARS 값은 25µg/ml 농도일 경우 대조군이 10.63이고, BHT는 6.31, Hex추출물은 8.39, CH₂Cl₂획분은 7.65, EtOAc획분은 9.58, BuOH획분은 8.34, Water획분은 9.64로써, 대조군에 비해 각각 40.68, 21.10, 28.03, 9.95, 21.23, 9.30% 산화억제 효과가 있었다. 또한 EtOAc획분을 제외한 모든 획분에서 시료의 농도가 증가함에 따라 효과도 증가함을 알 수 있다.

가) 토끼의 체중 증가량

12주 동안 1% cholesterol 식이에 김치 용매분획물을 첨가한 식이를 섭취한 토끼의 체중 증가량을 Table 52에 나타내었다. 사육초기의 각 군간 토끼의 체중은 대조군이 2.12, CH₂Cl₂획분 첨가군 2.14, EtOAc획분 첨가군 2.16, H₂O획분 첨가군 2.09kg이였고 사육 12주후에는 대조군이 2.38, CH₂Cl₂획분 첨가군 2.41, EtOAc획분 첨가군 2.44 그리고 H₂O획분 첨가군 2.33kg으로 증가하였다. 따라서 체중 증가율은 각각 12.2, 12.7, 12.8 및 11.5%로 군간 큰 차이는 보이지 않지만 H₂O획분 첨가군의 체중 증가율이 비교적 낮았다.

Table 52. Percentage of body weight gain of rabbit fed atherogenic diet containing *kimchi* solvent fraction for 12 weeks.

Group ¹⁾	Initial body weight (kg)	Final body weight (kg)	Gain body weight (%)
B	2.116 ± 0.277	2.559 ± 0.214	12.2
BC	2.136 ± 0.199	2.542 ± 0.346	12.7
BE	2.160 ± 0.382	2.973 ± 0.219	12.8
BW	2.090 ± 0.235	2.672 ± 0.573	11.5

Value are means ± SD(n=6)

¹⁾B : basal diet(powdered chow pellet) group

BC : basal diet + 1% cholesterol + 1% olive oil + CH₂Cl₂ fr.

BE : basal diet + 1% cholesterol + 1% olive oil + EtOAc fr.

BW : basal diet + 1% cholesterol + 1% olive oil + Water fr.

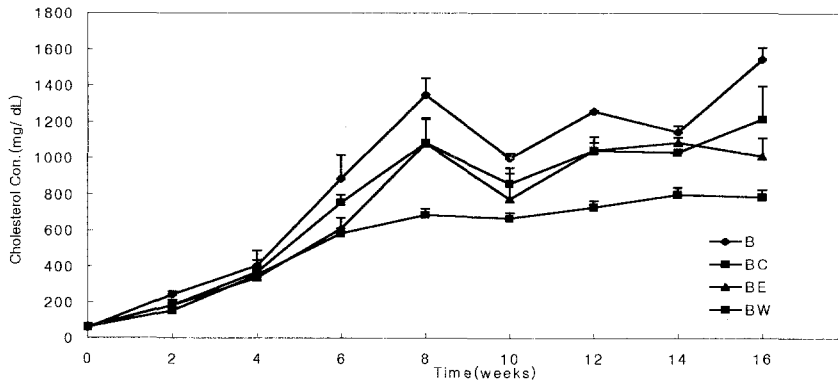


Fig. 75. Changes in plasma cholesterol concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

¹⁾ see table 52 for the composition of experimental diet

^{a-c}Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

나) 혈장과 지단백 획분의 콜레스테롤 함량 변화

콜레스테롤을 1% 첨가한 식이를 섭취한 토끼의 혈장 콜레스테롤 농도는 사육 기간 중 모든 군에서 증가하였으나 대조군에 비해 김치의 용매획분 첨가군들에 있어서 그 증가수준이 낮았으며 6주부터 변화의 정도는 차이가 있었다. 모든 김치의 용매획분 첨가군에서 콜레스테롤 상승을 억제하는 효과를 관찰하였고 dichloromethane 분획물을 첨가한 군에서 혈장 콜레스테롤의 상승을 억제하는 효과가 가장 컸었다(Fig. 75).

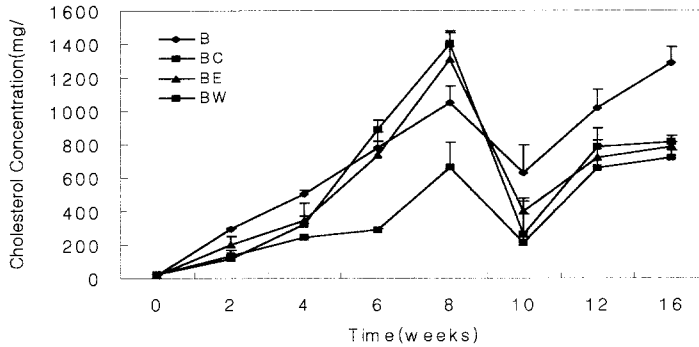


Fig. 76. Changes in LDL cholesterol concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

¹⁾ see table 52 for the composition of experimental diet

^{a, b} Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

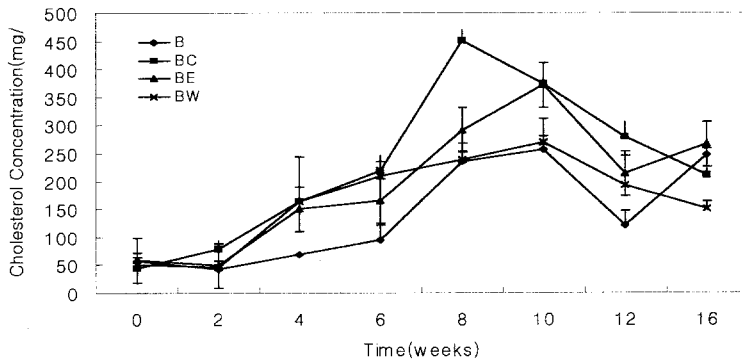


Fig. 77. Changes in HDL cholesterol concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

¹⁾ see table 52 for the composition of experimental diet

^{a-c} Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

VLDL 콜레스테롤 농도는 사육 기간이 경과함에 따라 증가하는데 사육 6주부터 그 증가 수준이 각 군간에 차이를 나타내었다. 사육 16주째에서는 대조군이 397.77, CH₂Cl₂획분 첨가군은 150.96, EtOAc획분 첨가군은 250.64, 그리고 H₂O획분 첨가군은 272.69 mg/dL로 대조군에 비해 각각 62, 36, 31%정도 낮았다. 용매획분 중 특히 CH₂Cl₂획분-첨가군이 VLDL 콜레스테롤 농도를 떨어뜨리는 효과가 가장 현저하였다.

LDL 콜레스테롤 농도 변화를 Fig. 76 에 나타내었다. 사육 4주까지 대조군에 비해 김치 용매획분의 첨가군들에서 낮게 나타났으나 8주에는 대조군이 1250.7, CH₂Cl₂획분 첨가군 660.78, EtOAc획분 첨가군 1305.05, H₂O획분 첨가군은 1402.27mg/dL로 EtOAc획분 첨가군과 H₂O획분 첨가군은 대조군에 비해 오히려 높게 나타났으며 CH₂Cl₂획분 첨가군의 LDL 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 47% 감소를 보였다. 그러나 사육 16주째에는 CH₂Cl₂획분 첨가군에서는 대조군에 비해 44%, EtOAc획분 첨가군은 38%, 그리고 H₂O획분 첨가군은 37% 정도 낮았다. HDL 콜레스테롤은 사육 4주째 부터 대조군에 비해 실험군에서 상승경향을 보였다(Fig. 77). 6주까지는 모든 용매획분 첨가군에서 대조군에 비해 HDL 콜레스테롤 농도가 높았으나 8주에는 대조군이 235.19, CH₂Cl₂획분 첨가군 451.05, EtOAc획분 첨가군 291.64, H₂O획분 첨가군은 237.81mg/dL로 그리고 H₂O획분 첨가군은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았고, CH₂Cl₂획분 첨가군과 EtOAc획분 첨가군은 대조군에 비해 각각 91%, 20%씩 증가하였다(p<0.05). 그러나 16주째에는 대조군이 246.76, CH₂Cl₂획분 첨가군 210.92, EtOAc획분 첨가군 266.22, H₂O획분 첨가군 151.03mg/dL으로 각 군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

다) 혈장과 지단백 획분의 중성지방 함량

변화사육기간의 경과에 따라 혈장 중성지질 농도가 증가하였으나 사육 4주째까지는 식이군간에 별로 차이가 없었으며 사육 6주째부터 대조군에 비해 김치의 용매획분 첨가군에서 증가수준이 감소하였으나 유의적이지 않았다(Fig. 78, p<0.05). 사육 8주째의 혈장 중성지질 농도는 대조군이 418.09, CH₂Cl₂획분 첨가군 378.77, EtOAc획분 첨가군 390.31 그리고 H₂O획분 첨가군 382.82mg/dL로 CH₂Cl₂획분 첨가군은 대조군에 비해 9.4% 감소를 보였다. 사육 16주째 혈중 중성지방농도는 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 60, EtOAc획분 첨가군 46, 그리고 H₂O획분 첨가군은 42% 정도 낮았다. VLDL 중성지질 농도는 대조군과 김치추출물 첨가군간의 차이를 보이지 않다가 16주째에는 대조군에 비해 EtOAc획분 첨가군과 CH₂Cl₂획분 첨가군은 36%, EtOAc획분 첨가군은 47%, 그리고 H₂O획분 첨가군은 38% 낮게 나타났다(Fig. 79).

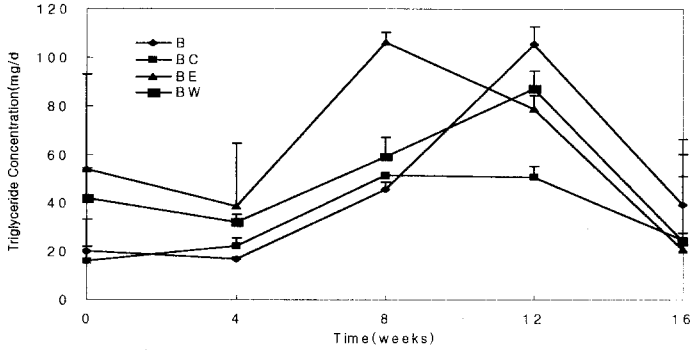


Fig. 78. Changes in plasma triglyceride concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of kimchi¹⁾ for 8 weeks.

¹⁾ see table 52 for the composition of experimental diet

^{a,b)} Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

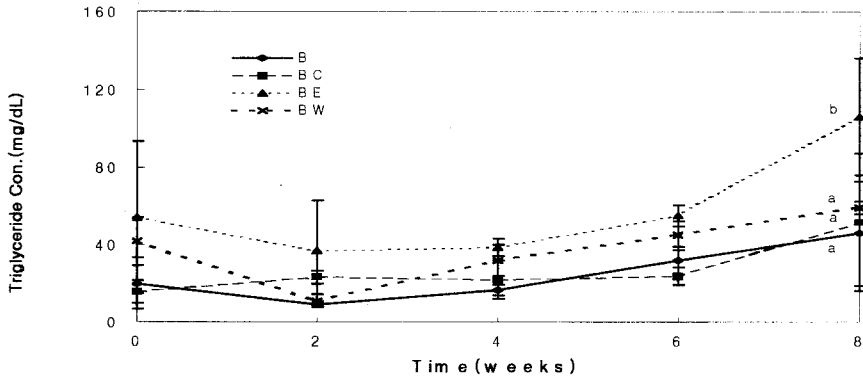


Fig. 79. Changes in VLDL triglyceride concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of kimchi¹⁾ for 8 weeks.

라) 동맥경화지수 변화

실험기간 중 각 군의 동맥경화지수 변화는 Table 53에 나타내었다. 콜레스테롤 첨가식이 섭취로 인해 모든 실험군에서 동맥경화지수가 상승하였으며 사육 16주째 각군의 동맥경화지수를 비교하였을 때 대조군에서의 상승이 현저하였다. 동맥경화지수는 대조군이 11.75, CH₂Cl₂획분 첨가군 1.81, EtOAc획분 첨가군 3.73 그리고 H₂O 획분 첨

가군 5.28으로 김치획분 첨가군에서 대조군에 비해 각각 84%, 68%, 그리고 55% 정도 낮아 김치 용매 획분이 동맥경화를 억제시킴을 관찰할 수 있었고 특히 CH₂Cl₂획분에서 동맥경화를 예방할 수 있는 물질이 있을 것으로 짐작되었다.

Table 53. Changes in atherogenic index¹⁾ of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*²⁾ for 16 weeks.

	0주	4주	8주
B	0.04±0.01	4.89±1.22a	4.74±0.38a
BC	0.40±0.19	1.16±0.05b	0.52±0.25d
BE	0.17±0.07	1.24±0.21b	2.71±0.94c
BW	0.27±0.16	1.26±0.40b	3.55±0.57b

¹⁾(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol

²⁾see table 52 for the composition of experimental diet.

^{a-d}Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

마) LDL 산화능 변화

김치 용매획분의 산화억제능을 살펴보기 위해 0주, 8주, 16주째 분리한 LDL을 이용하여 TBARS를 측정하였다. 0주째는 각군간의 유의적인 차이는 보이지 않았고, 8주째는 대조군이 8.71, CH₂Cl₂획분 첨가군은 4.44, EtOAc획분 첨가군은 6.08, 그리고 H₂O 획분 첨가군은 7.07 nmol/ml LDL였으며, 16주에는 대조군이 12.58, CH₂Cl₂획분 첨가군은 7.51, EtOAc획분 첨가군은 8.92, 그리고 H₂O획분 첨가군은 9.73 nmol/ml LDL로 사육기간 동안 증가하는 경향을 보였지만, 김치획분에서는 대조군에 비해 증가수준은 낮았다(Fig. 80).

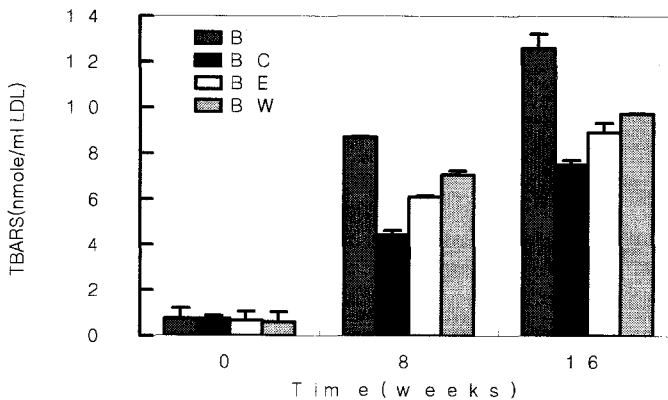


Fig. 80. TBARS of oxidized LDL of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

바) 혈장의 과산화 지질함량

사육 16주째 혈장의 TBARS는 대조군이 1.168, CH₂Cl₂획분 첨가군은 0.735, EtOAc획분 첨가군은 1.063, 그리고 H₂O획분 첨가군은 1.098 nmol/ml plasma으로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군은 37%, EtOAc획분 첨가군은 8%, 그리고 H₂O획분 첨가군은 5% 낮았다.

나. 김치의 용매획분이 간과 분변의 지질조성에 미치는 영향

1) 간의 콜레스테롤, 중성지방 그리고 인지질 함량

16주간 김치 획분별 섭취에 따른 간의 콜레스테롤, 중성지방 및 인지질의 농도 변화를 살펴본 결과 간의 콜레스테롤 함량은 대조군이 24.99, CH₂Cl₂획분 첨가군은 5.02, EtOAc획분 첨가군은 12.88, 그리고 H₂O획분 첨가군은 12.64 mg/g 으로 대조군에 비해 김치 분획물 첨가군에서 그 농도가 낮게 나타났으며, 특히 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 79% 낮음을 관찰하였다. 간의 중성지방 농도는 대조군이 5.20, CH₂Cl₂획분 첨가군은 3.56, EtOAc획분 첨가군은 3.78, 그리고 H₂O획분 첨가군은 4.37 mg/g로 특히 획분 첨가군에서 중성지방농도가 현저하게 낮아 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군은 31%나 떨어졌고 그의 EtOAc획분 첨가군은 27%, H₂O획분 첨가군은 15% 정도 떨어짐을 관찰하였다. 간의 인지질 농도는 대조군이 42.42, CH₂Cl₂획분 첨가군은 18.99, EtOAc획분 첨가군은 22.03, H₂O획분 첨가군은 25.69 mg/g로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군은 55%, EtOAc획분 첨가군은 48%, 그리고 H₂O획분 첨가군은 39% 정도로 낮았다(Table 54).

Table 54. Hepatic lipids concentration of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of Kimchi for 16 weeks

	Lipids(mg/g)		
	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
B	24.99±8.46	5.20±2.46	42.42±12.13
BC	5.02±2.16	3.56±1.79	18.99±8.28
BE	12.88±3.93	3.78±1.56	22.03±6.73
BW	12.64±9.98	4.37±1.84	25.69±11.03

B: Control BC: CH₂Cl₂ fr BE: EtOAc fr BW: Water fr

2) 분변의 총지방, 콜레스테롤 그리고 중성지방 함량

사육 16주째 이틀동안 수집한 분변을 살펴본 결과 분변의 콜레스테롤은 대조군이 48.40, CH₂Cl₂획분 첨가군은 42.47, EtOAc획분 첨가군은 51.81, 그리고 H₂O획분 첨가군은 32.55 mg/g으로 각군간에 두드러진 차이를 보이지 않았지만, CH₂Cl₂획분과 EtOAc획

분에서 분변의 콜레스테롤 배설량이 증가하였다. 분변의 중성지방은 대조군이 8.61, CH₂Cl₂획분 첨가군은 5.99, EtOAc획분 첨가군은 7.58, H₂O획분 첨가군은 6.75 mg/g이었고, 분변의 총지방 함량은 대조군이 192.7, CH₂Cl₂획분 첨가군은 123.4, EtOAc획분 첨가군은 47.5, 그리고 H₂O획분 첨가군은 48.7 mg/g이었다(Table 55).

Table 55. Fecal lipids concentrations of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of Kimchi for 16 weeks

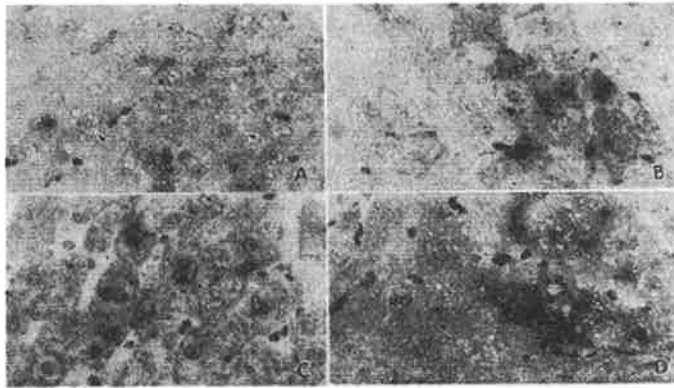
	Lipids(mg/g)		
	Cholesterol	Triglyceride	Total lipid
B	48.40±14.38	8.61±2.5	192.7±5.78
BC	42.47±16.78	5.99±0.35	123.4±2.34
BE	51.81±15.67	7.58±1.42	47.5±0.32
BW	32.55±6.20	6.75±0.68	48.7±1.19

B: Control BC:CH₂Cl₂ fr BE: EtOAc fr BW: Water fr

3) 간조직 및 대동맥조직의 미세구조

투과형 전자현미경(Transmission Electron Micrograph : TEM)을 이용해 조직의 미세구조를 관찰한 결과 대조군에서는 많은 지방구가 관찰되어 지방간이 유도되었음을 보여주었고, CH₂Cl₂획분 첨가군 EtOAc획분 첨가군과 H₂O획분 첨가군에서는 대조군보다는 지방간 현상이 억제되었음을 관찰할 수 있었고, 지방간 현상은 CH₂Cl₂획분 첨가군에서 가장 미미하였다(Fig. 81). 이러한 결과들로부터 간조직에서의 지방간 현상 억제효과는 CH₂Cl₂획분 첨가군에서 가장 뚜렷하였으며 EtOAc획분 첨가군과 H₂O획분 첨가군에서도 대조군에 비해 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 간조직의 지방농도를 분석한 결과와 일치하는 현상이다.

주사현미경(Scanning Electron Microscopy : SEM)을 이용한 대동맥궁의 미세구조를 Fig. 82에 나타내었다. 대조군의 대동맥궁에서는 지방 축적으로 인한 동맥경화성 플라그가 뚜렷하게 관찰되었다. 그러나 CH₂Cl₂획분 첨가군의 대동맥궁에서는 정상 대조군보다는 덜하였지만 동맥내피세포의 표면이 잘 유지되어 있었다. EtOAc획분 첨가군과 H₂O획분 첨가군은 대조군 보다는 지방 축적 현상이 덜 하였다. 이상의 연구보고들을 미루어 볼 때 본 실험의 결과인 김치 용매획분 첨가군에 있어서 병변형성이 억제되었던 것은 대조군에 비해 순환하는 지질농도가 낮았으며 또한 김치 용매획분중의 LDL 산화를 억제하는 물질에 의해 동맥경화성 플라그의 침착정도가 덜 하였다고 사료된다. 특히 본 연구실에서 발표한 보고에 의하면 김치 뿐만 아니라 김치 재료인 고추나 마늘의 피브린 분해능은 대조군에 비해 상당히 높았던 결과에 미루어 볼 때 CH₂Cl₂획분 첨가군에서는 동맥경화성 병변 생성을 직접적으로 억제하는 효과도 있다고 생각된다.



Hepatocytes of rabbits fed solvent fractions of *kimchi*
 A:control B:dichloromethane C:ethylacetate D:water

Fig. 81. Microstructures of hepatocytes seen under Transmission Electron Micrograph(TEM) of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of kimchi for 16 weeks($\times 4000$).
 A:control B:dichloromethane C:ethylacetate D:water

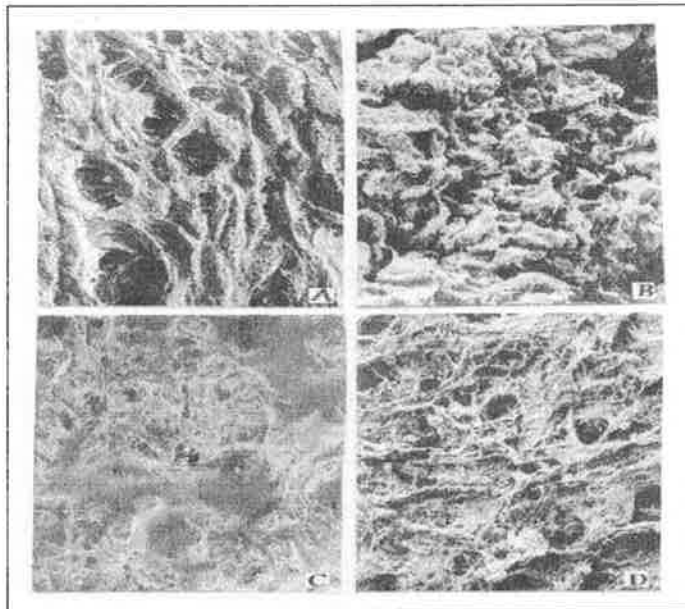


Fig 82. Microstructure of arch seen under scanin electron microscope of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of Kimchi for 16 weeks.
 A:control B:dichloromethane C:ethylacetate D:water

4) 김치의 용매활성획분이 토끼간의 인지질 지방산 조성에 미치는 영향

김치 용매획분의 섭취가 토끼 간의 막 유동성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 간의 인지질 지방산 조성을 분석하였다(Table. 56). 정상군(pellet diet만 섭취한 군)의 경우, Σ SFA, Σ MUFA 및 Σ PUFA 조성이 각기 46.54%, 19.06%, 33.77%로 나타났다. SFA 중에서는 18:0(27.79%), 16:0(17.43%)이, MUFA 중에서는 18:1(17.55%)이 그리고 PUFA 중에서는 C18:2가 주 지방산으로 나타났다. 실험대조군(pellet diet + 1% cholesterol)의 경우, Σ SFA, Σ MUFA 및 Σ PUFA 조성이 각기 49.69%, 23.76%, 26.56%로 나타났다. SFA 중에서는 18:0(23.77%), 16:0(23.88%)이, MUFA 중에서는 18:1(21.33%)이 그리고 PUFA 중에서는 C18:2가 주 지방산으로 나타나 정상군과 유사하였다.

Table 56. Fatty acid composition of phospholipid in liver of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

Fatty acid	N ²⁾	B	BC	BE	BW
14 : 0	0.32	0.37	0.29	0.15	0.18
15 : 0	0.18	0.46	0.43	0.30	0.33
16 : 0	17.43	23.88	22.57	20.94	22.61
16 : 1	1.18	1.98	1.84	1.60	1.55
17 : 0	0.82	1.21	1.49	1.18	1.29
17 : 1	0.33	0.45	0.59	0.47	0.46
18 : 0	27.79	23.77	26.43	24.04	26.87
18 : 1(n-9)	17.55	21.33	26.02	21.28	22.00
18 : 2(n-6)	32.75	25.70	18.70	28.26	23.40
18 : 3(n-6)	0.51	0.52	0.29	0.46	0.35
20 : 4(n-6)	0.15	0.34	0.32	0.21	0.18
20 : 5(n-3)	-	-	0.20	-	-
22 : 6(n-3)	0.36	-	0.31	0.32	0.30
24 : 0	0.64	-	0.52	0.49	0.49
SFA ³⁾	46.54	49.69	51.73	47.10	51.28
MUFA	19.06	23.76	28.45	23.65	24.01
PUFA	33.77	26.56	19.82	29.25	24.23
n-6	33.77	26.56	19.31	28.93	23.93
n-3	0.36	-	0.51	0.32	0.30
$\Sigma \omega 3 / \Sigma \omega 6$	0.01	-	0.03	0.01	0.01
P/M/S	1.77:1:2.44	1.12:1:2.09	0.7:1:1.82	1.24:1:1.99	1.01:1:2.14

¹⁾ See the legend of Table 52

²⁾ N : Normal (pell diet group)

³⁾ SFA : Saturated fatty acid, MUFA : Monounsaturated fatty acid

PUFA : Polyunsaturated fatty acid

김치 용매획분 첨가시 Σ SFA, Σ MUFA 및 Σ PUFA의 함량은 대조군과 유사하나 M/S의

비율은 CH_2Cl_2 획분 첨가군이 0.55로 대조군 0.48에 비해 높았으며 $\Sigma \omega 3/\omega 6$ 비율은 정상군과 EtOAc획분 첨가군 그리고 H_2O 획분 첨가군에서 0.01로 나타났으며, CH_2Cl_2 획분 첨가군에서는 0.03으로 나타나 ω -3 지방산의 함유율이 높았다. 그러나 실험대조군의 경우는 ω -3계 지방산이 존재하지 않았다. 이러한 인지질의 지방산 조성비를 살펴보았을 때 1% 콜레스테롤 식이를 한 토끼에 김치 용매획분을 첨가함으로써 세포막 지질의 유동성이 증가하였으며, 이러한 효과는 CH_2Cl_2 획분 첨가군에서 가장 뚜렷하였다.

5) 김치의 용매활성 획분이 HMG-CoA reductase 활성화에 미치는 영향

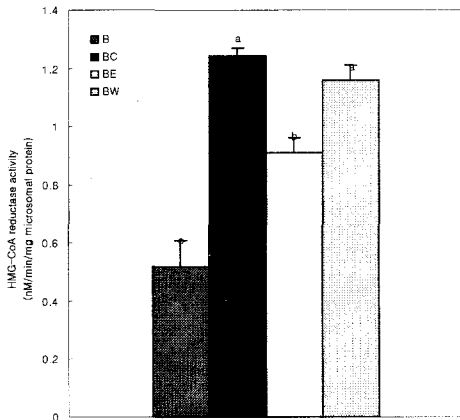


Fig. 83. Hepatic HMG-CoA reductase activity of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

¹⁾ See the legend of Table 52

a~d Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

간의 HMG-CoA reductase 활성화는 Fig. 83에 나타내었다. 대조군의 효소활성은 0.52, CH_2Cl_2 획분 첨가군 1.24, EtOAc획분 첨가군 0.91 그리고 H_2O 획분 첨가군이 1.16 nmole/min/mg microsomal protein으로 효소의 활성이 대조군에 비해 모든김치 획분 첨가군에서 높게 나타났다($p < 0.05$).

6) 김치의 용매활성 획분이 간의 지질과산화 억제에 미치는 영향

Table 57. Degree of hepatic lipid oxidation of rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi* for 16 weeks.

	TBARS(nmole MDA/g tissue)	POV(μ mole MDA/g liver)
B ¹⁾	21.63 \pm 6.91 ^a	33.82 \pm 10.19 ^a
BC	7.95 \pm 1.72 ^c	22.73 \pm 1.87 ^b
BE	9.39 \pm 5.58 ^b	31.00 \pm 3.37 ^a
BW	9.66 \pm 2.17 ^b	32.99 \pm 4.86 ^a

1) See the legend of Table 52

a~d Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

1% 콜레스테롤을 함유한 식이를 16주간 섭취시킨 토끼의 지질 산화정도를 간에서 살펴보았을 때 간의 TBARS 농도는 대조군 21.63, CH₂Cl₂획분 첨가군 7.95, EtOAc획분 첨가군 9.39 그리고 H₂O획분 첨가군이 9.66 nmol MDA/g tissue로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 63%, EtOAc획분 첨가군 56% 그리고 H₂O획분 첨가군 55% 정도 TBARS 농도가 낮았다(Table. 57, p<0.05). POV 농도는 대조군 33.82, CH₂Cl₂획분 첨가군 22.73, EtOAc획분 첨가군 31.00 그리고 H₂O획분 첨가군 32.99 μ mol/g tissue으로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 32%로 가장 낮게 나타났다(p<0.05). 김치 용매획분 첨가군에 있어서 1% 콜레스테롤 식이를 했음에도 불구하고 지질 산화 생성물의 양이 대조군에 비해 낮은 이유는 혈장 및 지단백질의 지방농도가 낮기 때문이라고 생각된다.

7) 김치의 용매활성 획분이 LDL 산화 억제에 미치는 영향

간 추출물의 LDL 산화억제 효과는 Table. 58에 나타내었다. 대조군 5.73, CH₂Cl₂획분 첨가군 3.09, EtOAc획분 첨가군 4.35 그리고 H₂O획분 첨가군 4.52 nmol/g tissue로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 46%, EtOAc획분 첨가군 24% 그리고 H₂O획분 첨가군이 21% 정도 TBARS 농도가 낮아져 LDL 산화가 김치 용매획분 첨가군에 있어서 현저히 억제되었음을 알 수 있었다(p<0.05).

Table 58. Effect of liver extract from rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi* on LDL oxidation

	LDL oxidation (nmol/gtissue)	% inhibition
B ¹⁾	5.73 \pm 0.12 ^c	0
BC	3.09 \pm 0.18 ^a	46.07
BE	4.35 \pm 0.74 ^b	24.08
BW	4.52 \pm 0.27 ^b	21.12

1) See the legend of Table 52

a~d Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

8) 김치의 용매활성 획분이 항산화 효소계에 미치는 영향

간의 Catalase 활성은 정상대조군 28, 대조군 38.32, CH₂Cl₂획분 첨가군 30.70,

EtOAc분 첨가군 32.47 그리고 H₂O획분 첨가군 32.57 mU/mg protein으로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 19%, EtOAc획분 첨가군 15% 그리고 H₂O획분 첨가군에서 15% 감소하여 대조군에 비해 모든 김치용매획분 첨가군에서 활성이 낮았으나 각 군간의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 84). 정상대조군에 비해 대조군에서 Catalase 활성이 높았던 것은 1% 콜레스테롤 섭취에 의한 산화적 스트레스로부터 자신을 보호하기 위해 radical을 제거하기 위한 것으로 보인다. GSH-px 활성은 정상대조군 0.0096, 대조군 0.0143, CH₂Cl₂획분 첨가군 0.0103, EtOAc획분 첨가군 0.0115 그리고 H₂O획분 첨가군 0.0117 unit/mg protein으로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 27, EtOAc획분 첨가군 19 그리고 H₂O획분 첨가군에서 18% 감소하였다(p<0.05)정상대조군에 비해 대조군에서 GSH-px 활성이 유의적으로 증가한 것은 catalase의 경우와 마찬가지로 생체내 산화적 스트레스로부터 생성된 과산화수소와 과산화지질을 무독화하기 위한 것으로 보인다. 모든 김치 용매획분 첨가군에서 대조군에 비해 활성이 감소한 것은 김치의 용매획분 중의 항산화물질이 증가한 과산화지질의 함량을 유의적으로 감소시키는 효과가 있었는데, 이는 김치 용매획분이 체내에서 생성된 free radical에 의한 지질 과산화반응을 억제시켰기 때문으로 사료된다. GSH-px는 Se을 함유하는 항산화계 효소로써 과산

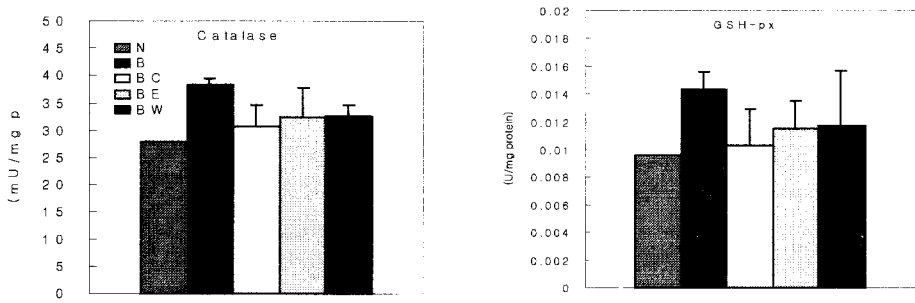


Fig. 84. Catalase and GSH-px activities of liver in rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.
¹⁾ See the legend of Table 52

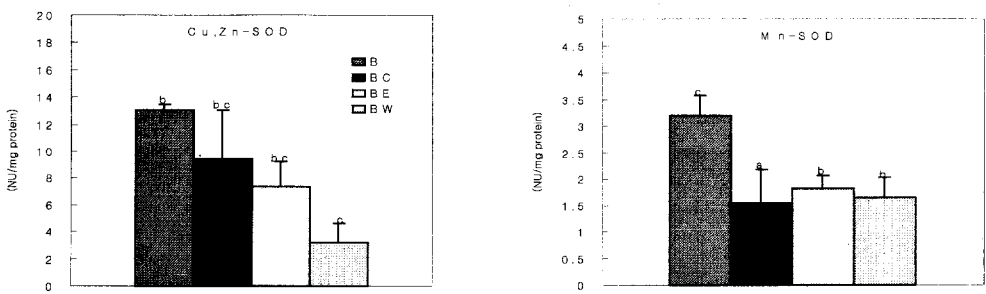


Fig. 85. Cu,Zn-SOD and Mn-SOD activities of liver in rabbit fed atherogenic diet containing solvent fraction of *kimchi*¹⁾ for 16 weeks.

¹⁾See the legend of Table 52

^{a-c}Data were significantly different analyzed by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

화지질과 H₂O₂의 무독화를 촉매하여 철분, 비타민 E, 필수지방산의 결핍시 GSH-px의 활성이 감소되고 산화적 스트레스에 의해 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. Cu,Zn-SOD 활성은 Fig. 85에 나타내었다. 대조군 13.03, CH₂Cl₂획분 첨가군 9.43, EtOAc획분 첨가군 7.37 그리고 H₂O획분 첨가군이 3.23으로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 27, EtOAc획분 첨가군 43, 그리고 H₂O획분 첨가군에서 75% 감소하였다. Mn-SOD활성은 대조군 3.20, CH₂Cl₂획분 첨가군 1.54, EtOAc획분 첨가군 1.81 그리고 H₂O획분 첨가군이 1.65로 대조군에 비해 CH₂Cl₂획분 첨가군 51, EtOAc획분 첨가군 43, H₂O획분 첨가군에서 48% 감소하였다.

다. 배추김치로부터 동맥경화 예방 물질의 분리

배추김치의 동맥경화예방 물질을 탐색하기 위해 숙성된 배추김치를 동결건조시킨 후 Hexane으로 탈지하고 MeOH로 추출하여 CH₂Cl₂획분, EtOH획분, BuOH획분을 얻었다. *In vitro* 상에서 LDL 산화억제능을 TBARS 및 Conjugated Diene등의 방법으로 살펴본 결과 CH₂Cl₂획분에서 LDL산화억제능이 가장 높게 나타났고, 이 획분을 16주 동안 섭취한 토끼에서 혈장지질농도 저하, LDL-C, VLDL-TG농도 저하 및 HDL-C농도 상승, 그리고 동맥경화지수가 저하되는 결과가 나타났다. 이를 근거로 CH₂Cl₂층으로부터 동맥경화 예방 물질을 탐색하고자 하였다.

1) CH₂Cl₂획분의 LDL 산화능

김치의 CH₂Cl₂획분을 MeOH층과 Hexane층으로 다시 분리하여 *in vitro* 상에서 12시간 공복한 사람으로부터 채취한 혈액으로 LDL을 분리했다. 분리한 LDL을 10mM phosphate buffered saline (pH 7.4)로 24시간 동안 투석하였다. CuCl₂ 832 μM 3.65 μl을 가하여 Cu²⁺의 최종농도가 2 μM이 되게 한 다음 2시간 동안 40℃에서 산화시켰을 때 LDL 산화 정도를 측정하였다. 그 결과 LDL의 TBARS 값은 CH₂Cl₂ 획분층의 MeOH층이 시간이 경과함에 따라 Hexane 층보다 2배 정도 낮게 나타났다.

2) DPPH test를 이용한 항산화능

MeOH층과 Hexane층의 분획물을 2mg씩 취하여 MeOH로 25ml로 정용한 후에 각각의 농도를 80 μg/ml, 60 μg/ml, 40 μg/ml, 20 μg/ml, 10 μg/ml, 5 μg/ml, 2.5 μg/ml, 1.25 μg/ml, 0.625 μg/ml 로 희석하여 4ml가 되게 한 다음, 1.5 × 10⁻⁴ M/ml 농도로 MeOH에 용해시킨 DPPH 용액 1ml씩을 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치 후, 520nm에서 optical

density(OD)를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않는 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 환산하여 살펴본 결과 아래와 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Table 59).

Table 59. Free radical scavenging effect of solvent fraction

Samples	50% reduc. * ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)
MeOH ext.	28.2
MeOH fr.	15.3
Hexane fr.	6.82
L-Ascorbic acid	3.4

*Amount required for reduction of DPPH after 30 min.
Values are means of three times

3) 활성물질의 분리 및 동정

TBARS방법과 DPPH test로 얻어진 결과에서 김치의 CH_2Cl_2 획분 가운데 MeOH층이 LDL 산화 생성물이 적게 생성되었고, DPPH test를 통해서도 free radical 소거능이 크게 나타났다. 이를 근거로 하여 MeOH층을 silica gel colum chromatograph와 sephadex 및 TLC로 분리하여 그 활성물질을 찾고자 하였다.

가) Silica gel colum chromatograph에 의한 획분 분리

MeOH층을 더욱 세분하여 분획하고 최종적으로 그 성분들을 분리하기 위해서 silica gel(Kiesel gel Art.7734,Merck)을 충분히 현탁시켜 고정된 column에 조심스럽게 가하였다. 시료를 silica gel 15g과 섞어서 잘 흡착시킨후 건조시켜 column에 가하였다. 처음엔 Dichloromethane와 methanol을 10:1의 비율로 가하다가 점점 methanol의 양을 늘려주면서 용출을 시작하여 50m ℓ 씩 분취하여 204개의 획분을 얻었다.

나) Thin layer chromatography를 이용한 정성

각 용매 분획물과 colum chromatography에서 활성 성분을 정성하기 위해서 Thin layer chromatography(TLC)를 수행하였다. Precoating 된 TLC용 silica gel plate(Kiesel gel F254)에 각 분획물과 colum chromatography에서 분리된 획분의 농축액을 점적하고 전개용매로 전개시켰으며 활성성분이 어느 전개부위에 위치하는지를 알기 위해 UV254nm에서 확인하였고 동일 조건에서 전개시켜 50% H_2SO_4 를 분무한 후 탄화시켜 TLC상에서 활성성분을 확인했다.

다) DPPH spray test

TLC상에서 전개시킨 물질이 어느 부위가 활성이 강한지를 확인하기 위해서 DPPH spray test를 실시하였다. 전개시킨 물질에 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl(DPPH)와

EtOH를 1:270의 비율로 섞어서 만든 spray를 분사하였다. 완전히 보라색으로 변한 plate에서 활성이 있는 부분은 노란색을 띄게 되는데, 활성이 강할수록 진한 노란색을 띄게 된다. 이 test에서 활성이 있는 부분을 다시 나누어서 좀더 세부적으로 분리 및 동정하였다.

라) Sephadex를 이용한 분리

silica gel colume chromatography를 통해 얻어진 획분을 TLC상에서 분리하고 DPPH spray test를 실시한 뒤 좀 더 단일에 가까운 물질로 정제하기 위해서 Sephadex를 이용한 분리를 실시하였다. 여기에서 얻어진 획분을 다시 TLC plate 상에서 활성test를 실시하고 그 획분의 성질에 따라 silica gel colume chromatography와 Sephadex로 분리를 하였다.

마) 활성물질의 동정

앞서 실시한 silica gel colume chromatography의 fraction 204중 H-NMR, C-NMR 및 GC-Mass을 통해 활성이 있는 물질로 분리동정된 것은 β -sitosterol과 benzoquinone 유도체이다.

9. 항동맥경화 배추김치의 조제

1) 배추김치 기본 recipe의 개발

문헌에 의거한 전통 recipe를 기준으로 하여 최종 김치염도가 2.2%, 맛이 증진된 경기 지역 중심의 김치 recipe를 개발하였으며, 관능성 및 기능성이 우수하게 기타 고춧가루와 마늘의 양을 늘렸다.

Table 60. kimchi recipe(1000g 당)

Ingredients	control
Chinese cabbage	1000
red pepper powder	25
garlic	14
ginger	6
fermented shrimp sauce	0
fermented sandlance sauce	0
glutinous rice paste	0
anchovy juice	20
sugar	10
radish	130
green onion	20
Shrimp sauce	0

2) 항동맥경화 기능성 및 관능성이 증진된 recipe의 개발

배추김치에 각각 5%, 10%, 20%의 갓과 부추를 첨가하여 총 7종의 김치를 담금하여 (Table 61), 15°C에서 숙성시켰으며 산도와 염도를 측정하였다. 또한 0, 3, 6, 9, 12일에 각각 꺼내어 관능검사를 시행하였다. 이 때 관능검사 결과가 좋았던 6일과 9일의 20% 부추첨가김치, 20% 갓첨가김치, 대조군김치를 사용하여 김치의 항산화능을 살펴보았다.

Table 61. kimchi recipe (1000당)

Ingredients	control	갓김치군			부추김치군		
		5%	10%	20%	5%	10%	20%
chinese cabbage	1000	950	900	800	950	900	800
Mustard leaf	0	50	100	200	0	0	0
Leek		0	0	0	50	100	200
red pepper powder	25	36	36	36	36	36	36
garlic	14	33.75	33.75	33.75	33.75	33.75	33.75
ginger	6	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
fermented shrimp sauce	0	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
fermented sandlance sauce	0	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
glutinous rice paste	0	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8	12.8
anchovy juice	20	0	0	0	0	0	0
sugar	10	0	0	0	0	0	0
radish	130	0	0	0	0	0	0
green onion	20	0	0	0	0	0	0
Shrimp sauce	0	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5

Table 62. POV of 20% Mustard leaf and leek added kimchi

시료명	6일째	9일째
Lionleic acid+water	4.53±0.69	
대조군 김치	0.93±0.42	3.09±2.01
20%갓첨가김치	1.37±0.50	2.73±0.51
20%부추첨가김치	1.65±0.22	3.45±0.91

김치의 항산화능은 linoleic acid를 사용하여 자동산화계를 조제한후(20% linoleic acid 2ml와 0.01M 인산완충용액 4ml 및 증류수 2ml) 김치를 마쇄하여 원심분리후 여과시킨 김치액 2ml을 첨가하여 사흘간 37℃에서 incubation시켰으며 AOAC방법으로 POV를 측정하였다. 그 결과, 갖의 경우 20%씩 첨가해도 관능검사가 좋았으며 대조군 김치에 비해 항산화능이 있는 것으로 나타났기(Table 62) 때문에 20%이상 첨가한 김치를 담기로 결정하였으나, 부추김치의 경우 관능검사결과 외견이 바람직하지 않은 것으로 나타나 시료에서 제외시켰다.

그 다음, 배추김치에 갖의 첨가량을 결정하기 위해 대조군김치(배추김치), 25% 및 50% 갖첨가 김치를 담급하여(Table 63), 0, 3, 6, 9, 12일에 걸쳐 관능검사를 하였으며 결과가 좋았던 6일의 김치를 사용하여 POV를 측정하였다.

Table 63. kimchi recipe(1000g당)

Ingredients	control	25%갖첨가김치	50%갖첨가 김치
chinese cabbage	1000	750	500
Mustard leaf	0	250	500
red pepper powder	25	36	36
garlic	14	33.75	33.75
ginger	6	1.9	1.9
fermented shrimp sauce	0	22.5	22.5
fermented sandlance sauce	0	22.5	22.5
glutinous rice paste	0	12.8	12.8
anchovy juice	20	0	0
sugar	10	0	0
radish	130	0	0
green onion	20	0	0
Shrimp sauce	0	42.5	42.5

Table 64. POV of kimchi

시료명	6일째
Linoleic acid+water	4.53±0.69
대조군 김치	3.48±1.59
25%갖첨가김치	1.72±0.33
50%갖첨가김치	0.75±0.25

그 결과, 대조군 김치보다 25% 갖첨가김치가 또한 25%갖첨가김치보다는 50%의 갖첨가김치가 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다(Table 64). 그러나, 25%의 갖첨가김

치에 대해서는 관능검사가 호의적이었으나 50% 갓첨가김치는 바람직하지 않은 향미가 난다는 의견이 많았다. 그래서 이를 참조하여 25%의 수준보다는 높은 30%의 갓첨가 김치를 담금하였으며, 아울러 50%의 갓첨가김치도 함께 담금하여 다시 관능검사를 해 보았다. 그리고 본 실험김치의 항산화력을 증진시키기 위해 갓은 일부분만 사용하였다. 대조군 김치, 30%, 50%의 갓첨가김치(Table 65)를 15℃에서 발효시키면서 0, 3, 6, 9일날 관능검사를 실시하였고, POV를 측정하였다(Table 66).

Table 65. kimchi recipe(1000g당)

Ingredients	control	30%갓김치	50%갓김치
chinese cabbage	1000	700	500
Mustard leaf	0	300	500
red pepper powder	25	39.6	36
garlic	14	37.13	33.75
ginger	6	2.09	1.9
fermented shrimph sauce	0	22.5	22.5
fermented sandlance sauce	0	22.5	22.5
glutinous rice paste	0	12.8	12.8
anchovy juice	20	0	0
sugar	10	0	0
radish	130	0	0
green onion	20	0	0
Shirmp sauce	0	42.5	42.5

Table 66. POV of kimchi

시료명	0일째	3일째	6일째	9일째
Lionleic acid	19.77±6.27			
대조군 김치	11.66±0.58	9.30±0.95	4.96±0.79	3.20±0.21
30%갓첨가김치	5.51±1.51	4.22±0.73	2.55±0.29	2.26±0.93
50%갓첨가김치	3.54±0.79	2.91±0.57	2.00±0.01	1.49±0.00

그 결과 관능검사 결과가 좋고 항산화 효과도 높은 30% 갓을 첨가한 배추김치를 개발하였다.

3) 기능성 김치의 선정 및 발효 속성

본 실험에 선정된 30% 갓첨가김치는 담금하여 15℃에서 24시간 숙성시킨후, 5℃에서 8일간 숙성시켰다.

제 4 절 결론

한국인은 심혈관계질환의 발병율이 서구인에 비해 낮은 편이고, 이는 한국인의 항산화성식이, 특히 한국인이 항상 김치를 섭취하고 있기 때문이라는 사실에 기초하여 동맥경화를 예방할 수 있는 배추 김치를 개발하고자 하였다.

본 연구를 수행하기 위하여 첫째 배추김치가 동맥경화를 예방하는 효과가 있는지를 흰쥐에게 김치 3, 5, 그리고 10%을 첨가하여 사육하였을 때 혈장 및 간의 콜레스테롤 및 중성지방의 농도가 김치 첨가 농도에 의존적으로 감소하였고, LDL-C 은 감소하고, HDL-C은 증가하여 김치에 의한 효과가 뚜렷이 관찰되었다. 이에 김치의 지질저하 효과가 재료에서 오는지의 여부를 확인하기 위하여 토끼에게 1% cholesterol을 첨가한 동맥경화식이에 동결건조한 배추가루 8%, 고춧가루 1%, 마늘가루 1%을 첨가하여 16주 사육한 후 대조군과 비교하였을 때 혈장 및 간의 지질농도를 떨어뜨리는 결과를 확인할 수 있었으며 고춧가루 및 마늘을 첨가한 식이를 섭취한 토끼 동맥 내벽의 미세구조는 대조군에 비해 파괴가 거의 되지않고 잘 보존되어 있었다. 그리고 LDL 산화억제에 관한 *in vitro* 실험에서 마늘 및 고춧가루의 첨가 농도에 의존적으로 LDL 산화가 억제됨이 확인되어 항동맥경화성을 증진시키기 위해 김치담금시 두 부재료의 첨가량을 높일 필요성이 있었다. 동맥경화를 예방하는 활성물질을 확인하기 위하여 김치를 용매별로 분획한 후 이를 토끼의 식이에 김치 5%에 해당되는 양으로 첨가한 다음 16주간 사육하였을 때 dichloromethane 획분을 첨가한 식이를 섭취한 군의 동맥경화 예방효과가 가장 현저하였으며, 이 획분으로부터 물질을 분리 동정하였다.

이상의 결과에서 배추김치는 동맥경화를 예방할 수 있는 기능성을 기초 연구를 통하여 확인하였기에, 이를 기초로 하여 김치의 동맥경화 예방성을 증진시키고, 관능적으로 우수한 배추김치를 제조하기 위한 연구를 실시하였다.

제 5 절 참고문헌

1. 전희정 : 김치의 영양과 효능. 한국 김치의 세계화를 위한 과제의 방향, 5(1994)
2. 송영옥 : 김치 및 김치 부재료의 동맥경화 예방효과. *김치의 과학과 기술* (부산대학교 김치 연구소 제6회 심포지움), p5-7(1997)
3. 장택수 : 한국에서의 신미종 고추에 대한 연구현황과 그에 대한 고찰, 전북대학교 석사학위논문(1983)
4. 유리나 : 김치내 고춧가루 매운 성분(캡사이신)의 면역증강 및 항성 인병성 효과. *김치의 과학과 기술*(부산대학교 김치연구소 제 2회 심포지움), 1, 143(1995)
5. 권명자 : 배추김치의 동맥경화 예방효과에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문 (1998)
6. 김미정 : 김치 및 김치재료가 피브린 분해활성 및 면역세포 증식에 미치는 영향. 부산대학교 석사학위 논문(1998)

7. 황지원 : 김치의 용매획분이 토끼의 혈중지질 조성에 미치는 영향. 부산대학교 석사학위논문(1999)
8. 김현주 : 배추김치 용매활성획분의 동맥경화 예방효과. 부산대학교 석사학위논문(2000)
9. 전혜년 : 김치 획분이 콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼 장기의 지질 특성에 미치는 영향. 부산대학교 석사학위 논문(2000)
10. 이윤미 : 배추김치의 methanol 추출물에서 분리·동정된 동맥경화 예방물질에 관한 연구. 부산대학교 석사학위 논문(2000)
11. 최선혜 : 김치 pill 섭취가 혈중 지질 농도에 미치는 영향. 부산대학교 석사학위 논문(2000)
12. Hesler, C.B., Swenson, T.L. and Tall, A.R. : Purification and characterization of a human plasma cholesterol ester transport protein, *J. Biol. Chem.* 262, 5, 2275-2282(1987)
13. Jarnagin, A.S., Kohr, W. and Fielding, C. : Isolation and specificity of a Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 1854-1857(1987)
14. Agellon, L.B., Quinet, E.M., Gillette, T.G., Drayna, D.T., Brown, M.L. and Tall, A.R. : Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene, *Biochemistry*, 29, 1372-1376(1990)
15. Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P. and Moser, U. : Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross culture epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 326(1987)
16. Esterbauer, H., Gebicki, J., Pohl, H. and Jurgens, G. : The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.*, 13, 341d(1992)
17. Shen, G.X., Novak, C. and Angel, A. : Effect of dietary vitamin E supplements on cholesteryl ester transfer activity in hamster adipose tissue. *Atherosclerosis*, 124, 211(1996)
18. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. : Beyond cholesterol : modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.*, 320, 915-924(1989)
19. Berliner, J.A., Territo, M., Sevanian, A., Ramin, S. and Kim, J.A. : Ramshad B esterson M, Fogelaman A.M. : Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin Invest.* 85, 1260-1266(1990)
20. Fogelman, A.M., Shechter, I., Sieger, J., Hook, M., Child, J.S. and Edward, P.A. : Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 77, 2214-2218(1980)

21. Morel D.W., Hessler, J.R. and Chisolm, G.M. : Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids., *J. Lipid. Res.*, 24, 1070-1076(1983)
22. Fower, S., Shio, H. and Haley, N.J. : Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations, *Lab. Invest.*, 41, 372(1979)
23. Kawada, T., Hagigara, K. and Iwai, K. : Effect of capsaicin on lipid metabolism in rats fed diet. *J. Nutr.*, 116, 1272(1986)
24. Jain, M.K. and Apitz-Castro, R. : Garlic : A product of spilled ambrosia. *Current Scie.*, 65, 148-156(1993)
25. Warshafsky, S., Kamer, R.S. and Sivak, S.L. : Effect of garlic on total serum cholesterol : A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 119, 599-605(1993)
26. Kamanna, V.S. and Chandrasekhara, N. : Effect of garlic (*Allium Sativum* Linn) on serum lipoproteins and lipoprotein cholesterol levels in albino rats rendered hypercholesteremic by feeding cholesterol. *Lipid.*, 17, 483-488(1982)
27. Stacy, Phelps and William, S. : Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids.*, 28, 475-477(1993)
28. Giri, J., Devi, T.K. and Meerernani., S. : Effect of ginger on serum cholesterol levels. *Ind. J. Nutr. Dietet.*, 21, 433-436(1984)
29. Song, J. and Wander, R.C. : Effect of dietary selenium and fish oil(MaxEPA) arachidonic acid metabolism and hemostatic function in rats. *J. Nutr.*, 121, 284-292(1991)
30. Drevon, D.A. : Marine oils and their effects. *Nutr. Rev.*, 50, 38-40(1992)
31. 김정선 : 불포화 지방산의 종류와 사육기간이 흰쥐의 항혈전작용, 혈액구성 및 혈소판의 지방산 조성 변화에 미치는 영향, 이화여자대학교 석사학위논문(1991)
32. 조성희 : 지방질과 동맥경화증. *한국식품영양과학회지*, 23, 170-179(1994)
33. 문갑순, 송영선, 류복미, 전영수 : 시판 멸치 액젓의 품질과 그 액젓으로 제조한 김치의 품질 연구. *김치의 과학과 기술*, 13, 32-37(1997)
34. Miesenock, G. and Patsch, J.R. : Relationship of triglyceride and high-density lipoprotein metabolism. In "*Atherosclerosis reviews*" Leaf, A. and Webber, P.C. (ed), Raven Press, New York, Vol. 21, p.119-123(1990)
35. 이은화 : 양파, 마늘, 석이, 영지가 고콜레스테롤 식이로 사육한 토끼의 동맥경화성 병변에 미치는 영향에 관한 연구, 서울대학교, 식품영양학과, 박사학위논문(1989)
36. Casteli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W.F., Abbott, R.D., Kalousdian, S.

- and Kannel, W.B. : Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA.*, 256, 2835-2845(1986)
37. Yia-Herttuala, S., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., et al. : Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low-density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, DSA. 87, 6959-6963(1990)
 38. Jonasson, L., Holm, J., Skali, O., Bondjers, G. and Hansson, G. : Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Artherosclerosis.*, 6, 131-138(1986)
 39. Ishwarlal, Jialai. and Sridevi, Devaraj. : The role of oxidized low density lipoprotein in Atherogenesis. *J. Nutr.*, 126 : 1053s-1057s(1996)
 40. Michael, Aviram. : Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in Atherosclerosis, and the Antiatherogenicity of Antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem.*, 34, 599-608(1996)
 41. Aviram, M. : Oxidative modification of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Isr. J. Med. Sci.*, 31, 241-249(1995)
 42. Esterbauer, H., Gebicki, J., Pohl, H. and Jurgens, G. : The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free radic. Biol. Med.*, 13, 341d(1992)
 43. Proctor, P.H. : Free radicals and human disease. In "CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine" Miquel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H.(eds.), CRC press, Florida, Vol 1, p.209-222(1989)
 44. Woollett, L.A., spady, D.K. and Dietschy, J.M. : Mechanisms by which saturated-triacylglycerols elevate the plasma low density lipoprotein-cholesterol concentration in hamsters. *J. Clin. Invest.*, 84,119-126(1989)
 45. Mattson, F. H. and Grundy, S.M. : Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acid on plasma lipids and lipoprotein in man. *J. Lipid. Res.*, 26, 194-214(1985)
 46. Mensink, R.P. and Martijn, B.K. : Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N. Engl. J. Med.*, 321, 436-445(1989)
 47. Prisco, D., Filippini, M., Francalanci, I., Paniccia, R., Gensini, G.F., Abbate, R. and Sernerri, G.G.N. : Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid

- intake on phospholipid fatty acid composition in plasma and erythrocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 925(1996)
48. Rebollo, A.J.G., Botejara, E.M., Cansado, A.O., Blanco, P.J.M., Bellido, M.M., Sanchez, A.F., Arias, P.M. and Alvarez, J.E.C. : Effects of consumption of meat product rich in monounsaturated fatty acids(the ham from the iberian pig) on plasma lipids. *Nutr. Res.*, 18, 743-751(1998)
 49. Fuhrmann, H. and Sallmann, H.P. : Phospholipid fatty acids of brain and liver are modified by α -tocopherol and dietary fat in growing chicks. *Br. J. Nutr.*, 76, 109-118(1996)
 50. Sardesai, V.M. : The essential fatty acids. *Nutr. Clin. Prac.*, 7, 179(1992)
 51. Melchior, D.L., Scavitto, F.J. and Steim, J.M. : Dilatometry of dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochemistry.*, 19, 4828-4831(1980)
 52. Sandermann, H.Jr. : Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochem. Biophys. Acta.*, 515, 209-215(1978)
 53. Power, G.W., Yaqoob, P., Harvey, D.J., Newsholme, E.A. and Calder, P.C. : The effect of dietary lipid manipulation on hepatic mitochondrial phospholipid fatty acid composition and carnitine palmitoyltransferase I activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34, 671-675(1994)
 54. 이윤형, 신용목, 이재은, 최용순, 이상영 : 식물추출물로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase의 활성저해제의 탐색. *한국생물공학회지*, 6, 55-64(1991)
 55. Hoffman, W.F., Alberts, A.W., Anderson, P.S., Chen, J.S., Smith, R.L. and Willard, A.K. : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. 4. Side chain ester derivatives of mevinolin. *J. Med. Chem.*, 29, 849-851(1986)
 56. Pietro, D.A. and Mantell, G. : Simvastatin : a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovasc. Drug. Rev.*, 8, 220-228(1990)
 57. Hattersley, J.G. : Lowering cholesterol with lovastatin : the wrong approach. *J. Otrhomolecul. Med.*, 9, 54-59(1994)
 58. Masters, B.A., Palmoski, M.J., Fling, O.P., Greff, R.E., Wang-Iverson, D. and Durham, S.K. : In vitro myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol, Appl. Pharmacol.*, 131, 163-165(1995)

59. Yao, T., Sato, M., Kobayashi, Y. and Wasa, T. : Amperometric assays of total and free cholesterol in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterases and cholesterol oxidant reactors and peroxidase electrode in a flow injection system. *Anal. Biochem.*, 149, 387-392(1985)
60. Buccolo, G. and David, H. : Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, 19, 476(1973)
61. Folch, I.L. and Stanley, G.H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biochem.*, 223, 498-499(1956)
62. Sale, F.O., Marchesini, S., Fishman, P.H. and Bsrria, B. : A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal. Biochem.*, 142, 347-348(1984)
63. Lepage, G. and Roy, C.C. : Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid. Res.*, 27, 114-120(1986)
64. Converse, C.A. and Skinner, R.E. : Lipoprotein analysis. A practical approach. *Oxford University Press*, p205-206(1992)
65. 주노현, 조현기, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조 : 식품분석법, 유림문화사 (1992)
66. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymol.*, 52, 302-310(1978)
67. Aebi, H. : Catalase *in vitro*. *Methods in enzymol.*, Academic Press, 105, 121-126(1984)
68. Leopold, Flohe. and Wolfgang, A. Gunzler : Assays of Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-121(1984)
69. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, 4, 290-291(1948)
70. Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G. and Stein, O. : Cholesteryl ester transfer protein activity in hamster plasma increased by fat and cholesterol rich diets. *Biochem. et. Biophys. Acta.*, 1042, 138-145(1990)
71. Young-Sun, C. and Donald, B.Z. : Increased lipid transfer activities in hyperlipidemic rabbit plasma. *Atherosclerosis*, 6, 3-7(1986)
72. 서진아 : 고콜레스테롤식이 토끼의 혈장콜레스테롤대사와 조직변화에 미치는 영향. 경북대학교 식품영양학과, 석사학위논문(1997)
73. Glen, E.M., Evelyn, M.J.C., Alex, M. and Henry, C.M. : Dietary cholesterol and type of fat differentially affect cholestrol metabolism and

- athrosclerosis in baboons, *American Institute of Nutrition*, 16, 1397-1406(1992)
74. Witztum, J.L. : The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, 344, 793-795(1994)
 75. Joseph, Loscalzo : Lipoprotein(a) A unique risk factor for atherothrombotic disease. *Arteriosclerosis*, 10, 672-679(1990)
 76. Steinberg, D., M.D., PhD, Joseph, L., Witztum, M.D. : Lipoproteins and Atherogenesis. *JAMA*, 264, 3047-3052(1990)
 77. Miesenock, G. and Patsch, J.R. : Relationship of triglyceride and high-density lipoprotein metabolism. In "Atherosclerosis reviews" Leaf, A. and Weher, P.C. (eds.), Raven press, New York, Vol. 21, P. 119(1990)
 78. Kubow, S. : Lipid oxidation products in food atherogenesis. *Nutr. Rev.*, 51, 33-35(1993)
 79. Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G. and Steinberg, D. : Oxidatively modified low density lipoproteins : A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 2995-2999(1987)
 80. Leikin, A.I. and Brenner, R.R. : Cholesterol-incuded microsomal changes modulate desaturase activities. *Biochem. Biophys. Acta.*, 22, 294-299(1987)
 81. Froyland, L., Asie, D.K., Vaagenes, H., Garras, A., Lie, O., Totland, G.K. and Berge, R.K. : Tetradecyl-Thioacetic acid incorporated into very low density lipoprotein: changes in the fatty acid composition and reduced plasma lipids in cholesterol-fed hamsters. *J. Lipids Res.*, 36, 2529-2536(1995)
 82. Asaf, A., Qureshi, Z.Z.Din., N. abuirmeileh., W.C. Burger., Y. ahmad and C.E. Elson : Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: impact on serum lipid. *Am. Institute of Nutr.*, 113, 1746-1755(1983)
 83. Stubbs, C.D. and Smith, A.D. : The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 179, 89-96(1984)
 84. Heller, R.A. and Gould., R.G. : Reversible cold inactivation of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 249, 5254-5261(1974)

제8장 향노화기능성 김치의 동물성 실험 및 임상연구

제 1 절 서설

향노화성 김치 무리의 개발을 위하여 연구한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험의 결과를 바탕으로 노화 억제 기능이 강조된 배추김치 및 갓김치의 효능을 살펴보고자 SAM(p-8)을 이용하여 1년 6개월간 노화의 특성에 관한 실험 및 장수에 미치는 영향을 공동으로 살펴보고 또한 각 세세부별로 향산화성, 항피부노화성 및 항동맥경화성에 관한 실험을 수행하고자하였다. 그리고 기능이 강조된 배추김치 및 갓김치의 recipe를 산업화를 대비하여 관능성을 예비실험을 통하여 검토하였고 가장 관능성 및 향산화성이 큰 recipe을 선정하여 산업화 기초 실험도 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 기능성 김치무리의 향노화성에 관한 연구

향노화성 김치 무리의 개발을 위하여 연구한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험의 결과를 바탕으로 노화 억제 기능이 강조된 배추김치 및 갓김치의 효능을 살펴보고자 SAM(p-8)을 이용하여 1년 6개월간 노화의 특성에 관한 실험 및 장수에 미치는 영향을 공동으로 살펴보고 또한 각 세세부별로 향산화성, 항피부노화성 항동맥경화성에 관한 실험을 수행하고 있다. 그리고 기능이 강조된 배추김치 및 갓김치의 recipe를 산업화를 대비하여 관능성을 예비실험을 통하여 검토한 다음 가장 관능성 및 향산화성이 큰 recipe을 선정하여 산업화 기초 실험도 수행하였다.

가. 향노화 기능이 강조된 김치 무리의 recipe 선정

1차 예비실험에서 배추김치에 각각 5%, 10%, 20%의 갓과 부추를 첨가하여 총 7종의 김치를 담금하여, 향산화성 및 관능성을 검토하였다. 김치의 향산화성은 linoleic acid를 사용하여 자동산화계를 조제한후(20% linoleic acid 2ml와 0.01M 인산완충용액4ml 및 증류수 2ml) 마쇄하여 원심분리후 여과시킨 김치액 2ml을 첨가하여 사흘간 37°C에서 incubation시켰으며 AOAC방법으로 POV를 측정하였다. 배추에 갓 20%를 첨가한 군의 향산화성 및 관능성이 가장 우수하여 1차적으로 선정한 다음 2, 3차 실험에서는 갓 첨가량을 달리하여 동일한 실험을 시행하였다. 첨가되는 갓의 함량이 많음에 따라 배추김치의 향산화성은 증가하였으나 김치의 관능성이 현저히 떨어져서 3차 예비실험을 통하여 배추김치에 30%의 갓을 첨가하기로 하고, 갓은 향산화성 물질을 많이 함유하고 있는 잎부분만 첨가하기로 결정하였다. 고춧가루, 생강 및 마늘의 함량은 증가하여 첨가시켰다. 갓김치는 염도가 3.5 이상 되는 전통의 담금법으로부터 염

도가 3.0% 이하가 되게 담금법을 조절하였으며 관능성 및 기능성이 우수하게 기타 부재료의 함량도 조절하였다. 본 실험에 사용한 김치무리의 recipe는 Table 67과 같다.

Table 67. 향노화성 김치무리의 recipe

Ingredients	(배추 1kg 기준)		
	배추김치	배추갓김치	갓김치
chinese cabbage	1000	700	-
Mustard leaf	-	300	1000
red pepper powder	25	36	80
garlic	14	33.75	25
ginger	6	1.9	7
fermented shrimph sauce	-	22.5	-
fermented sandlance sauce	-	22.5	-
glutinous rice paste	-	12.8	80
anchovy juice	20	-	110
sugar	10	-	6
radish	130	-	-
green onion	20	-	30
Shirmp sauce	-	42.5	-

나. 실험용 김치의 발효특성 및 일반성분

잘 숙성시킨 김치를 동결건조하여 동물실험용 시료로 조제하였다. 김치의 염도는 대조군 배추김치가 1.95, 기능성 배추김치가 2.75, 그리고 갓김치는 2.89%이고, pH는 대조군 배추김치 3.95, 기능성 배추김치 4.11, 갓김치 4.10, 산도는 대조군 배추김치 1.3, 기능성 배추김치 1.2, 그리고 갓김치 1.9. 이고, 동결건조한 김치의 일반성분은 Table 68과 같다.

Table 68. 김치의 일반성분(%)

	배추김치	배추갓김치	갓김치
단백질(%)	5.98	10.69	9.40
회분(%)	0.41	0.48	0.44
식이섬유(%)	27.1	28.0	35.5
당(%)	63.91	57.03	49.66
지방(%)	2.6	3.8	5

다. 실험동물 사육

실험동물은 노화촉진 모델인 3주령의 슛컷 SAM(p-8)를 대전화학연구소에서 225마리를 분양받아 처음 3주간 10마리씩 마우스용 케이지에 넣어 고형사료에 적응시켰다. 그리고 실험 시작 시 20마리를 희생시켜 장기를 적출하고, 난괴법으로 다섯 마리씩

마우스용 케이지에 넣고 각 군당 50마리씩 대조군(김치 비첨가), 배추군, 기능성 배추김치군, 갓군으로 나누었다. 김치속의 일반성분을 고려하여 에너지 수준이 동일하게 식이(AIN-76 semipurified dite)를 조성하였고 실험식이중 casein, mineral mixture, vitamine mixture, 그리고 cellose는 ICN(Biochemical, Inc. Ohio, USA)제품 그리고 choline bitartrate는 Sigma(Sigma chemical company, ST. Louis, USA)제품을 사용하고 control에 김치염도의 평균인 0.1256g NaCl을 첨가하여 염도를 보정하였다. 해당식사와 물은 자유급식법으로 하고 사육실의 실내온도는 22℃로 실온을 유지하고 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하고 있다. 실험에 사용한 식이의 조성은 Table 69와 같다.

Table 69. 노화억제 연구용 실험식이 조성(100g)

	Control(%)	배추김치군(%)	배추갓김치군(%)	갓김치군(%)
동결건조김치	-	5	5	5
casein	20	19.7	19.5	19.5
corn starch	15	11.8	12.1	12.5
corn oil	5	4.9	4.81	4.75
lard	10	10	10	10
sucrose	40	40	40	40
cellose	5	3.7	3.6	3.2
mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
vitamine mixture	1	1	1	1
choline	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3

라. 동물실험 계획

김치의 노화억제 효과를 알아보기 위하여 0, 6개월, 12개월에 마우스를 각 군당 20마리씩 희생하여 혈액 및 장기를 적출하여 노화억제 효과를 지방산화, 단백질 산화정도, 항산화계 효소 활성, 총 활성산소 측정 및 노화축적물인 lipofuscine을 측정하고, 각 세부별로 피부증진 효과에 관한 실험으로 collagen의 수용성 및 불용성 물질의 함량을 측정할 것이며, 동맥경화 억제 효과에 관한 실험으로 혈장 및 각 장기의 TG, cholesterol 함량 동맥경화 지수, 지질대사에 관계하는 효소의 활성 측정 및 동맥궁의 지질침착도를 SEM을 이용하여 확인하고자 한다. 1년 6개월간의 항노화성 김치에 의한 노화억제정도를 실험한 후, 그 이후는 수면연장효과를 살펴보기로 하였다.

1) lipofuscine 측정

안구조직의 표면에 과도한 수분과 오물을 제거한 후, 조직 0.2g에 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합용액 4ml을 첨가 후 1분간 균질화 시킨다. 여기에 동량의 증류수(4ml)을 첨가하여 다시 1분간 vortex한 후, 800×g에서 5분간 원심

분리하고 chloroform층을 분취하여, excitation 345nm, emission 435nm에서 측정하였다.

2) 총 활성산소 측정

Homogenate분획과 postmitochondria분획을 시료로 5 μ l를 취한 후, 50mM phosphate(pH7.4) buffer 200 μ l를 가해서 25 μ M DCFH-DA를 50 μ l가했을 때 생성된 형광의 변화를 excitation 485nm, emission 530nm에서 30분간 형광을 측정하였다.

3) Collagen 농도 측정

피부 외피의 털과 내피의 지방을 제거하고 아세톤으로 탈지시킨 후 chloroform : metanol(2:1 v/v)로 지방을 제거하고 증류수로 씻어낸다. 지방을 제거한 피부조직 5g을 20% NaCl을 첨가한 0.05M Tris-HCl(pH 7.5) buffer 20ml로 균질화 시킨 후, 12,000rpm 에서 15분간 원심분리를 시킨 다음 상층액을 폐기시킨다. 침전된 고형에 1.0M NaCl이 첨가된 0.05M Tris-HCl(pH 7.5)buffer 10ml로 4 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 교반 추출한 후, 12,000rpm에서 45분 동안 원심분리 시켜 상층액은 염가용성 collagen 추출물시료로 한다. 그리고 잔사를 증류수로 세정한 후 0.5M acetic acid 10ml로 4 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 다시 교반 추출한 후, 20,000rpm에서 60분 동안 원심분리 시켜 상층액을 산가용성 collagen 추출물시료로 사용하고 나머지 잔사 부분은 불용성 collagen 추출물시료로 사용하였다. 염가용성 및 산가용성 collagen을 HCl로 110 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 가수분해 시켜 용매를 감압하에서 휘발시킨 후, 1ml의 증류수를 가한 시료를 6N KOH로 중화시킨다. 이것을 증류수로 2ml이 되도록 하고 pore size 0.45 μ m의 여과기가 장착된 주사기로 여과한다. Collagen함량은 피부중의 hydroxy proline의 함량을 구해서 collagen양으로 환산하였다. 산가용성, 염가용성, 불용성 collagen 가수분해물 2ml에 0.7% chloramin T 와 15% methylcellosolve가 함유된 0.5M citrate(pH 6)buffer 1ml을 첨가하고 실온에서 20분 동안 방치한 후, 19% perchlorate 1ml을 첨가하여 잘 섞은 다음 5분 동안 반응시킨다. 여기에 methylcellosolve와 20% *p*-dimethylaminobenzaldehyde을 1:1로 혼합한 시약 1ml을 첨가하여 60 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시킨 다음 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중의 collagen함량은 hydroxy proline농도를 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식에 의해 계산하여 collagen함량을 구하였다.

2. 항노화성 김치의 혈중 지질저하 효과

가. 임상실험용 시료의 제조

1) 위약용 pill의 제조

짜서 말린 찹쌀을 볶아 미수가루로 만들어 m 제약회사에서 구입한 캡슐에 500mg씩

넣어 위약용 시료로 제조하였다. 제조한 모든 pill은 냉동고에 보관하였다.

2) 배추갓김치 pill의 제조

숙성된 배추갓김치30%를 식품동결 전문업체인 해농(경북포항)에서 -25℃에서 얼린 다음 동결건조시켜 분말화한 다음 500mg씩 캡슐에 넣어 pill을 제조하였다.

3) 배추갓김치의 수용성 pill 제조

동결 건조하여 분말화한 김치 시료에 약 20배의 증류수를 첨가하여 6시간 교반 추출하여 감압 여과한 다음 이를 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축시켜 수용성 분말을 얻어 500mg씩 캡슐에 넣어 pill을 제조하였다. 수용성획분의 수율은 약 50% 정도이었다.

4) 배추갓김치의 비수용성 pill의 제조

수용성획분 추출후 남겨진 잔사, 즉 비수용성 성분을 동결 건조시켜 분말을 얻었다. 비수용성획분 분말을 500mg씩 캡슐에 넣어 pill을 제조하였다.

나. 2차 임상 실험 대상자 선정

성인 남녀 21명을 선정하여 1차 실험과 동일하게 실험시작시 문제가 있는 2사 람은 제외시켰다. 이들을 성별 및 연령을 고려하여 위약군 6명, 김치 수용성 pill군 6명, 김치 비수용성 pill군 7명으로 나누어 하루 6알씩 6주동안 pill을 섭취 하도록 하였다. pill로 보충한 수용성, 비수용성 김치획분은 각각 60g 정도의 김치를 식이로 섭취했을 때 얻어지는 양이었다.

1) 생활습관 및 식습관 조사

임상실험 대상자의 생활습관 및 식습관은 실험 시작 첫날 혈액 채취 전에 조사하였다. 조사 내용은 가족 병력(협심증, 심근경색, 동맥경화, 심장판막, 심부전, 부정맥, 당뇨, 간질환, 심장장애)의 유무, 실험 대상자 본인 건강의 이상 유무, 혈중 지질 농도에 영향을 미칠 수 있는 약물이나 건강 보조 식품 등의 섭취 여부, 개인의 식습관, 음주량 및 흡연량 그리고 운동량에 대해 질문하였다. 특히 실험 대상자에게는 임상실험 기간동안 평소의 식습관과 생활 습관을 유지할 것을 사전 교육과 전화를 통해 확인 관리하였다.

2) 신체계측

임상실험 시작전(0주)와 김치 pill 섭취후(6주)에 혈액을 채취하기 전에 P대학 운동영양학실에서 신체 조성 분석기(In Body 2.0, DaniL SMC, Korea)를 이용하여 신장,

체중, 체지방율, BMI, 비만도 등을 측정하였고, 자동 혈압기(T.K.K, Japan)를 이용하여 혈압을 측정하였다.

3) 식이섭취 조사

식이 섭취 조사는 임상 실험 기간 0과 6주에 해당되는 주의 목, 금, 토요일 3일간의 식사 내용을 24시간 식이 섭취 기록법으로 작성하게 하였다. 실험 대상자들이 직접 아침 점심 저녁 그리고 간식으로 섭취한 식품을 식이섭취기록표에 음식명, 재료명과 식품의 목측량 등을 기록하도록 하였다. 김치 보충제의 지질저하 효과를 살펴보기 위하여 식사에 의한 영향을 최소한 줄여 정확성을 기하고자 피험자의 식사 섭취량이 실험기간 6주동안 일정하게 유지되도록 실험전에 교육을 시켰으며, 임상실험 기간동안 매일의 김치 섭취량을 정확하게 기록해줄 것을 당부하였다. 실험 대상자들이 식이 기록을 정확히 할 수 있도록 식이섭취 기록표와 음식 모형물(food model)을 가지고 임상 영양사가 개별적으로 식이기록 작성 교육 및 상담을 하였다. 개인별 식이섭취 기록표를 한국영양학회부설 영양정보 센터에서 만든 CAN Pro 프로그램을 이용하여 일별 식사 입력 상황과 기간별 식사 입력 상황을 분석하여 대조군과 실험군간의 각 영양소별 섭취 상태와 6주 동안의 김치섭취량을 살펴보았다.

4) 혈액검사

실험이 시작되는 날 12시간동안 금식을 한 공복상태에서 I대학 부속병원 임상병리사가 채혈을 하였다. 혈액은 지질 분석용과 피브리린 분해능 실험용으로 나누어 채혈하였으며, 채혈 즉시 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 혈액 자동 분석기(Olympus AU 5200 Analyzer, Japan)를 사용하여 triglyceride(TG), total-cholesterol (T-C), HDL-cholesterol(HDL-C) 등의 혈중지질 농도와 혈액성상 등에 대해서 분석하였다. LDL-cholesterol (LDL-C)은 Friedwald식인 $[LDL-C = T-C - (HDL-C + TG/5)]$ 을 이용하여 계산하였고, atherogenic index(AI)는 $AI = [(T-C - HDL-C) / HDL-C]$ 식에 의하여 산출하였다.

5) 혈전용해능 분석

김치 pill의 보충섭취가 혈전 용해능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 김 등이 이용한 fibrin 평판법을 수정한 fibrin 배양법으로 혈전용해능을 측정하였다. 즉 fibrinogen과 thrombin을 잘 혼합하여 fibrin을 만들고 여기에 20-40 μ l의 혈장을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 형성된 fibrin 용해시 생성된 물의 양을 측정하였다. 대상자 혈액중의 혈전 용매활성은 표준 plasmin으로 만든 표준곡선에 대입하여 그 활성을 비교하였다.

6) 소비자 기호도 조사

배추갓김치(항동맥경화 김치)의 소비자 기호도 조사를 실시하여 일반 김치로서의 적응성을 검토하였다. 즉 김치를 담근 후 pH가 4.3 정도에 도달하였을 때 20대에서 60대 사이의 성인 240명을 대상으로 기호도 조사를 실시하였다

3. 항노화지표의 분석

동물실험은 제 7장의 방법에 준해서 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. SAM에 있어서 항노화 AI 형 김치의 지질저하 및 피부노화 억제효과

제 5장에서 실험결과 선정한 recipe 에 의해 갓김치를 담그어 이의 지질 저하 효과 및 피부노화억제효과를 조사하였다.

가. 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율

1년 동안 사육한 SAM의 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율을 Table 70에 나타내었다. 사육 초기의 각 군의 SAM의 평균 체중은 25-30g 정도였고, 6개월 사육후에는 대조군이 41.28 ± 8.00 , 갓김치군이 $39.07 \pm 6.95g$ 으로 증가하였고, 12개월 후에는 대조군 42.14 ± 7.00 , 갓김치군 $41.44 \pm 7.78g$ 으로 군간의 유의적인 차이가 없었다. 나이가 들어감에 따라 식이 섭취량, 체중증가량은 모두 감소하였고, 김치섭취에 의해서도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 본 실험에서 김치섭취로 인한 식이섭취량의 차이는 없었다.

Table 70 Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of SAM fed *kimchi* diets for 12 months

Age	Group	Body weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	Food efficiency ratio ²⁾ (%)
6mo	C	0.64 ± 2.98	28.27 ± 4.97	2.33 ± 0.40^{ab}
	MK	0.49 ± 2.83	31.14 ± 4.81	1.61 ± 0.26^c
12mo	C	-0.19 ± 3.40	21.47 ± 6.98	-0.98 ± 0.31^c
	MK	-0.23 ± 3.28	21.75 ± 6.59	-1.15 ± 0.34^d

(C : 대조군 , MK: 갓김치군)

나. 혈장의 지질농도

혈장 중의 지질의 농도를 분석하였다(Table 71). 혈중 TG 수준은 12개월에서 갓침

가김치, 갓김치를 섭취한 군이 유의적으로 낮았으며, control군에서는 연령이 증가함에 따라 TG수준이 증가하는 경향으로 나타났으나, 특히 갓김치섭취군에서는 가령에 따라 유의적으로 감소하였다. TCH수준은 control군은 그 증가폭이 커서 0개월과 6개월 사이, 그리고 6개월과 12개월 사이 유의적으로 수치가 증가하였다. 그러나 김치를 섭취시킨군은 0개월과 6개월 사이 TCH이 유의적으로 증가했으나 6개월과 12개월 사이에는 TCH가 유의적으로 증가하지 않았으며, control에 비해 증가폭이 적었다.

Table 71 Lipids concentrations of serum of SAM fed *kimchi* diet for 12 months

		Lipid(mg/g)				
		Cholesterol	Triglyceride	LDL-C	HDL(mg/dl)	AI
0mo		50.37±6.26 ^a	101.24±7.03 ^a	0.07±0.02 ^a	39.73±1.12 ^A	0.57±0.02 ^A
	C ¹⁾	134.43±5.2 ^b	130.60±24.35 ^a	25.25±9.51 ^b	83.06±7.77 ^B	0.58±0.16 ^A
6mo	MK	113.75±10.51 ^b	88.04±13.30 ^{ab}	21.15±5.48 ^b	82.13±3.40 ^B	0.39±0.12 ^A
	C	181.6±22.71 ^c	128.8±2.26 ^{ab}	28.99±12.34 ^b	126.86±24.65 ^C	0.46±0.17 ^A
12mo	MK	122.4±5.32 ^b	67.20±3.20 ^{ab}	19.41±7.76 ^b	89.57±1.80 ^C	0.37±0.09 ^A

LDL-cholesterol은 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 증가하였다. 그러나, control군에서는 그 수치가 가령에 따라 지속적으로 증가하는 양상을 보였으나, 김치 섭취군은 증가하였다가 수치가 다소 감소하는 양상을 보였다. HDL-cholesterol은 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 증가하였다.

다. 장기의 콜레스테롤 농도

Table 72. Cholesterol concentrations of tissue of SAM fed *kimchi* diet for 12 months

		Cholesterol (mg/ g)				
		간	폐	신장	비장	뇌
0mo		4.05±0.85 ^a	11.58±5.80 ^{ab}	11.58±2.16 ^a	11.58±1.93	8.20±0.48 ^{ab}
	C ¹⁾	10.76±2.33 ^{ab}	18.33±2.89 ^a	8.20±0.48 ^a	16.40±2.89	28.46±0.48 ^{ca}
6mo	MK	8.07±0.75 ^{ab}	3.38±0.48 ^a	6.75±1.93 ^a	15.92±1.45	29.42±0.42 ^{ca}
	C	14.32±1.97 ^{ab}	21.54±4.34 ^a	6.27±0.48 ^a	10.61±0.96	70.90±0.48 ^{ab}
12mo	MK	13.15±0.65 ^{bab}	11.09±2.41 ^a	7.72±1.93 ^a	8.20±0.48	26.53±0.48 ^{cd}

조직에서의 콜레스테롤 농도를 Table 72에 나타내었다. 폐의 TCH는 갓김치군과 갓첨가김치 섭취군은 감소했다가 증가하는 경향이였다.

신장의 TCH는 control군과 갓김치군은 가령에 따른 유의차는 보이지 않았으며, 비장의 TCH는 가령 및 군간 유의차는 없었다. 뇌의 TCH는 control군, 갓김치군에서는 가령에 따라 유의적으로 증가되었으나, 간의 TCH는 가령에 따라 증가했으며, 6개월

경 갓김치의 TCH가 다른 군에 비해 유의적으로 가장 낮았다.

라. 장기의 중성지방 농도

Table 73. Triglyceride concentrations of tissue of SAM fed kimchi¹⁾ diet for 12 months

	Triglyceride (mg/g)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	39.53±6.00 ^a	25.38±3.76	18.09±1.85 ^a	12.63±2.38 ^a	5.65±0.38 ^a	21.67±0.19 ^a
C ¹⁾	82.91±3.20 ^{ab}	17.34±0.75	11.31±2.32 ^b	15.08±2.68 ^b	16.96±7.16 ^b	25.50±15.33 ^b
6mo MK	68.22±3.26 ^b	10.55±3.02	6.41±0.38 ^b	16.02±1.45 ^b	9.05±5.28 ^b	19.60±19.98 ^b
C	98.94±20.90 ^{ab}	29.70±3.11	12.81±0.75 ^{ab}	16.96±0.38 ^{ab}	18.09±15.83 ^a	29.10±14.44 ^a
12mo MK	84.60±10.56 ^b	15.45±4.93	9.80±2.68 ^b	11.31±1.51 ^{ab}	6.41±4.90 ^b	26.83±16.35 ^b

조직의 중성지방 농도는 Table 73과 같다. 폐의 TG 수준은 가령에 따른 차이 및 군간 유의차는 없었다. 그러나 control군에 비해 김치섭취군의 수치가 다소 감소하는 경향으로 나타났다. 심장의 TG수준은 가령에 따라 감소하였으며 군간 유의차는 없었으나 control군에 비해 김치섭취군의 수치가 다소 감소하였으며, 폐의 경우처럼 갓침가 김치군의 수치 및 갓침가김치의 수치가 낮은 경향이었다. 신장의 TG 수준은 가령에 따른 차이는 없었으나, 12개월령의 갓침가김치 섭취군의 TG 수준이 다른 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 비록 유의차는 나타나지 않았으나 갓김치, control군에 비해 감소하는 경향이었다. 비장의 TG수준은 가령에 따른 차이 및 군간 유의차는 없었으나 control군은 지속적으로 증가하는 경향이 있는 반면 김치섭취군은 6개월까지는 증가하다가 12개월령에 감소하는 경향으로 나타났다. 뇌의 TG는 가령에 따른 차이 및 군간의 차이는 없었으나, 가령에 따라 수치가 증가하는 양상을 보였다. 간의 TG는 갓침가김치 섭취군을 제외하고는 가령에 따라 유의적으로 증가하였다. 그러나 갓침가김치의 경우는 비록 수치상의 증가는 있었으나 유의적인 증가를 보이지는 않았다.

마. 장기의 과산화물 함량

Table 74. Level of tissue lipid oxidation of SAM fed kimchi diet

	TBARS(nmole MDA/g tissue)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	239.60±28.1 ^{ab}	145.17±9.20 ^a	148.13±82.71 ^a	74.04±29.84 ^{ab}	74.30±17.19 ^a	183.72±27.15 ^a
C ¹⁾	275.37±17.48 ^{ab}	78.14±5.3 ^{ab}	196.83±11.62 ^{ab}	93.17±16.56 ^{ab}	93.25±26.81 ^a	226.44±48.03 ^{ab}
6mo MK	156.94±22.43 ^{ab}	27.63±7.7 ^{bc}	167.91±0.99 ^{ab}	63.46±15.29 ^{ab}	52.02±0.88 ^b	129.39±72.98 ^{ab}
C	283.60±10.44 ^{ab}	124.54±2.03 ^{ab}	46.40±3.67 ^a	56.85±5.35 ^{ab}	70.38±16.82 ^a	184.04±8.46 ^a
12mo MK	280.23±0.81 ^{ab}	73.38±32.39 ^{ab}	48.38±0.22 ^a	53.52±14.16 ^{ab}	58.48±9.35 ^b	163.55±7.07 ^a

조직의 TBARS함량을 나타내었다(Table 74). 폐의 TBARS는 모든 군에서 0개월 대비 6개월과 12개월 모두 유의적으로 감소하였다. 또한 6개월에는 control군에 비해 김치를 섭취시킨 모든군에서 유의적으로 감소하였으며, 특히 갓김치의 수준은 다른 김치군의 수준보다도 낮았다. 12개월에는 갓김치군이 control군에 비해 유의적으로 수준이 낮았으며, 비록 유의차는 나지 않았다. 심장의 경우는 6개월의 경우 갓김치군이 control 군에 비해 유의적으로 낮았으며, 신장의 경우 6개월에는 갓김치군에서, 낮게 나타났다. 뇌의 경우는 6개월에 control 군에 비해 갓김치군의 TBARS 수준이 유의적으로 낮았으며, 간의 경우 0개월 대비 6개월에서 control군의 TBARS는 유의적으로 증가하였으나 갓김치군은 유의적으로 감소하였으며, 군간비교시 control 군에 비해 갓김치섭취시킨 군의 수준이 유의적으로 낮게 나타났다.

바. 항산화효소계 측정

1) Catalase활성

Table 75 Catalase activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	Catalase(mu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	110.00±100 ^a	32.58±9.07 ^{ab}	224.57±42.83 ^a	224.57±42.83 ^a	16.67±4.76 ^a	33.60±6.01 ^a
C ¹⁾	30.34±9.47 ^b	27.92±3.06 ^{abc}	35.86±5.77 ^b	35.86±5.77 ^b	38.43±10.17 ^b	33.10±15.2 ^b
6mo MK	46.86±9.44 ^a	68.69±15.25 ^{ab}	43.83±43.83 ^b	43.83±43.83 ^b	57.42±24.49 ^b	62.80±44.30 ^b
C	42.13±15.88 ^b	4.52±0.90 ^a	16.27±3.62 ^a	24.92±12.50 ^b	50.37±9.53 ^b	18.68±6.98 ^b
12mo MK	54.62±15.52 ^a	13.38±1.93 ^{abc}	19.28±4.06 ^a	32.43±12.69 ^b	55.44±10.05 ^b	31.82±10.20 ^b

비장의 catalase는 control은 가령에 따라 유의적으로 증가했으나, 김치를 섭취시킨 군은 가령에 따른 유의차가 없었으며, 6개월,12개월에서 군간 유의차도 없었다(Table 75). 그러나 김치를 섭취시킨 군의 수치가 control의 수치보다 높은 경향이였다. 신장의 경우 모든군에서 가령에 따라 유의적으로 감소하였으며, 군간 유의차는 없었다, 그러나 control의 수치보다 김치를 섭취시킨군에서 높은 경향을 보였다. 심장의 경우 가령에 따라 catalase 수준이 저하되는 것으로 나타났으며 특히 배추군의 경우 유의적인 감소를 나타내었다. 갓김치군은 6개월령에 0개월에 비해 catalase 가 유의적으로 상승하였다. 뇌는 가령에 따른 차이나 군간의 차이가 유의적이지 않았으나 control군에 비해 김치를 섭취시킨군들의 수치가 다소 높은 경향이였다. 간의 catalase는 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 감소하였으나, 군간 유의차는 없었으며, 역시 김치를 섭취한 군들의 수치가 다소 높은 경향이였다. 이상으로 보아

catalase수치는 장기마다 다른 특색을 보이지만 대체적으로 가령에 따라 저하되며, control군에 비해서 김치를 섭취시킨 군에서 높게 나타나는 경향을 보였다.

2) Glutathione peroxidase활성

GSH-px는 심장의 경우 갓김치군의 수준이 유의적으로 증가했다(Table 76.). 또한 0개월 대비 12개월에서는 control군은 유의적으로 수준이 감소되었으나 갓김치군은 유의적인 변화를 보이지 않았다. 비장은 모든군에서 가령에 따라 수준이 지속적으로 감소됨을 보였고, 뇌의 경우 비록 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 control군은 0개월 대비 수치가 감소되었는데 갓김치군은 0개월 대비 6개월, 12개월 수준이 다소 증가하는 양상이었다. 간장의 경우 모든군에서 가령에 따라 유의적으로 그 수준이 감소되었으며, 군간 유의차는 없었다.

Table 76 GSH-px activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	GSH-px(U/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	31.00±10.00 ^a	52.80±28.33 ^b	81.00±3.59 ^c	44.5±27.18 ^{bc}	476.00±252.93 ^a	18.80±1.01 ^a
C ¹⁾	26.74±13.80 ^a	21.98±8.61 ^{ba}	173.52±31.42 ^{ba}	37.65±15.88 ^{bc}	291.83±37.90 ^b	12.22±6.46 ^a
6mo MK	19.53±8.83 ^{cd}	17.13±8.36 ^{ba}	337.24±62.08 ^{ba}	66.62±43.75 ^{bc}	179.21±3.21 ^a	27.72±13.43 ^b
C	4.91±2.56 ^b	27.53±5.18 ^{cd}	16.11±2.61 ^{ca}	16.03±4.26 ^{cd}	26.05±0.00 ^a	12.70±30.06 ^a
12mo MK	7.68±7.60 ^c	24.48±4.86 ^{bd}	11.51±2.19 ^{cd}	15.81±4.03 ^{cd}	55.09±10.16 ^a	26.68±11.13 ^b

3) Cu, Zn-SOD활성

비장의 Cu, Zn-SOD는 control군에서는 6개월에 유의적으로 감소하였다(Table 77).

Table 77. Cu, Zn-SOD activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	Cu, Zn-SOD(Nu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	152.85±26.62 ^a	88.80±6.40 ^a	68.20±4.65 ^a	63.13±5.17 ^{bc}	68.89±1.70 ^b	45.15±6.90 ^a
C ¹⁾	148.77±30.09 ^{ac}	64.41±1.90 ^{ba}	44.64±0.53 ^{ba}	51.30±1.48 ^c	50.45±0.93 ^{bc}	26.45±0.42 ^{Ba}
6mo MK	259.47±16.55 ^{ba}	63.75±6.27 ^{ba}	49.48±0.95 ^{bc}	51.43±5.66 ^a	75.89±0.80 ^{bc}	30.30±1.98 ^{bd}
C	165.80±27.44 ^a	71.73±6.24 ^{ba}	66.03±6.64 ^{ba}	56.51±5.58 ^{ab}	67.24±0.77 ^{ba}	32.44±2.76 ^b
12mo MK	176.04±23.05 ^a	68.52±3.08 ^{ba}	55.27±1.23 ^{bc}	75.62±14.03 ^{bc}	75.01±1.07 ^{bd}	40.52±6.24 ^a

그러나 같은시기 배추김치군과 갓배추김치군은 유의적 변화가 없었으며 갓김치군은 유의적으로 상승하였고, control군에 비해 갓김치군이 유의적으로 높았다. 특히 갓김치군에서 높았다. 12개월에도 갓김치군이 control에 비해 유의적으로 높은 수준을

보였다. 신장의 경우 control 군은 가령에 따라 유의적으로 감소하였으나, 갓김치군은 0개월대비 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 12개월에서는 갓김치군이 control군에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타냈다. 폐의 경우 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 감소했으며, 뇌에서 12개월경우 0개월에 비해 control군 유의적으로 감소했으나, 갓김치군은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 6개월에서는 갓김치군의 수준이 control 군에 비해 유의적으로 높은것으로 나타났다. 간의 경우 갓김치군을 제외한 모든군이 가령에 따른 변화를 보이지 않았다. 그러나 갓김치군은 0개월대 비 6개월에서 control군은 유의적으로 높은 수준을 나타내었다.

4) Mn-SOD활성

Table 78. Mn-SOD activities of tissues of SAM fed *kimchi* diet.

	Mn-SOD(Nu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	20.94±2.75 ^a	20.09±1.03 ^a	14.82±0.20 ^a	14.51±0.85 ^a	14.74±0.40 ^a	19.68±0.63 ^a
C ¹⁾	26.09±5.12 ^a	14.66±1.75 ^{ab}	10.96±0.25 ^{ab}	10.32±0.50 ^b	9.05±0.09 ^{ab}	10.85±0.29 ^{ab}
6mo MK	31.12±5.02 ^b	13.04±1.67 ^{ab}	10.68±0.14 ^{bc}	12.54±5.05 ^a	14.55±0.20 ^{bc}	11.88±0.49 ^{bc}
C	30.72±5.57 ^b	19.74±0.30 ^a	13.53±0.09 ^{bc}	11.72±1.22 ^a	14.28±0.46 ^a	12.03±0.73 ^{ab}
12mo MK	40.13±4.96 ^c	14.79±0.17 ^b	11.30±0.48 ^{bc}	13.71±0.93 ^{bc}	16.35±1.73 ^a	13.43±1.86 ^{bc}

폐의 Mn-SOD는 가령에 따라 각기 다른 양상을 나타내었다(Table 78). 신장에서는 12개월에서 갓김치군이 다른 군들에 비해 유의적으로 증가하였다. 비장의 경우 6개월에 control군에 비해 갓김치군의 수준이 유의적으로 높았으며, 특히 갓김치군이 수준은 유의적으로 높았다. 그러나 12개월에는 군간 유의차는 보이지 않았다. 뇌의 경우 모든군에서 가령에 따라 유의적으로 감소되었으며, control에 비해 6개월에서는 갓김치군의 수준이, 12개월에서는 갓김치의 수준이 유의적으로 증가하였다. 간에서는 갓김치군은 유의적으로 증가하는 양상을 보였다.

사. 피부의 노화에 미치는 영향

1) 피부의 지질농도

김치를 섭취한 SAM의 피부에서 지질농도는 가령에 따라 증가하였는데, 콜레스테롤 농도는 0개월에 비해 12개월에서 700%, 중성지방의 농도는 500%, 인지질의 농도는 100% 정도 증가하였으며 총지질의 농도는 400% 증가하였다. 총지질과 중성지방은 400%로 같은 비율로 증가하였고, 가령에 따라 피부 속의 지질 중에 콜레스테롤의 농도 증가가 가장 높았다(Table 80). 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 콜레스테롤 농도는 12개월에서 대조군 16.67, 갓김치군 14.98 mg/g 으로 대조군에 비해 갓김치군에

서 10% 유의적으로 낮아졌다($p<0.05$). 중성지방 농도는 12개월에서 대조군은 246.53, 갓김치군에서 184.09 mg/g 으로 대조군에 비해 갓김치군에서 유의적으로 가장 낮았다($p<0.05$). 인지질 농도는 12개월에 대조군이 24.98, 갓김치군이 18.98 mg/g으로 대조군에 비해 24%로 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 총지방 함량은 12개월에서 대조군 358.00, 갓김치군에서 320.88 mg/g으로 대조군에 비해 갓김치군 10%로 유의적으로 낮았다($p<0.05$).

Table 79. Lipids concentrations of skin of SAM fed *kimchi* diet for 12 months

		Lipid(mg/g)			
		Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid	Total Lipid
0mo		1.99±0.38	39.29±2.33	11.29±2.28	73.75±6.98
	C	3.87±0.67	94.54±2.41	9.51±3.08 ^a	183.75±53.48
6mo	MK	3.66±0.80	89.99±16.61	4.08±1.07 ^b	138.30±18.93
	C	16.67±2.20 ^a	246.53±17.70 ^a	24.98±3.99 ^a	358.00±23.11 ^a
12mo	MK	14.98±1.18 ^b	184.09±33.53 ^c	18.98±4.19 ^b	320.88±55.25 ^{ab}

2) 지질 산화 억제에 미치는 영향

가) 지질 산화정도

Table 80. Level of skin lipid oxidation of SAM fed *kimchi* diet

		POV(μ mole MDA/g skin)	TBARS(nmole MDA/g tissue)
0mo		26.24±4.87	4.85±0.49
	C ¹⁾	47.65±14.09 ^{NS}	5.31±0.84 ^{NS}
6mo	MK	36.91±9.42	4.63±1.56
	C	50.92±14.40 ^{NS}	6.97±1.19 ^a
12mo	MK	52.60±1.40	5.45±0.27 ^b

가령에 따른 피부의 지질 산화정도를 살펴보았을 때 모든 실험군에서 산화 생성물의 축적이 증가함을 알 수 있었다(Table 80). 생육초기에 비해 6개월 후에 POV 농도

는 약 80%, 12개월 후에는 94% 증가하여 6개월까지의 증가비율이 높았다. 김치 섭취가 피부에서 초기 산화 생성물인 POV 농도에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월에서 갓김치군에서 낮았지만 유의적이지 않았다. TBARS 농도는 가령에 따라 증가하였으며 12개월에서 대조군 6.97, 갓김치군 5.45nmol MDA/g tissue으로 대조군에 비해 모든 김치첨가군이 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

나) LDL 산화억제 효과

김치식이에 의한 피부 지질 산화정도를 살펴보았을 때 김치섭취군에서 지질 산화생성물의 축적이 낮음을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 사람의 LDL을 copper로 산화시킨 후, LDL 산화 정도를 살펴봄으로써 김치 식이에 의해 피부의 지질 산화가 얼마나 억제되었는지를 확인하고자 하였다. 더불어 김치 식이에 의한 항산화 물질의 축적 정도에 대하여도 간접적으로 살펴보고자 하였다. 이러한 피부 균질액을 피부 균질액의 LDL 산화억제 효과는 Table 81에 나타내었다. 노화함에 따라 조금씩 증가하는 경향이 있었으며 6개월에서는 유의적인 차이는 없었지만, 12개월에서는 대조군 5.25, 갓김치군 5.12 nmol/g tissue로 LDL 산화 억제능이 대조군에 비해 각각 2%로 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

Table 81. Inhibition of LDL initiated by Cu^{++} in the presence of skin homogenate of SAM fed *kimchi* diet.

Age	Group ¹⁾	LDL oxidation		% inhibition
		nmole /g tissue	%Change ²⁾	
0mo		3.03±0.08	0	
6mo	C	3.58±0.26 ^{NS}	15	0
	MK	3.00±0.49	-1	0.16
12mo	C	5.25±0.45 ^a	42	0
	MK	5.12±0.48 ^a	41	2.41

3) 항산화 효소계에 미치는 영향

가) Catalase

피부의 catalase 활성은 6개월에서 증가했으나 12개월에서는 그 활성이 감소하는 현상을 보였다. 김치식이가 catalase활성에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월의 대조군에서는 4.49, 갓김치군에서 4.06 mU/mg protein으로 김치첨가군에서 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). 12개월에서는 대조군 2.10, 갓김치군 1.98mU/mg protein으로 낮은 결과를 보였다. ($P < 0.05$) 본 실험에서 catalase의 활성은 나이가 들어감에 따라 유리기 생성의 증가로 인해 감소한 것으로 보여지며 김치 섭취군에서 유의적으로 유리기 생성이 낮아 효소의 활성도 낮은 것으로 사료된다.

나) Glutathione peroxidase(GSH-px) 활성

GSH-px 활성은 연령이 증가함에 따라 6개월까지는 효소활성이 증가하였으며 12개월까지 유사한 활성이 지속되었다. 김치섭취가 GSH-px 활성에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월에서는 대조군이 0.066, 갓김치군이 0.061unit/mg protein으로 유의적으로 낮았으며(p<0.05), 12개월에서는 대조군이 0.075, 갓김치군이 0.036unit/mg protein으로 갓김치군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며(p<0.05) GSH-px활성은 가령에 따라 활성이 감소한다는 보고가 있고, 변화를 보이지 않는다는 보고도 있다. 김치섭취로 인한 변화를 살펴보면 대조군에 비해 갓김치군의 활성이 유의적으로 낮았다. GSH-px의 활성은 앞에서 언급한 피부에서의 지질의 농도와 지질 산화생성물의 농도와 일치하는 결과였는데, 이는 김치섭취군에서 지질과 지질 산화물의 생성이 낮아 효소의 활성도 낮은 것으로 사료된다.

다) Cu, Zn-SOD활성

사육 후 김치 섭취에 따른 Cu, Zn-SOD 활성을 비교해 보았을 때, 가령에 따라 거의 변화가 없었다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 6개월에서 대조군 21.74, 갓김치군 23.89 Nu/mg protein로 각 군간의 유의성은 없었으며, 12개월에서도 대조군 24.25, 갓김치군 23.18 Nu/mg protein로 각 군간의 유의성이 없었다.

라) Mn-SOD 활성

Mn-SOD 활성도 가령에 의한 변화는 보이지 않았고, 6개월에서는 대조군 2.88, 갓김치군 2.60 Nu/mg protein으로 각 군들간의 차이가 없었으며 12개월에서도 대조군 2.96, 갓김치군 2.55 Nu/mg protein로 유의적이진 않았다.

아. Collagen 농도의 변화

Table 82. Collagen contents of skin of SAM fed *kimchi* diet

Age	Group ¹⁾	Salt soluble collagen (mg/g skin)	Acid soluble collagen (mg/g skin)	Non soluble collagen (mg/g skin)	Total collagen (mg/g skin)
0mo		0.07±0.01	0.23±0.00	0.05±0.00	0.21±0.18
6mo	C	0.11±0.15 ^{NS}	0.63±0.00 ^a	0.13±0.05 ^{NS}	0.88±0.20 ^a
	MK	0.10±0.04	0.32±0.00 ^P	0.13±0.02	0.56±0.06 ^D
12mo	C	0.16±0.04 ^D	0.71±0.05 ^a	0.27±0.12 ^a	1.11±0.04 ^a
	MK	0.14±0.09 ^b	0.54±0.13 ^{ab}	0.20±0.09 ^{ab}	0.88±0.31 ^{ab}

본 실험에서 가령에 따른 collagen의 함량은 증가하였고 김치섭취에 의한 collagen 함량을 살펴보면 김치섭취군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 열가용성 collagen의 경우 12개월에서 대조군 0.16, 갓김치군 0.14mg/g으로 나타났다($p < 0.05$). 산가용성 collagen의 경우, 6개월에서는 대조군이 0.63, 갓김치군 0.32mg/g으로 김치 첨가군은 대조군에 비해 유의적으로 모두 낮았으며($p < 0.05$) 갓김치군은 비슷한 수준이었는데, 대조군에 비해 갓김치군 49% 낮았다. 12개월에서는 대조군 0.71, 갓김치군 0.54mg/g로 유의적으로 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$). 불용성 collagen함량은 가령에 따라 증가하였고 12개월에서는 대조군 0.27, 갓김치군 0.20mg/g으로 낮았으며 대조군에 비해 14.8% 낮았다. 총 collagen의 함량은 6개월에서는 대조군 0.88, 갓김치군 0.56mg/g으로 대조군에 비해 김치첨가군에서 유의적으로 낮았고 12개월에서도 대조군이 1.11, 갓김치군 0.88mg/g로 대조군에 비해 21% 낮았다.

자. 총활성산소 농도의 변화

가) Homogenate 분획

Homogenate 분획에서는 가령에 따라 증가하였고 특히 12개월이 되면서 그 생성량은 현저히 증가하였는데 이는 노화가 촉진되는 현상의 결과인 것으로 사료된다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 대조군 0.31, 갓김치군 0.31 fluorescence/min/mg protein, 12월에서는 대조군 1.45, 갓김치군 0.94 fluorescence/min/mg protein 로서 12개월에서 갓김치군이 대조군에 비해 각각 35% 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$).

나) Postmitochondria 분획

일반적으로 free radical의 농도가 많이 생성되는 것으로 알려진 postmitochondria 분획에서 총 free radical의 농도를 측정하였다. 나이가 들어감에 따라 증가하는 경향을 보였으며, homogenate 분획에서와 같이 12개월에 많은 증가가 있었다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 12개월에서는 대조군 0.74, 갓김치군 0.69 fluorescence/min/mg protein 으로 본 실험에서는 차이가 없었다. 본 실험에서 김치를 섭취한 피부에서 활성산소종의 각 군별 생성패턴은 피부중의 TBARS 생성패턴과 LDL 산화억제 효과와 거의 유사함을 알 수 있었다. 김치 중에는 이러한 활성산소를 소거하는 항산화 물질들이 많이 함유되어 노화를 억제할 것으로 추측된다.

차. 고환의 노화억제에 미치는 영향

(1) 지질 산화억제에 미치는 영향

Table 83. Inhibition of LDL initiated by Cu^{++} in the presence of testis homogenate of SAM fed kimchi¹¹ diet.

Age	Group ¹⁾	LDL oxidation		% inhibition
		nmole/g tissue	%Change	
0mo		3.09±1.27	0	
6mo	C	4.05±1.37	24	0
	MK	3.67±1.99	16	9.50
12mo	C	5.44±1.05 ^a	43	0
	MK	4.70±1.43 ^{ab}	34	13.46

고환에 있어 LDL 산화억제 효과를 나타내었다. 김치를 섭취시킨 SAM의 고환에 있어 TBARS농도는 나이가 들어감에 따라 증가하였으며 12개월에 김치섭취군에서 유의성 있는 감소를 보였다(p<0.05). 12개월에서 대조군 5.44, 갓김치군 4.70 nmole/g tissue 로 대조군에 비해 갓김치군에서 유의적으로 14% 로 지질 산화를 억제 시켰다 (p<0.05).

(2) 총활성산소 생성의 변화

(가) Homogenate 분획

총활성산소의 생성은 피부에서처럼 homogenate분획과 postmitochondria 분획에서 측정하였는데 모두 가령에 따라 증가하였으며, 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 homogenate분획의 6개월에서는 대조군 2.13, 갓김치군 1.03 fluorescence/min/mg protein으로 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 12개월에서는 대조군 5.12, 갓김치군 2.86 fluorescence/min/mg protein 으로 대조군에 비해 갓김치군 44%로 유의적으로 낮아졌다.

(나) Postmitochondria 분획

Postmitochondria 분획에서 12개월에서는 대조군 4.23, 갓김치군 3.62로 유의성 있는 감소를 보였는데, 대조군에 비해 갓김치군 14%로 낮아졌다(p<0.05). 본 실험에 의하면 노화에 의해 지질 과산화물과 총활성산소의 생성은 증가하였지만 김치 첨가식을 섭취한 군에 있어서는 대조군에 비해 낮았다.

(3) Glutathione의 함량 변화

생체내 항산화제로 존재하는 glutathione(GSH)의 농도를 고환조직에서 측정하였다 (Table 84). GSH와 GSH/GSSG는 나이가 들어감에 따라 감소하였으며 김치섭취에 의한 GSH의 함량변화를 살펴보면 6개월의 대조군은 49.57, 갓김치군 70.04 μ M/mg protein 으로 갓김치군에서 유의적으로 높았다(p<0.05). 대조군에 비해 갓김치군은 29%로 특히 갓김치군에서 높은 값을 보였다. 12개월에서는 대조군 50.65, 갓김치군 59.17 μ

M/mg protein으로 갓김치군에서 높은 함량을 나타냈다.

Table 84 . Effect of kimchi diet GSH/GSSG level in testis of SAM

Age	Group	GSH		GSSG		GSH/GSSH	
		$\mu\text{M}/\text{mg protein}$	%Change	$\mu\text{M}/\text{mg protein}$	%Change		%Change
0mo		90.21 \pm 1.96	100	188.11 \pm 11.77	0	0.506 \pm 0.140	100
6mo	C ¹⁾	49.57 \pm 0.77 ^c	55	176.79 \pm 4.42 ^{NS}	-6	0.258 \pm 0.046 ^b	51
	MK	70.04 \pm 2.16 ^a	78	181.37 \pm 8.52	-4	0.394 \pm 0.090 ^a	79
12mo	C	50.65 \pm 0.60 ^b	56	307.74 \pm 7.93 ^a	39	0.167 \pm 0.009 ^b	33
	MK	59.17 \pm 3.06 ^a	66	314.71 \pm 15.34 ^a	40	0.188 \pm 0.010 ^a	37

GSH/GSSG는 노화함에 따라 비례적으로 감소하였는데, 6개월에서는 대조군 0.258, 갓김치군 0.392로 대조군에 비해 갓김치군에서 35% 높았으며 특히 갓김치군에서 높은 값을 보였다(p<0.05). 12개월에서는 대조군 0.167, 갓김치군 0.188로 갓김치군이 유의적으로 높았으며, 대조군에 비해 갓김치 11% 높았다(p<0.05). 따라서 김치섭취로 인해 이러한 활성산소의 유해작용을 억제하여 고환조직의 생식유지에 기여할 뿐 아니라 고환조직의 노화를 억제할 것으로 사료된다.

카. 안구에서의 lipofuscin농도 변화

안구에서 나이에 따른 lipofuscin의 함량 변화를 보면 연령에 따라 증가하였고 김치 섭취에 따른 lipofuscin 함량 변화는 6개월에서 김치첨가군 모두 유의적으로 감소하였다. lipofuscin은 생체막 지질에 생긴 활성산소 반응의 결과, 변성한 단백질을 함유한 세포사(cell death)를 유도한다. 노화로 인해 안구를 비롯한 대부분의 장기에서 생성되는 lipofuscin은 김치섭취군이 대조군보다 감소했으므로 김치는 노화를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다(Table 85).

Table 85. Effect of kimchi¹⁾ diet on lipofuscin concentration at eyes of SAM.

Age	Group	Lipofuscin	
		Fluorescence	%Change
0mo		18.41 \pm 1.20	
6mo	C	25.33 \pm 2.50 ^a	100
	MK	20.36 \pm 2.12 ^b	80
12mo	C	26.18 \pm 2.86 ^a	100
	MK	25.70 \pm 3.39 ^a	98

2. SAM에 있어서 항노화성김치(B형, 항동맥경화성 김치)의 동맥경화 예방 효과

가. 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율

1년 동안 사육한 SAM의 체중 증가량, 식이섭취량, 식이효율을 Table 86에 나타내었다. 사육 초기의 각 군의 SAM의 평균 체중은 25-30g 정도였고, 6개월 사육후에는 대조군이 41.28 ± 8.00 , 배추김치군 41.65 ± 6.36 , 배추갓김치군 40.7 ± 6.62 g 으로 증가하였고, 12개월 후에는 대조군 42.14 ± 7.00 , 배추김치군 46.78 ± 6.62 , 배추갓김치군 41.00 ± 5.23 , 1.44 ± 7.78 g 으로 군간의 유의적인 차이가 없었다. 나이가 들어감에 따라 식이 섭취량, 체중증가량은 모두 감소하였고, 김치섭취에 의해서도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체중 증가량과 식이 섭취량을 고려한 식이 효율에서는 배추군에서 높았는데($p < 0.05$), 이것은 배추군에서 식이섭취량에 비해 체중 증가량이 높아 식이효율이 유의적으로 높게 나타난 것으로 생각된다. 본 실험에서 김치섭취로 인한 식이섭취량의 차이는 없었다.

Table 86. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of SAM fed *kimchi* diets for 12 months

Age	Group	Body weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	Food efficiency ratio ²¹ (%)
6mo	C	0.64 ± 2.98	28.27 ± 4.97	2.33 ± 0.40^{ad}
	BK	0.84 ± 2.62	31.01 ± 5.52	2.80 ± 0.54^a
	BM	0.64 ± 3.01	31.37 ± 6.45	2.06 ± 0.38^{cd}
12mo	C	-0.19 ± 3.40	21.47 ± 6.98	-0.98 ± 0.31^c
	BK	-0.21 ± 3.75	24.29 ± 7.77	-0.95 ± 0.29^a
	BM	-0.21 ± 3.56	22.05 ± 8.46	-1.13 ± 0.57^b

(C : 대조군 BK: 배추김치군 BM: 배추갓김치군)

나. 혈장의 지질농도

Table 87. Lipids concentrations of serum of SAM fed *kimchi* diet for 12 months

	Lipid(mg/g)				
	Cholesterol	Triglyceride	LDL-C	HDL(mg/dl)	AI
0mo	50.37 ± 6.26^A	101.24 ± 7.03^A	0.07 ± 0.02^A	39.73 ± 1.12^A	0.57 ± 0.02^A
C ¹⁾	134.43 ± 5.2^B	130.60 ± 24.35^A	25.25 ± 9.51^B	83.06 ± 7.77^B	0.58 ± 0.16^A
	BK	128.44 ± 11.37^{AB}	108.15 ± 5.58^A	20.84 ± 10.70^B	85.97 ± 1.47^{AB}
6mo BK	116.55 ± 18.99^B	92.12 ± 18.39^A	17.08 ± 2.75^B	89.45 ± 9.30^B	0.30 ± 0.17^A
C	181.6 ± 22.71^C	128.8 ± 2.26^{AB}	28.99 ± 12.34^B	126.86 ± 24.65^C	0.46 ± 0.17^A
	BK	146.3 ± 44.13^B	109.20 ± 13.31^{AB}	15.36 ± 14.44^B	109.17 ± 28.52^B
12mo BM	124.5 ± 7.76^B	77.87 ± 7.17^{AB}	13.05 ± 10.91^B	95.44 ± 6.27^B	0.31 ± 0.14^A

혈장 중의 지질의 농도를 분석하였다(Table 87). 혈중 TG 수준은 12개월에서 갖침 가김치, 갖김치를 섭취한 군이 유의적으로 낮았으며, control군에서는 연령이 증가함에 따라 TG수준이 증가하는 경향으로 나타났으나, 배추김치, 갖침가김치군에서는 감소하거나 같은 수준을 유지하는 경향이었으며, TCH수준은 모든 김치섭취군에서 가령에 따라 유의적으로 증가했으며, 특히 control군은 그 증가폭이 커서 0개월과 6개월 사이, 그리고 6개월과 12개월 사이 유의적으로 수치가 증가하였다. 그러나 김치를 섭취시킨군은 0개월과 6개월 사이 TCH이 유의적으로 증가했으나 6개월과 12개월 사이에는 TCH가 유의적으로 증가하지 않았으며, control에 비해 증가폭이 적었다. LDL-cholesterol은 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 증가하였다. 그러나, control군에서는 그 수치가 가령에 따라 지속적으로 증가하는 양상을 보였으나, 김치 섭취군은 증가하였다가 수치가 다소 감소하는 양상을 보였다. HDL-cholesterol은 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 증가하였다.

다. 장기의 콜레스테롤 농도

Table 88. Cholesterol concentrations of tissue of SAM fed kimchi diet for 12 months

	Cholesterol (mg/ g)				
	간	폐	신장	비장	뇌
0mo	4.05±0.85 ^A	11.58±5.80 ^{AB}	11.58±2.16 ^A	11.58±1.93	8.20±0.48 ^{AB}
C ¹⁾	10.76±2.33 ^{Aa}	18.33±2.89 ^A	8.20±0.48 ^A	16.40±2.89	28.46±0.48 ^{Ca}
BK	9.07±0.94 ^{Abab}	13.50±3.86 ^A	8.68±1.67 ^{AB}	16.40±4.82	15.92±0.48 ^{Cb}
6mo BK	8.86±0.77 ^{bab}	9.16±0.48 ^A	5.06±1.58 ^B	13.50±2.89	12.06±0.48 ^{Ac}
C	14.32±1.97 ^{Aa}	21.54±4.34 ^A	6.27±0.48 ^A	10.61±0.96	70.90±0.48 ^{Ba}
BK	13.56±1.39 ^{bab}	23.63±3.38 ^A	6.99±1.25 ^B	8.20±0.48	14.95±1.45 ^{Cb}
12mo BM	12.72±0.37 ^{bb}	16.40±2.16 ^B	4.58±1.58 ^B	7.72±0.96	4.34±1.45 ^{Bc}

조직에서의 콜레스테롤 농도를 Table 88에 나타내었다. 폐의 TCH는 control군과 배추김치 섭취군은 가령에 따라 지속적으로 증가하는 경향이었으나, 특히 갖배추김치군은 유의적으로 증가하였다.

신장의 TCH는 control군 가령에 따른 유의차는 보이지 않았으나 배추김치군(12개월), 갖배추김치군(6개월, 12개월)은 가령에 따라 유의적으로 감소됨을 보였다. 비장의 TCH는 가령 및 군간 유의차는 없었다. 뇌의 TCH는 control군, 배추김치군은 가령에 따라 유의적으로 증가되었으나, 갖배추김치군에서는 가령에 따른 유의차가 나타나지 않았다. 6개월에 갖배추김치군의 TCH 수준이 유의적으로 다른 군에 비해 가장 낮았으며, 그 다음은 배추김치군이 유의적으로 낮았으며 control, 유의차는 없었다. 12개월에서는 모든 군간에 유의차가 발생했는데 갖배추김치군의 TCH수준이 가장 낮았으며 그다음은 배추김치군 그리고 control의 순이었다. 간의 TCH는 가령에 따라 증가했으며,

또한 비록 유의차는 나지 않았으나 갓배추김치 및 배추김치의 TCH수준도 control군에 비해 다소 저하되었다. 12개월에서는 갓배추김치군의 TCH수준이 유의적으로 가장 낮은것으로 나타났으며, 김치섭취를 시킨 군이 control군에 비해 다소 낮은 수준을 보였다.

라. 장기의 중성지방 농도

조직의 중성지방 농도는 Table 89와 같다. 폐의 TG 수준은 가령에 따른 차이 및 군간 유의차는 없었다. 그러나 control군에 비해 김치섭취군의 수치가 다소 감소하는 경향으로 나타났다. 심장의 TG수준은 가령에 따라 감소하였으며 군간 유의차는 없었으나 control군에 비해 김치섭취군의 수치가 다소 감소하였으며, 폐의 경우처럼 갓첨가김치의 수치가 낮은 경향이였다. 신장의 TG 수준은 가령에 따른 차이는 없었으나, 12개월령의 갓첨가김치 섭취군의 TG 수준이 다른 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 비록 유의차는 나타나지 않았으나 배추갓김치, 배추김치의 TG수준도 control군에 비해 감소하는 경향이였다. 비장의 TG수준은 가령에 따른 차이 및 군간 유의차는 없었으나 control군은 지속적으로 증가하는 경향이 있는 반면 김치섭취군은 6개월까지는 증가하다가 12개월경에 감소하는 경향으로 나타났다. 뇌의 TG는 가령에 따른 차이 및 군간의 차이는 없었으나, 가령에 따라 수치가 증가하는 양상을 보였다. 간의 TG는 갓첨가김치 섭취군을 제외하고는 가령에 따라 유의적으로 증가하였다. 그러나 갓첨가김치의 경우는 비록 수치상의 증가는 있었으나 유의적인 증가를 보이지는 않았다.

Table 89. Triglyceride concentrations of tissue of SAM fed kimchi¹⁾ diet for 12 months

	Triglyceride (mg/g)						
	간	폐	심장	신장	비장	뇌	
0mo	39.53±6.00 ^a	25.38±3.76	18.09±1.85 ^a	12.63±2.38 ^a	5.65±0.38 ^a	21.67±0.19 ^a	
C ¹⁾	82.91±3.20 ^{ab}	17.34±0.75	11.31±2.32 ^b	15.08±2.68 ^a	16.96±7.16 ^a	25.50±15.33 ^a	
BK	70.35±1.42 ^{ab}	14.32±2.26	8.79±1.42 ^b	12.44±1.13 ^a	14.70±6.41 ^a	21.61±16.55 ^a	
6mo	BM	77.42±18.99 ^a	7.16±0.38	6.03±3.15 ^b	14.51±1.95 ^a	10.55±0.75 ^a	23.24±16.42 ^a
C	98.94±20.90 ^b	29.70±3.11	12.81±0.75 ^{ab}	16.96±0.38 ^{ab}	18.09±15.83 ^a	29.10±14.44 ^a	
BK	101.84±15.18 ^b	24.12±0.75	10.74±2.02 ^b	14.70±1.13 ^{ab}	9.80±6.03 ^a	27.44±15.47 ^a	
12mo	BM	84.52±5.46 ^a	16.08±4.70	10.30±1.55 ^b	10.18±1.13 ^{ab}	7.91±4.90 ^a	25.33±14.78 ^a

마. 장기의 과산화물 함량

Table 90. Level of tissue lipid oxidation of SAM fed kimchi diet

	TBARS(nmole MDA/g tissue)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	239.60±28.1 ^{ab}	145.17±9.20 ^a	148.13±82.71 ^a	74.04±29.84 ^{ab}	74.30±17.19 ^a	183.72±27.15 ^a
C ^{1/}	275.37±17.48 ^{ca}	78.14±5.3 ^{ba}	196.83±11.62 ^{ca}	93.17±16.56 ^{ca}	93.25±26.81 ^a	226.44±48.03 ^{ba}
BK	161.56±78.67 ^{cd}	45.22±13.16 ^{abc}	185.48±2.81 ^{abd}	79.41±11.36 ^{abd}	83.21±30.06 ^a	173.20±11.11 ^{abd}
6mo BM	172.41±87.99 ^{bd}	51.43±1.51 ^{bc}	165.34±1.8A ^b	69.96±11.95 ^{ab}	61.52±15.54 ^a	156.18±3.44 ^{abd}
C	283.60±10.44 ^{abd}	124.54±2.03 ^{ca}	46.40±3.67 ^a	56.85±5.35 ^{ba}	70.38±16.82 ^a	184.04±8.46 ^a
BK	269.45±26.31 ^{aba}	96.65±12.57 ^{abd}	41.33±6.93 ^a	44.55±2.13 ^{bd}	52.09±7.62 ^a	182.89±13.05 ^a
12mo BM	287.99±8.05 ^{bd}	86.20±3.70 ^{cd}	35.27±1.47 ^a	43.90±4.51 ^{bd}	53.15±5.09 ^a	185.23±9.39 ^a

조직의 TBARS함량을 나타내었다(Table 90). 폐의 TBARS는모든군에서 0개월 대비 6개월과 12개월 모두 유의적으로 감소하였다. 또한 6개월에는 control군에 비해 김치를 섭취시킨 모든군에서 유의적으로 감소하였으며, 비록 유의차는 나지 않았으나 배추김치군과 갓배추김치군의 경우도 역시 낮은경향이었다. 심장의 경우는 6개월의 경우 갓배추김치군의 수준이 control 군에 비해 유의적으로 낮았으며, 신장의 경우 12개월에는 배추김치군과 갓배추김치군에서 TBARS의 수준이 낮게 나타났다. 뇌의 경우는 6개월에 control 군에 비해 갓김치군의 TBARS 수준이 유의적으로 낮았으며, 배추김치군과 갓김치군도 비록 유의차는 나지 않았으나 낮은 경향이었다. 간의 경우 0개월 대비 6개월에서 control군의 TBARS는 유의적으로 증가하였으나 배추김치군과 갓배추김치은 유의적으로 감소하였으며, 군간비교시 control 군에 비해 김치섭취시킨 군의 수준이 유의적으로 낮게 나타났다. 또한 12개월에서는 배추김치의 경우 갓배추김치군의 수준에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

바. HMG-CoA reductase 활성

항노화 기능이 강조된 김치(배추군, 기능성 배추김치군)를 식이로 하여 12개월간 사육한 노화촉진마우스에서 0개월째 HMG-CoA reductase 활성은 30.18nmole/min/ mg microsomal protein로 나타났으며 6개월 후에는 대조군이 34.54, 배추군이 29.27, 기능성 배추군이 23.46 으로 나타났다. 김치를 섭취한 군에서의 HMG-CoA reductase 활성이 대조군에 비해 낮게 나타나 이는 혈중 지질농도 저하 현상이라고 할수있다.

사. 항산화효소계 측정

1) Catalase활성

Table 91. Catalase activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	Catalase(mu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	110.00±100 ^a	32.58±9.07 ^{ab}	224.57±42.83 ^a	224.57±42.83 ^a	16.67±4.76 ^a	33.60±6.01 ^a
C ¹⁾	30.34±9.47 ^d	27.92±3.06 ^{abc}	35.86±5.77 ^d	35.86±5.77 ^d	38.43±10.17 ^a	33.10±15.2 ^a
BK	42.53±1.67 ^a	45.21±12.05 ^{abd}	39.30±6.80 ^d	39.30±6.80 ^d	77.90±42.16 ^a	49.56±23.26 ^a
6mo BM	49.84±31.35 ^b	88.60±34.38 ^b	53.18±13.06 ^d	53.18±13.06 ^d	75.44±42.70 ^a	71.33±37.07 ^a
C	42.13±15.88 ^d	4.52±0.90 ^a	16.27±3.62 ^a	24.92±12.50 ^d	50.37±9.53 ^d	18.68±6.98 ^a
BK	47.06±5.76 ^a	21.24±10.65 ^{abd}	16.04±4.01 ^b	32.54±6.39 ^d	46.62±3.57 ^d	25.49±6.70 ^a
12mo BM	46.08±6.86 ^a	31.64±6.79 ^d	23.73±4.16 ^a	43.99±11.58 ^d	63.17±12.53 ^a	32.18±10.69 ^a

비장의 catalase는 control은 가령에 따라 유의적으로 증가했으나, 김치를 섭취시킨군은 가령에 따른 유의차가 없었으며, 6개월,12개월에서 군간 유의차도 없었다. 그러나 김치를 섭취시킨 군의 수치가 control의 수치보다 높은 경향이였다. 신장의 경우 모든군에서 가령에 따라 유의적으로 감소하였으며, 군간 유의차는 없었다, 그러나 control의 수치보다 김치를 섭취시킨군에서 높은 경향을 보였다. 심장의 경우 가령에 따라 catalase 수준이 저하되는 것으로 나타났으며 특히 배추김치의 경우 유의적인 감소를 나타내었다. 군간유의차도 보이지 않았으나 갓배추김치의 수치가 6개월 및 12개월에서 모두 상승된 경향을 보였다. 폐의 경우 control군과 배추김치군은 0개월에 비해 12개월에 catalase 수치가 유의적으로 감소하였다. 그러나 갓배추김치군은 6개월령에 0개월에 비해 catalase 가 유의적으로 상승하였다. 또한 6개월에 갓배추김치군의 경우 control군에 비해 유의적으로 증가했으며, 12개월에도 갓배추김치군의 catalase 가 control군에 비해 유의적으로 상승하였다. 뇌는 가령에 따른 차이나 군간의 차이가 유의적이지 않았으나 control군에 비해 김치를 섭취시킨군들의 수치가 다소 높은 경향이였다. 간의 catalase는 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 감소하였으나, 군간 유의차는 없었으며, 역시 김치를 섭취한 군들의 수치가 다소 높은 경향이였다. 이 상으로 보아 catalase수치는 장기마다 다른 특색을 보이지만 대체적으로 가령에 따라 저하되며, control군에 비해서 김치를 섭취시킨군에서 높게 나타나는 형상이였다. 또한 김치군들 중에서도 갓배추김치군의 catalase수치가 높은 것으로 나타났다.

2) Glutathione peroxidase활성

GSH-px는 폐의 경우 6개월에 갓배추김치군이 다른 군들에 비해 유의적으로 증가했으며, 심장의 경우 갓김치군의 수준이 유의적으로 증가했다. 신장의 경우 6,12개월 모두 다른 군들에 비해 갓배추김치군의 수준이 증가하는 양상을 보였다. 또한 0개월 대비 12개월에서는 control군과 배추김치군에서는 유의적으로 수준이 감소되었으나 갓배추김치군과 갓김치군은 유의적인 변화를 보이지 않았다. 비장은 모든군에서 가

령에 따라 수준이 지속적으로 감소됨을 보였고, 뇌의 경우 비록 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 control군과 배추김치군은 0개월 대비 수치가 감소되었는데 갓배추김치군은 0개월 대비 6개월, 12개월 수준이 다소 증가하는 양상이었다. 간장의 경우 모든군에서 가령에 따라 유의적으로 그 수준이 감소되었으며, 군간 유의차는 없었다 (Table 92).

Table 92. GSH-px activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	GSH-px(U/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	31.00±10.00 ^a	52.80±28.33 ^a	81.00±3.59 ^a	44.5±27.18 ^{ab}	476.00±252.93 ^a	18.80±1.01 ^a
C ¹⁷	26.74±13.80 ^a	21.98±8.61 ^{ab}	173.52±31.42 ^{ab}	37.65±15.88 ^{abc}	291.83±37.90 ^a	12.22±6.46 ^a
BK	27.29±8.15 ^a	19.25±8.05 ^{ab}	136.23±2.45 ^{bc}	48.78±16.36 ^{abc}	261.31±50.04 ^a	11.52±5.53 ^a
6mo BM	22.48±11.34 ^a	39.68±7.19 ^{ab}	97.17±0.63 ^{bc}	114.50±31.77 ^{ab}	168.28±9.08 ^a	22.82±4.62 ^a
C	4.91±2.56 ^a	27.53±5.18 ^{ab}	16.11±2.61 ^{cd}	16.03±4.26 ^{ab}	26.05±0.00 ^a	12.70±30.06 ^a
BK	6.34±0.81 ^a	28.71±6.36 ^a	7.90±0.38 ^b	10.45±1.67 ^a	33.89±5.73 ^a	12.94±3.95 ^a
12mo BM	5.42±2.19 ^a	29.19±7.52 ^a	17.66±0.98 ^{cd}	21.91±6.08 ^{ab}	50.65±9.09 ^a	22.79±12.82 ^a

3) Cu, Zn-SOD활성

비장의 Cu, Zn-SOD는 control군에서는 6개월에 유의적으로 감소하였다. 그러나 같은 시기 배추김치군과 갓배추김치군은 유의적 변화가 없었으며 control군에 비해 배추김치, 갓배추김치군이 유의적으로 높았다. 12개월에도 갓배추김치이 control에 비해 유의적으로 높은 수준을 보였다. 신장의 경우 control 군과 배추김치군은 가령에 따라 유의적으로 감소하였으나, 갓배추김치군은 0개월대비 유의적인 차이를 보이지 않았다. 폐의 경우 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 감소했으며, 6개월에서는 갓배추김치군이 12개월에서는 배추김치군이 다른 군에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타냈다. 뇌에서 12개월경우 0개월에 비해 control군과 배추김치군은 유의적으로 감소했으나, 6개월에서는 갓배추김치군의 수준이 control 군에 비해 유의적으로 높은것으로 나타났다. 간의 경우 모든군이 가령에 따른 변화를 보이지 않았다. 그러나 6개월에서 control군과 배추김치군에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타냈으며, 갓배추김치군도 control군에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었다.

Table 93. Cu, Zn-SOD activities of tissues of SAM fed kimchi diet.

	Cu, Zn-SOD(Nu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	152.85±26.62 ^a	88.80±6.40 ^a	68.20±4.65 ^a	63.13±5.17 ^{ab}	68.89±1.70 ^a	45.15±6.90 ^a
C ¹	148.77±30.09 ^{ac}	64.41±1.90 ^{ba}	44.64±0.53 ^{ba}	51.30±1.48 ^c	50.45±0.93 ^{ba}	26.45±0.42 ^{Ba}
BK	190.66±18.19 ^{abc}	61.07±5.43 ^{ba}	61.53±0.73 ^{ab}	51.40±4.66 ^c	65.10±2.65 ^{ab}	28.01±1.04 ^{ba}
6mo BK	224.66±20.07 ^{abd}	85.92±3.81 ^{ab}	54.42±1.78 ^{bc}	56.08±8.24 ^{ab}	64.67±1.06 ^{ab}	29.78±2.56 ^{ab}
C	165.80±27.44 ^a	71.73±6.24 ^{ba}	66.03±6.64 ^{ba}	56.51±5.58 ^a	67.24±0.77 ^{ab}	32.44±2.76 ^d
BK	199.49±77.22 ^a	84.82±4.74 ^{ab}	60.53±5.20 ^{ba}	51.07±9.33 ^{ba}	67.16±0.77 ^{ab}	36.73±5.01 ^c
12mo BM	211.85±91.19 ^a	71.38±0.47 ^{ba}	79.00±3.17 ^{ab}	61.15±3.39 ^{abd}	75.61±2.44 ^{ab}	41.31±14.23 ^c

4) Mn-SOD활성

폐의 Mn-SOD는 6개월에서 갓배추김치군이 다른 군들에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내고 있으며, 가령에 따라 각기 다른 양상을 나타내었다. 심장의 경우 6개월에는 배추김치군이 12개월에서는 갓배추김치군이 각기 다른 군들에 비해 유의적으로 증가되었으며, 신장에서는 12개월에서 갓배추김치군이 다른 군들에 비해 유의적으로 증가하였다. 비장의 경우 6개월에 control군에 비해 배추김치군, 갓배추김치군이 유의적으로 높았다. 그러나 12개월에는 군간 유의차는 보이지 않았다. 뇌의 경우 모든 군에서 가령에 따라 유의적으로 감소되었으며, control에 비해 6개월에서는 갓배추김치군의 수준이 유의적으로 증가하였다. 간에서는 control 군과 배추김치군은 가령에 따른 변화가 없었으나 갓배추김치군은 유의적으로 증가하는 양상을 보였다.

Table 94. Mn-SOD activities of tissues of SAM fed *kimchi* diet.

	Mn-SOD(Nu/mg protein)					
	간	폐	심장	신장	비장	뇌
0mo	20.94±2.75 ^a	20.09±1.03 ^a	14.82±0.20 ^a	14.51±0.85 ^a	14.74±0.40 ^a	19.68±0.63 ^a
C ¹	26.09±5.12 ^a	14.66±1.75 ^{ba}	10.96±0.25 ^{ba}	10.32±0.50 ^b	9.05±0.09 ^{ba}	10.85±0.29 ^{ba}
BK	26.45±17.90 ^a	12.16±0.70 ^{ba}	12.02±0.10 ^{ba}	10.42±0.87 ^b	12.02±0.10 ^{ba}	11.39±0.13 ^{ba}
6mo BM	27.86±0.41 ^a	27.42±9.69 ^{ab}	10.60±0.06 ^{ba}	11.46±1.95 ^b	12.02±0.10 ^{ba}	11.77±0.34 ^{ba}
C	30.72±5.57 ^a	19.74±0.30 ^a	13.53±0.09 ^{ca}	11.72±1.22 ^{ba}	14.28±0.46 ^a	12.03±0.73 ^{ba}
BK	34.12±7.81 ^a	20.76±1.63 ^a	12.67±0.62 ^{ba}	10.94±0.45 ^{ba}	13.69±0.23 ^c	13.79±2.07 ^{ba}
12mo BM	39.30±2.30 ^c	24.37±9.50 ^a	16.55±0.38 ^{bd}	13.45±0.99 ^{ba}	15.19±0.38 ^a	12.44±0.63 ^{ba}

아. 피부의 노화에 미치는 영향

1) 피부의 지질농도

Table 95. Lipids concentrations of skin of SAM fed *kimchi* diet for 12 months

	Lipid(mg/g)			
	Cholesterol	Triglyceride	Phospholipid	Total Lipid
0mo	1.99±0.38	39.29±2.33	11.29±2.28	73.75±6.98
C	3.87±0.67	94.54±2.41	9.51±3.08 ^a	183.75±53.48
BK	3.97±0.35	94.36±8.03	6.68±1.06 ^b	165.00±65.38
6mo	3.81±0.75	95.76±14.70	6.85±4.34 ^b	171.30±37.33
C	16.67±2.20 ^a	246.53±17.70 ^a	24.98±3.99 ^a	358.00±23.11 ^a
BK	14.29±0.74 ^c	214.55±28.78 ^b	18.93±3.30 ^b	313.81±42.04 ^{ab}
12mo	14.37±0.96 ^c	200.40±28.39 ^{bc}	18.40±2.57 ^b	285.42±29.79 ^b

김치를 섭취한 SAM의 피부에서 지질농도는 가령에 따라 증가하였는데, 콜레스테롤 농도는 0개월에 비해 12개월에서 700%, 중성지방의 농도는 500%, 인지질의 농도는 100% 정도 증가하였으며 총지질의 농도는 400% 증가하였다. 총지질과 중성지방은 400%로 같은 비율로 증가하였고, 가령에 따라 피부 속의 지질 중에 콜레스테롤의 농도 증가가 가장 높았다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 콜레스테롤 농도는 12개월에서 대조군 16.67, 배추김치군 14.29, 배추갓김치군 14.37 mg/g 으로 대조군에 비해 배추김치군 14%, 배추갓김치군 14% 유의적으로 낮아졌다(p<0.05). 중성지방 농도는 12개월에서 대조군은 246.53, 배추김치군에서 214.53, 배추갓김치군에서 200.40 mg/g 으로 대조군에 비해 유의적으로 가장 낮았다(p<0.05). 인지질 농도는 12개월에 대조군이 24.98, 배추김치군이 18.93, 배추갓김치군이 18.40mg/g으로 대조군에 비해 모든 김치군이 각각 24%, 26%로 유의적으로 낮았다(p<0.05). 총지방 함량은 12개월에서 대조군 358.00, 배추김치군에서 313.81, 배추갓김치군에서 285.42mg/g으로 대조군에 비해 배추김치군 12%, 배추갓김치군 21%로 유의적으로 낮았으며 배추갓김치군에서 가장 낮은 함량을 보였다(p<0.05).

2) 지질 산화 억제에 미치는 영향

가) 지질 산화정도

Table 96. Level of skin lipid oxidation of SAM fed *kimchi* diet

		POV(μ mole MDA/g skin)	TBARS(nmole MDA/g tissue)
0mo		26.24 \pm 4.87	4.85 \pm 0.49
	C ¹⁾	47.65 \pm 14.09 ^{NS}	5.31 \pm 0.84 ^{NS}
	BK	40.04 \pm 7.31	5.28 \pm 1.16
6mo	BM	40.35 \pm 7.77	4.17 \pm 1.56
	C	50.92 \pm 14.40 ^{NS}	6.97 \pm 1.19 ^a
	BK	51.64 \pm 4.53	5.39 \pm 1.54 ^b
12mo	BM	53.41 \pm 1.29	5.33 \pm 0.84 ^b

가령에 따른 피부의 지질 산화정도를 살펴보았을 때 모든 실험군에서 산화 생성물의 축적이 증가함을 알 수 있었다. 생육초기에 비해 6개월 후에 POV 농도는 약 80%, 12개월 후에는 94% 증가하여 6개월까지의 증가비율이 높았다. 김치 섭취가 피부에서 초기 산화 생성물인 POV 농도에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월에서 유의적이지 않았다. TBARS 농도는 가령에 따라 증가하였으며 12개월에서 대조군 6.97, 배추김치군 5.39, 배추갓김치군 5.33 nmol MDA/g tissue으로 대조군에 비해 모든 김치첨가군이 유의적으로 낮았으며 특히 배추갓김치군에서 낮았다($p < 0.05$). 지질 산화생성물의 양은 노화에 의해 증가하지만, 대조군에 비해 김치 첨가군의 함량이 낮았으며 배추갓김치군에서 지질함량, 지질 과산화물 모두 가장 낮았는데 이는 피부 속의 지질 함량에서 김치 첨가군이 낮았기 때문에 지질 산화 생성물 또한 낮은 것으로 사료된다.

나) LDL 산화억제 효과

Table 97. Inhibition of LDL initiated by Cu⁺⁺ in the presence of skin homogenate of SAM fed *kimchi* diet.

Age	Group ¹⁾	LDL oxidation		% inhibition
		nmole /g tissue	%Change ²⁾	
0mo		3.03±0.08	0	
6mo	C	3.58±0.26 ^{bc}	15	0
	BK	3.43±0.38	12	0.04
	BM	3.22±0.18	6	0.10
12mo	C	5.25±0.45 ^a	42	0
	BK	5.01±0.58 ^a	40	4.53
	BM	4.92±0.24 ^c	38	6.20

김치식이에 의한 피부 지질 산화정도를 살펴보았을 때 김치섭취군에서 지질 산화생성물의 축적이 낮음을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 사람의 LDL을 copper로 산화시킨 후, LDL 산화 정도를 살펴봄으로써 김치 식이에 의해 피부의 지질 산화가 얼마나 억제되었는지를 확인하고자 하였다. 더불어 김치 식이에 의한 항산화 물질의 축적 정도에 대하여도 간접적으로 살펴보고자 하였다. 이러한 피부 균질액을 피부 균질액의 LDL 산화억제 효과는 Table 97에 나타내었다. 노화함에 따라 조금씩 증가하는 경향이 있었으며 6개월에서는 유의적인 차이는 없었지만, 12개월에서는 대조군 5.25, 배추김치군 5.01, 배추갓김치군에서 4.92 nmol/g tissue로 LDL 산화 억제능이 대조군에 비해 각각 5%, 6%로 배추갓김치군에서 유의적으로 높았다(p<0.05). 이는 앞에서 살펴본 지질 과산화 생성물의 결과와 일치하였으며, 배추갓김치군의 피부에서 항산화 물질이 많이 남아있어 항산화 효과가 높음을 재확인 할 수 있었다.

(3) 항산화 효소계에 미치는 영향

가) Catalase

피부의 catalase 활성은 6개월에서 증가했으나 12개월에서는 그 활성이 감소하는 현상을 보였다. 김치식이가 catalase활성에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월의 대조군에서는 4.49, 배추김치군 3.91, 배추갓김치군 3.52 mU/mg protein으로 김치첨가군에서 유의적으로 낮았으며 특히 배추갓김치군의 활성이 가장 낮았다(P<0.05). 12개월에서는 대조군 2.10, 배추김치군 1.45, 배추갓김치군 1.26 mU/mg protein으로 배추김치군과 배추갓김치군에서 유의적으로 낮았으며 대조군에 비해 배추김치군 31%, 배추갓김치군 40% 낮은 결과를 보였다.(P<0.05) 본 실험에서 catalase의 활성은 나이가 들어감에 따라 유리기 생성의 증가로 인해 감소한 것으로 보여지며 김치 섭취군에서 유의적으로 유리기 생성이 낮아 효소의 활성도 낮은 것으로 사료된다.

(나) Glutathione peroxidase(GSH-px) 활성

GSH-px 활성은 연령이 증가함에 따라 6개월까지는 효소활성이 증가하였으며 12개월까지 유사한 활성이 지속되었다. 김치섭취가 GSH-px 활성에 미치는 영향을 살펴보았을 때 6개월에서는 대조군이 0.066, 배추김치군이 0.055, 배추갓김치군이 0.043 unit/mg protein으로 배추김치군과 배추갓김치군이 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), 특히 배추갓김치군은 대조군에 비해 35%로 가장 낮은 값을 보였다. 12개월에서는 대조군이 0.075, 배추김치군이 0.066, 배추갓김치군이 0.062 unit/mg protein으로 배추갓김치군이 대조군과 배추김치군에 비해 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$) 대조군에 비해 배추갓김치군이 61% 낮아졌다. GSH-px 활성은 가령에 따라 활성이 감소한다는 보고가 있고, 변화를 보이지 않는다는 보고도 있다. 김치섭취로 인한 변화를 살펴보면 대조군에 비해 배추갓김치군의 활성이 유의적으로 낮았다. GSH-px의 활성은 앞에서 언급한 피부에서의 지질의 농도와 지질 산화생성물의 농도와 일치하는 결과였는데, 이는 김치섭취군에서 지질과 지질 산화물의 생성이 낮아 효소의 활성도 낮은 것으로 사료된다.

(다) Cu, Zn-SOD 활성

사육 후 김치 섭취에 따른 Cu, Zn-SOD 활성을 비교해 보았을 때, 가령에 따라 거의 변화가 없었다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 6개월에서 대조군 21.74, 배추김치군 20.14, 배추갓김치군 25.40 Nu/mg protein로 각 군간의 유의성은 없었으며, 12개월에서도 대조군 24.25, 배추김치군 21.23, 배추갓김치군 24.56 Nu/mg protein로 각 군간의 유의성이 없었다.

(라) Mn-SOD 활성

Mn-SOD 활성도 가령에 의한 변화는 보이지 않았고, 6개월에서는 대조군 2.88, 배추김치군 2.78, 배추갓김치군 2.64 Nu/mg protein으로 각 군들간의 차이가 없었으며 12개월에서도 대조군 2.96, 배추김치군 3.53, 배추갓김치군 2.55 Nu/mg protein로 배추김치군에서 높았지만 유의적이진 않았다.

자. Collagen 농도의 변화

Table 98. Collagen contents of skin of SAM fed *kimchi* diet

Age	Group ¹⁾	Salt soluble collagen (mg/g skin)	Acid soluble collagen (mg/g skin)	Non soluble collagen (mg/g skin)	Total collagen (mg/g skin)
0mo		0.07±0.01	0.23±0.00	0.05±0.00	0.21±0.18
6mo	C	0.11±0.15 ^{ns}	0.63±0.00 ^a	0.13±0.05 ^{ns}	0.88±0.20 ^a
	BK	0.17±0.11	0.25±0.22 ^b	0.17±0.04	0.65±0.19 ^b
	BM	0.07±0.04	0.31±0.01 ^b	0.12±0.12	0.50±0.09 ^b
12mo	C	0.16±0.04 ^b	0.71±0.05 ^a	0.27±0.12 ^a	1.11±0.04 ^a
	BK	0.26±0.16 ^a	0.36±0.05 ^b	0.23±0.00 ^a	0.93±0.13 ^{ab}
	BM	0.15±0.05 ^b	0.42±0.32 ^b	0.12±0.00 ^b	0.69±0.37 ^b

본 실험에서 가령에 따른 collagen의 함량은 증가하였고 김치섭취에 의한 collagen 함량을 살펴보면 김치섭취군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 염가용성 collagen의 경우 12개월에서 대조군 0.16, 배추김치군 0.26, 갓배추김치군 0.15 mg/g으로 배추김치군에서 높은 결과를 보였다($p<0.05$). 산가용성 collagen의 경우, 6개월에서는 대조군이 0.63, 배추김치군 0.25, 배추갓김치군 0.31 mg/g으로 김치 첨가군은 대조군에 비해 유의적으로 모두 낮았으며($p<0.05$) 배추김치군, 배추갓김치군은 비슷한 수준이었는데, 대조군에 비해 배추김치군 60%, 배추갓김치군 51% 낮았다. 12개월에서는 대조군 0.71, 배추김치군 0.36, 배추갓김치군 0.42mg/g로 배추김치군과 배추갓김치군에서 유의적으로 낮은 값을 나타냈다($p<0.05$). 불용성 collagen함량은 가령에 따라 증가하였고 12개월에서는 대조군 0.27, 배추김치군 0.23, 배추갓김치군 0.12mg/g으로 낮았으며 대조군에 비해 각각 55.6%, 25.9% 낮았다. 총 collagen의 함량은 6개월에서는 대조군 0.88, 배추김치군 0.65, 배추갓김치군 0.50 mg/g으로 대조군에 비해 김치 첨가군에서 유의적으로 낮았고 12개월에서도 대조군이 1.11, 배추김치군 0.93, 배추갓김치군 0.69 0.88mg/g로 배추갓김치군에서 가장 낮았으며($p<0.05$), 대조군에 비해 16%, 44% 낮았다.

차. 총활성산소 농도의 변화

1) Homogenate 분획

Homogenate 분획에서는 가령에 따라 증가하였고 특히 12개월이 되면서 그 생성양은 현저히 증가하였는데 이는 노화가 촉진되는 현상의 결과인 것으로 사료된다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 대조군 0.31, 배추김치군0.21, 배추갓김치군 0.27 fluorescence/min/mg protein, 12월에서는 대조군 1.45, 배추김치군 0.87, 배추갓김치군 0.83 fluorescence/min/mg protein 로서 12개월에서 배추김치, 배추갓김치군이 대조군에 비해 각각 40%, 43% 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$).

2) Postmitochondria 분획

일반적으로 free radical의 농도가 많이 생성되는 것으로 알려진 postmitochondria 분획에서 총 free radical의 농도를 측정하였다. 나이가 들어감에 따라 증가하는 경향을 보였으며, homogenate 분획에서와 같이 12개월에 많은 증가가 있었다. 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 12개월에서는 대조군 0.74, 배추김치군 0.74, 배추갓김치군 0.65 fluorescence/min/mg protein 으로 본 실험에서는 차이가 없었다. 본 실험에서 김치를 섭취한 피부에서 활성산소종의 각 군별 생성패턴은 피부중의 TBARS 생성패턴과 LDL 산화억제 효과와 거의 유사함을 알 수 있었다. 김치 중에는 이러한 활성산소를 소거하는 항산화 물질들이 많이 함유되어 노화를 억제할 것으로 추측된다.

카. 고환의 노화억제에 미치는 영향

1) 지질 산화억제에 미치는 영향

Table 99. Inhibition of LDL initiated by Cu²⁺ in the presence of testis homogenate of SAM fed kimchi¹⁾ diet.

Age	Group ¹⁾	LDL oxidation		% inhibition
		nmole/g tissue	%Change	
0mo		3.09±1.27	0	
6mo	C	4.05±1.37	24	0
	BK	3.52±1.52	12	12.99
	BM	3.42±1.28	10	15.66
12mo	C	5.44±1.05 ^a	43	0
	BK	4.37±1.77 ^{ab}	29	19.73
	BM	3.97±0.88 ^b	22	26.99

고환에 있어 LDL 산화억제 효과를 나타내었다. 김치를 섭취시킨 SAM의 고환에 있어 TBARS농도는 나이가 들어감에 따라 증가하였으며 12개월에 김치섭취군에서 유의성 있는 감소를 보였다(p<0.05). 12개월에서 대조군 5.44, 배추김치군 4.37, 배추갓김치군 3.97 nmole/g tissue로 대조군에 비해 배추김치군, 배추갓김치군에서 유의적으로 각각 20%, 27% 로 지질 산화를 억제 시켰으며(p<0.05), 배추갓김치를 섭취한 고환의 LDL산화억제 효과가 가장 높았다. 고환에서도 피부의 균질액의 경우와 마찬가지로 대조군에 비해 배추갓김치, 배추김치 순으로 지질 산화억제능이 높은 것으로 나타났다

2) 총활성산소 생성의 변화

가) Homogenate 분획

총활성산소의 생성은 피부에서처럼 homogenate분획과 postmitochondria 분획에서

측정하였는데 모두 가령에 따라 증가하였으며, 김치섭취에 의한 변화를 살펴보면 homogenate분획의 6개월에서는 대조군 2.13, 배추김치군 2.08, 배추갓김치군 0.46 fluorescence/min/mg protein으로 대조군에 비해 배추갓김치군에서 각각 78%로 유의적으로 낮았으며, 특히 배추갓김치군에서 현저히 낮았다. 12개월에서는 대조군 5.12, 배추김치군 3.78, 배추갓김치군 2.52 fluorescence/min/mg protein 으로 대조군에 비해 배추김치군 26%, 배추갓김치군 51%로 유의적으로 낮아졌다.

나) Postmitochondria 분획

Postmitochondria 분획에서 12개월에서는 대조군 4.23, 배추김치군 3.19, 배추갓김치군 2.60로 유의성 있는 감소를 보였는데, 대조군에 비해 배추김치군 25%, 배추갓김치군 39%로 낮아졌다(p<0.05). 본 실험에 의하면 노화에 의해 지질 과산화물과 총 활성산소의 생성은 증가하였지만 김치 첨가식을 섭취한 군에 있어서는 대조군에 비해 낮았다. 특히, 배추갓 김치 속의 생리활성 물질은 활성산소의 유해작용을 억제하여 고환조직의 생식능력 유지와 함께 노화를 억제할 것으로 사료된다.

다) Glutathione의 함량 변화

생체내 항산화제로 존재하는 glutathione(GSH)의 농도를 고환조직에서 측정하였다. GSH와 GSH/GSSG는 나이가 들어감에 따라 감소하였으며 김치섭취에 의한 GSH의 함량변화를 살펴보면 6개월의 대조군은 49.57, 배추김치군 47.83, 배추갓김치군 60.00 μ M/mg protein으로 배추김치군과 대조군에 비해 배추갓김치군에서 유의적으로 높았다(p<0.05). 대조군에 비해 배추갓김치군은 21% 높은 값을 보였다. 12개월에서는 대조군 50.65, 배추김치군 36.73, 배추갓김치군 59.08 μ M/mg protein으로 배추갓김치군에서 높은 함량을 나타냈다.

Table 100 . Effect of kimchi diet GSH/GSSG level in testis of SAM

Age	Group	GSH		GSSG		GSH/GSSG	
		μ M/mg protein	%Change ¹	μ M/mg protein	%Change		%Change
0mo		90.21 \pm 1.96	100	188.11 \pm 11.77	0	0.506 \pm 0.140	100
	C ¹	49.57 \pm 0.77 ^c	55	176.79 \pm 4.42 ^{bc}	-6	0.258 \pm 0.046 ^c	51
6mo	BK	47.83 \pm 0.88 ^d	53	173.45 \pm 2.70	-8	0.292 \pm 0.049 ^{ab}	58
	BM	60.00 \pm 1.91 ^b	67	171.19 \pm 11.38	-10	0.362 \pm 0.061 ^a	72
	C	50.65 \pm 0.60 ^b	56	307.74 \pm 7.93 ^a	39	0.167 \pm 0.009 ^b	33
12mo	BK	36.73 \pm 0.48 ^c	41	224.08 \pm 4.71 ^b	16	0.165 \pm 0.017 ^b	33
	BM	59.08 \pm 1.55 ^a	65	308.77 \pm 12.02 ^a	39	0.190 \pm 0.005 ^a	38

GSH/GSSG는 노화함에 따라 비례적으로 감소하였는데, 6개월에서는 대조군 0.258,

배추김치군 0.292, 배추갓김치군 0.362로 대조군에 비해 배추김치군과 배추갓김치군에서 각각 12%, 29% 높았다($p < 0.05$). 12개월에서는 대조군 0.167, 배추김치군 0.165, 배추갓김치군 0.190로 대조군과 배추김치군에 비해 배추갓김치군이 유의적으로 높았으며, 대조군에 비해 배추갓김치는 12% 높았다($p < 0.05$). 따라서 김치섭취로 인해 이러한 활성산소의 유해작용을 억제하여 고환조직의 생식유지에 기여할 뿐 아니라 고환조직의 노화를 억제할 것으로 사료된다.

타. 안구에서의 lipofuscin농도 변화

안구에서 나이에 따른 lipofuscin의 함량 변화를 보면 가령에 따라 증가하였고 김치 섭취에 따른 lipofuscin 함량 변화는 6개월에서 김치첨가군 모두 유의적으로 감소하였으며 12개월에서는 다른 군들에 비해 배추갓김치군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다. lipofuscin은 생체막 지질에 생긴 활성산소 반응의 결과, 변성한 단백질을 함유한 세포사(cell death)를 유도한다. 노화로 인해 안구를 비롯한 대부분의 장기에서 생성되는 lipofuscin은 김치섭취군이 대조군보다 감소했으므로 김치는 노화를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 배추갓김치군에서 그 효과가 가장 높을 것으로 기대된다.

Table 101. Effect of *kimchi*¹⁾ diet on lipofuscin concentration at eyes of SAM.

Age	Group	Lipofuscin	
		Fluorescence	%Change
0mo		18.41 ± 1.20	
6mo	C	25.33 ± 2.50 ^a	100
	BK	21.96 ± 1.24 ^{ab}	86
	BM	19.26 ± 1.67 ^b	76
12mo	C	26.18 ± 2.86 ^a	100
	BK	24.02 ± 2.44 ^a	92
	BM	21.13 ± 1.29 ^b	81

3. 2차 항노화성 김치(B형, 항동맥경화성 김치)의 임상실험결과

가. 실험대상자의 특성 및 생활습관

1) 일반 특성

임상실험을 위해 선정된 피험자 19명의 연령, 신장, 체중, BMI, 비만도, 체지방율 등의 일반 특성을 in body 2.0.으로 측정하여(Table 104) 6주간의 변화를 살펴보았으며, 개인별 자료는 부록 5에 실었다. 위약군과 수용성 pill군은 각각 6명으로 남녀가 반반이고 비수용성 pill군은 7명으로 남자 4명, 여자 3명으로 구성되었다. 위약군의 연령은 대조군이 28세에서 49세로 평균 35.5 ± 8.6세, 수용성 pill군은 31세에서 45

세로 38.5 ± 5.7 세, 비수용성 pill군은 34세에서 49세로 41.6 ± 5.8 세이었고, 신장의 평균은 167.2 ± 6.5 cm, 169.2 ± 6.7 cm, 165 ± 6.8 cm이었고, 체중의 평균은 63.9 ± 14.9 kg, 66.7 ± 9.4 kg, 69.4 ± 9.3 kg으로 나타나 비수용성 pill군의 연령이 다소 높고 신장에 비해 체중이 많은 편이었으나, 군간의 차이는 거의 없었다. 6주의 실험기간 동안 이들 피험자의 체중변화는 미미하였으나 위약군과 수용성 pill군에 비해 비수용성 pill군은 체중이 0.6% 감소하였다. 김치가 체지방 변화에 미치는 영향을 변화율로 살펴보았을 때 BMI의 평균은 위약군이 1.3% 정도 상승하였으며 수용성 pill군은 0.7% 정도로 미미하게 감소하였고 비수용성 pill군은 1.0% 정도로 감소하였다. 비만도는 위약군이 1.1% 증가하였으며 수용성 pill군은 0.5%, 비수용성 pill군은 1.5% 감소하는 경향을 보였다. 체지방율도 위약군은 1.7% 증가되었고 수용성 pill 군은 2.7%, 비수용성 pill군은 2.8% 감소하는 경향을 보였다. 비만과 관계되는 요인들, 즉, 체중, BMI, 비만도 그리고 체지방율의 변화정도를 살펴 보았을 때 위약군은 다소 증가하였으나 김치 획분 pill을 섭취한 실험군은 감소하는 경향을 보인 것으로 나타났으며, 특히 비수용성 pill을 섭취한 실험군에서 가장 낮아졌다. 이는 김치의 비수용성 획분 속에 함유된 식이섬유소 때문으로 생각된다.

2) 생활습관

김치 획분 pill과 위약을 섭취하기 위해 선정된 대상자 19명의 흡연량, 음주량, 운동량 등에 관한 생활습관의 양상을 살펴보면 음주량은 여자보다 남자가 많았으며, 위약군의 1일 음주량은 18.9mmg으로 수용성 pill군 11.8mmg, 비수용성 pill군 10.7mmg에 비해 많았다. 여자는 전혀 담배를 피우지 않았으며 대조군과 실험군에 참가한 남자는 1-2명 정도가 하루 20개피 정도를 피우는 것으로 나타났으나 전체적으로 보았을 때 실험에 참가한 피험자들의 흡연량은 적은 편이었다. 규칙적으로 운동을 하는 사람은 거의 없었으며 주 1-2회 운동을한다고 응답한 사람이 김치획분 pill군에서 각 한 명씩 있었다. 이상에서 살펴본 생활습관 양상은 대체적으로 위약군과 수용성 pill군, 그리고 비수용성 pill군 모두 비슷하였다.

3) 혈압의 저하에 미치는 영향

2차 임상 실험에 참가한 실험대상자의 혈압은 수축기 혈압이 122~133mmHg 그리고 이완기 혈압이 70~82mmHg 사이로 정상범위에 속하였으며 실험군간의 차이를 살펴보면 수용성 pill군이 다른 군보다 다소 높았는데 이는 피험자 중 1명이 168/98mmHg로 고혈압 환자이었다. 임상기간 중 혈압의 변화를 살펴보면 위약군의 수축기혈압은 0주째가 122.8 ± 9.8 mmHg이고 6주째가 127.2 ± 21.5 mmHg으로 다소 높아졌으며 수용성 pill군은 133.7 ± 21.6 mmHg에서 129.8 ± 15.8 mmHg로 낮아졌고 비수용성 pill군은 123.1 ± 11.3 mmHg에서 121.4 ± 6.3 mmHg으로 미미하게 감소하였다. 이를 각 개인별 변화율의

평균으로 살펴보았을때(Table 102) 위약군은 3.3% 증가하였고 수용성 pill군은 2.1%, 비수용성 pill군은 0.9% 감소하였다. 반면 이완기 혈압의 변화는 0주째 위약군이 70.0±12.7mmHg이고 6주째 75.5±17.1mmHg로 임상 실험 기간동안 8.1% 높아졌고 수용성 pill군은 81.3±9.9mmHg에서 77.7±12.0mmHg로 변화율은 4.5% 낮아졌고 비수용성 pill군은 75.0±9.0mmHg에서 74.6±6.2mmHg로 거의 변화가 없었다.

4) 김치 보충제가 혈액성상에 미치는 영향

위약과 김치 보충제를 6주간 섭취한 실험대상자의 혈액성상의 변화를 Table 103에 나타내었다. 혈중 알부민은 위약군과 수용성, 비수용성 pill군 모두 정상이었고 6주 동안 변화가 없었다. 공복시 실험대상자의 혈당치는 90~97mg/dL로 모두 정상범위에 속하였으며 임상 실험 6주후 위약군과 수용성 pill군은 변화가 없었고, 비수용성 pill군은 97.6±9.0mg/dL에서 91.3±5.4mg/dL로 감소하였으며 6주간 비수용성 pill 보충섭취에 따른 혈당치의 변화는 6.1% 정도 감소하였으나 유의적이지 않았다. 백혈구 수치는 위약군이 5.6±1.5×10⁹/L에서 5.4±0.6×10⁹/L로 약 2.6% 증가하였고 수용성 pill군은 5.8±0.9×10⁹/L에서 6.0±1.7×10⁹/L으로 5.0% 증가하였으며 비수용성 pill군은 변화가 거의 없었다.

Table 102. Change in blood pressure of human subject took a soluble or nonsoluble *kimchi* fraction pill for 6 weeks¹

Trial group	week	SBP	DBP
Placebo ²⁾	0	122.8±9.8	70.0±12.7
	6	127.2±21.5	75.5±17.1
		3.3±12.0	8.1±17.0
<i>Kimchi</i> soluble fraction ³⁾	0	133.7±21.6	81.7±9.9
	6	129.8±15.8	77.7±12.0
		-2.1±8.3	-4.5±8.0
<i>Kimchi</i> nonsoluble fraction ⁴⁾	0	123.1±11.3	75.0±9.0
	6	121.4±6.3	74.6±6.2
		-0.9±8.0	-0.9±6.1

Data are mean±SD.

Data in shady box represent change rate(%) calculated as sum of individual change rate during clinical trial divided by number of participators.

SBP : Systolic blood pressure DBP : Diastolic blood pressure

^{1,2,3,4)}See the legend of table 6.

실험 대상자의 적혈구수는 4.5~4.7×10¹²/L로 정상범위에 속하였으며 임상기간동안 세 군 모두 변화가 거의 없었다. 헤모글로빈 농도는 14g/dL로 정상이었으며 헤마토크리트의 농도도 정상범위인 41ratio 부근이었다. 혈소판 수치는 247~287×10⁹/L로 정상범위에 속하였으며 임상 기간동안 위약군이 14.1% 감소하였고 수용성 pill군

은 2.8% 증가하였으며 비수용성 pill군은 변화가 없었다.

Table.103 Changes in hematological parameters of human subject consumed soluble or nonsoluble kimchi fraction pill for 6weeks

□ Placebo	Albumin	Glucose	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT
1	0	0	-13.7	-6.5	-3.8	-3.1	-56.3
2	-4.7	-4.8	-21.7	-11.5	-10.9	-5.7	1.5
3	2.3	-8.9	15.1	-2.9	-3.5	-2.6	-22.3
4	9.3	-2.2	21.5	5.2	5.1	5.7	-2.5
5	10.3	23.3	-31.1	-4.8	-5.6	-2.2	-5.6
6	0	-8	45.6	14.2	17.4	23.65	0.7
M ±SD	2.9 ±5.82	-0.1 ±11.96	2.6 ±29.5	-1.1 ±9.28	-0.2 ±10.03	2.6 ±11	-14.1 ±22.44
Soluble fr							
1	0	-7.4	-6.9	-7.8	-5	-4.3	-3.2
2	2.6	3.4	6.54	-3.6	-4.1	-3	-17.9
3	7.7	1.1	12.4	3.5	4	6.8	8.6
4	-4.5	11.7	0.4	-4.1	-5.1	-4.6	24.3
5	-2.3	0	6.9	-0.8	0.6	4.1	-7
6	4.5	0	10.8	-2.4	-2.8	1.5	11.8
M ±SD	1.3 ±4.51	1.5 ±6.18	5.0 ±7.18	-2.5 ±3.76	-2.1 ±3.64	0.1 ±4.75	2.8 ±15.07
Nonsoluble fr							
1	2.5	-9	4.4	-5.4	-6.2	-2.1	-24.5
2	0	-1	4.5	-2.4	-1.7	1.7	21.38
3	-4.8	-2.2	-1.9	-6.5	-8.1	-2.7	-0.34
4	7.7	-10.5	-14.9	-4.4	-6.8	-2.6	-8.8
5	-4.8	-16.7	3.9	-6.7	-5.4	-4	-0.97
6	0	-1	15.7	1.3	-1.9	2.89	7.58
7	2.4	-2.2	-8.6	9	4	12.13	4.76
M ±SD	0.4 ±4.38	-6.1 ±6.07	0.5 ±10.01	-2.2 ±5.63	-3.7 ±4.17	0.8 ±5.59	-0.1 ±14.24

5) 식이섭취 수준

임상기간 동안 실험대상자들의 식이섭취 수준이 일정하게 유지되는 것은 김치 pill 섭취에 따른 지질 저하효과를 살펴보고자 하는 본 실험의 결과 해석을 위하여 대단히 중요한 일이다. 피험자의 식이섭취수준이 평소 식습관대로 행해질 수 있도록 실험 전 강조하였으며, 이를 확인하기 위하여 0주와 6주에 각각 3일간의 식이섭취량을 기록하도록 하였다. 외식을 고려하여 목, 금, 그리고 토요일 3일간의 식이섭취 기록을 한국영양학회 부설 영양정보 센터에서 제작한 CAN-pro program를 이용하여 각 개인의 영양소의 섭취량을 산출하였다. 각 군당 열량, 단백질, 당질, 지방, 칼슘, 식이섬유 그리고 콜레스테롤 섭취량의 평균을 구하여 대조군과 실험군의 식이 섭취량을 비교하고, 임상기간 중의 섭취량에 변화가 있는지를 살펴보기 위하여 0주와 6주의 각 군의 식이 섭취량을 Fig 86에 나타내었으며, 식이섭취 중 혈중지질 농도의 변화에 영향을 미치는 열량, 지질, 그리고 콜레스테롤의 섭취량을 Fig.86에 나타내어 실험기간 중 식이섭취가 비교적 잘 지켜졌음을 확인하고자 하였다. 하루 섭취한 열량은 약 1500~1900kcal 사이로 1일 영양권장량의 64~82%정도로 섭취하고 있어 다소 적게 섭취하는 편이었다. 특히 수용성 pill군의 열량 섭취정도가 다른 군에 비해 다소 낮았다. 탄수화물의 섭취는 총 열량의 약 60%를 차지하여 바람직하였으며 단백질 섭취량은 권장량

의 100%정도를 섭취하였으며 지방의 섭취량은 총 열량의 약 20% 수준으로 바람직하였다. 이에 비해 칼슘 섭취량은 1일 권장량의 약 48~66% 정도만 섭취하고 있어 성인들의 칼슘 섭취수준에 문제가 있음을 알 수 있었다. 각 군간의 영양소 섭취수준은 유사하였으나 수용성 pill군의 섭취가 다른 군에 비해 다소 낮았다. 임상 6주간의 식이섭취는 크게 변동이 없었으나 열량은 수용성 pill군이 다소 적게 섭취하였으나 각 군의 6주간의 변화는 없었고, 탄수화물은 수용성 pill군의 섭취량이 다소 적었으나, 각 군은 6주동안 비슷한 수준으로 섭취하였다. 지방의 섭취량은 수용성 pill군이 다소 낮았으나 각 군의 6주간의 변화는 없었으나 비수용성 pill군의 6주째 콜레스테롤 섭취량이 현저히 감소하였다. 단백질은 위약군의 섭취량이 6주후 다소 증가하였으나 수용성 pill군은 6주간 변화가 없었다. 칼슘의 섭취량은 6주로 갈수록 많이 섭취하였다. 총 식이섭취 섭취량은 위약군과 수용성 pill군이 6주간 다소 증가하였고 비수용성 pill군은 약간 감소한 편이었으며 이는 김치의 섭취량과 관계가 있는 것으로 생각된다. 김치섭취량을 살펴보면 위약군은 1일 평균 68.3g, 수용성 pill군은 43g, 비수용성 pill군은 47.2g을 섭취한 것으로 나타났고 이 수치들을 pill 섭취량으로 환산하여 섭취한 흰분량과 합하여 생각해보면, pill군은 수용성흰분 3.415g, 비수용성흰분 3.415g이 되며, 수용성 pill군은 수용성흰분 5.15g, 비수용성흰분 2.15g이 되고, 비수용성 pill군은 수용성흰분 2.36g, 비수용성흰분 5.36g을 섭취한 것으로 환산된다. 총콜레스테롤 섭취량은 위약군과 수용성 pill군은 6주간 다소 증가하였고 비수용성 pill군은 변화가 없었다.

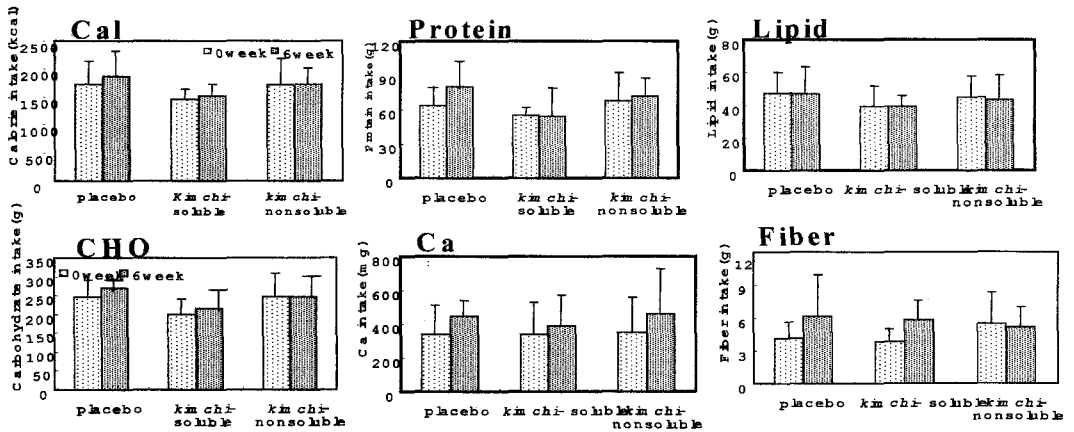


Fig. 86. Changes in amount of dietary intake during the 2nd clinical trial¹⁾

- 6) 혈중지질 농도의 저하에 미치는 영향
1차 실험에서 관찰된 김치의 혈중 중성지방질 감소효과 및 동맥경화 관련지수의 개

선효과가 김치의 어느 성분에 있는 지를 살펴보고자 김치를 수용성 획분과 비수용성 획분으로 나눈 다음 이를 동결건조하여 pill을 제조하고, 1차 실험과 동일한 방법으로 6주간의 임상실험을 실시하였다. 각군의 혈중 지질의 변화는 다음과 같이 살펴보았으며, 전체적인 변화는 Fig. 87에 나타내었다.

Table. 104 General information for human subject participated in the 2nd clinical trial

Placebo	Sex	Age	Height	Weight	Blood pressure	BMI	O.D	B.M %
1	f	30	160	45.5	122/57	17.8	86	28.3
2	f	45	163	57.1	130/66	21.5	102	29
3	f	32	164	52.6	110/62	19.6	93	25.1
4	m	28	167	65.8	123/75	23.6	110	18.7
5	m	49	171	79.9	137/93	27.3	126	26.1
6	m	35	178	82.2	115/67	25.6	115	19.9
M±SD		35.5±8.55	167.2±6.49	63.9±14.88	122.8±9.79/70±12.74	22.6±3.61	105.3±14.69	24.5±4.3
KSF								
1	f	40	163	64.6	168/98	24.3	116	26.6
2	f	41	161	55.3	110/71	21.3	102	29.2
3	f	31	166	56.5	121/72	20.5	96	27.5
4	m	45	173	74	139/85	24.7	113	28.2
5	m	42	177	71.9	146/81	23	103	21.2
6	m	32	175	77.6	118/81	25.3	115	24.1
M±SD		38.5±5.68	169.2±6.71	66.6±9.35	133.7±21.57/81.7±9.87	23.2±1.94	107.5±8.26	26.1±2.97
KNF								
1	f	38	156	52.7	115/73	21.7	106	31.4
2	f	34	158	65.6	121/75	26.3	128	36.1
3	f	36	162	64.2	136/72	24.5	117	31
4	m	43	172	71.3	123/71	24.1	111	22.7
5	m	48	174	75.5	128/75	24.9	114	22.7
6	m	49	167	78.9	135/94	28.3	132	25.6
7	m	43	166	77.5	104/65	28.1	132	25.1
M±SD		41.6±5.8	165±6.76	69.40±9.26	123.1±11.31/75±9.04	25.42.34	120±10.6	27.8±5.1

나. 중성지질 농도

김치 획분 pill의 섭취에 따른 중성지방질 data를 개인별 및 평균 변화율로 나타내었다(Fig. 87). 위약군의 중성지방질 농도는 83.7±32.1mg/dl에서 93.5±73.9 mg/dl로 약 6.0% 증가하였다. 수용성 pill군의 경우 115.3±52.0mg/dl에서 95.3±53.2mg/dl로 약 15.2% 감소하였으나 개인별 편차가 커서 유의성은 없었다. 수용성 pill에 비해 비수용성 pill군은 84.1±37.0mg/dl에서 78.7±23.4mg/dl로 약 5.3% 증가하였다. 본 실험의 실험 대상자의 평균 중성지방질 수준은 94.37mg/dl로 대부분이 정상이었다. 김치를 분획하여 제조한 pill을 섭취했던 결과 수용성 pill군의 중성지방질 농도가 저하되는 경향을 나타내고 비수용성 pill군은 0주와 6주의 각 평균치 변화는 감소하였으나 개개인의 6주간의 변화율을 고려하였을 때 오히려 증가하는 경향이 있었다. 에서 182.7mg/dl로 약 9.1%감소하였고, 비수용성 pill군은 약 1.5%의 미미한 감소를 보여 김치획분의 섭취에 따른 콜레스테롤 저하효과는 유의적이지 않았다(Fig. 87).

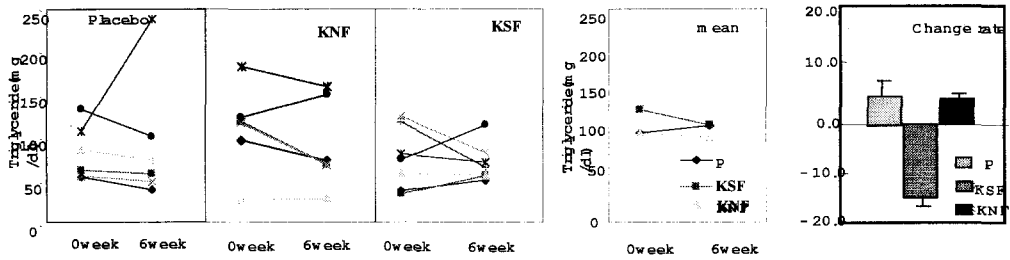


Fig. 87. Effects of baechu kimchi supplementation gives as a pill for 6 weeks on plasma triglyceride concentration.

다. 총 콜레스테롤

김치획분 pill의 섭취에 따른 총 콜레스테롤의 변화는 6주간의 섭취후 위약군은 총 콜레스테롤이 167.8mg/dL에서 155.7mg/dL로 약 7.3% 감소하였고, 수용성 pill군은 200.2mg/dL에서 182.7mg/dL로 약 9.1%감소하였고, 비수용성 pill군은 약 1.5%의 미미한 감소를 보여 김치획분의 섭취에 따른 콜레스테롤 저하효과는 유의적이지 않았다(Fig. 88).

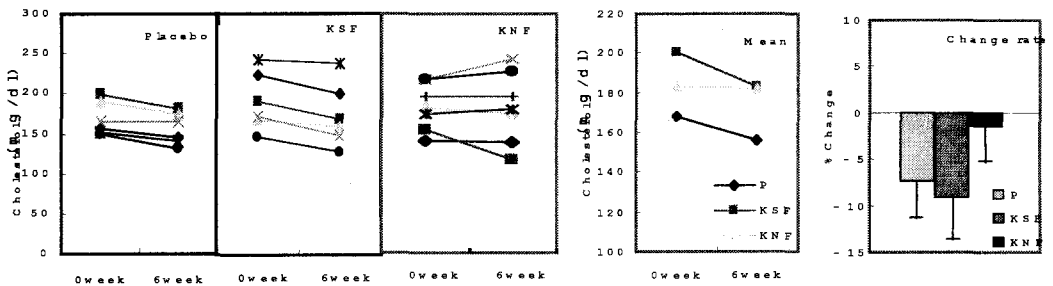


Fig. 88. Effects of baechu kimchi supplementation gives as a pill for 6 weeks on plasma cholesterol concentration.

라. HDL 콜레스테롤

김치 획분으로 제조한 pill의 섭취에 따른 HDL-C 농도의 변화는 위약군은 59mg/dL에서 52.7mg/dL로 약 10.6% 감소하였고, 수용성 pill군은 48.5mg/dL에서 45.5mg/dL로 약 6.1%감소하였으며, 비수용성 pill군은 47mg/dL에서 46.7mg/dL로 2.9%정도 증가하였다. 1차 실험에서는 김치 pill군의 HDL-C 농도가 약 11.7%정도 증가하였으나 2차

실험에서는 수용성 pill군에서는 HDL-C 농도가 오히려 감소하였고 비수용성 pill군에서 다소 증가하였다.

마. LDL 콜레스테롤

김치획분으로 제조한 pill의 섭취에 따른 LDL-C 농도의 변화는 위약군의 경우 92.1mg/dl에서 84.3mg/dl로 약 7.5% 감소하였고, 수용성 pill 섭취군의 경우 128.6mg/dl에서 118.1mg/dl로 약 9%의 감소를 나타내어(Fig. 89) 위약군과 수용성 pill군은 비슷한 수준으로 낮아졌으며, 비수용성 pill군은 거의 변화가 없었다. 위약군의 감소효과는 김치 섭취량이 다른 군에 비해 약 50% 정도 많았기 때문으로 생각된다.

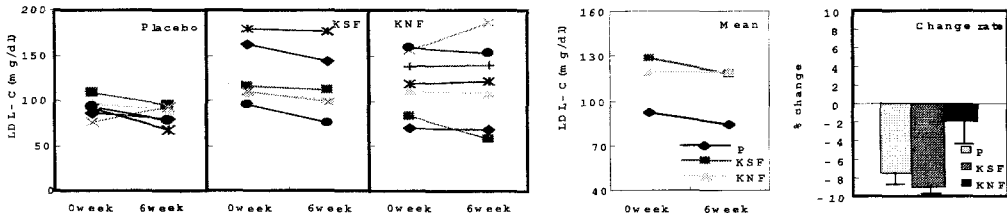


Fig. 89. Effects of baechu kimchi supplementation given as a pill for 6 weeks on plasma LDL concentration.

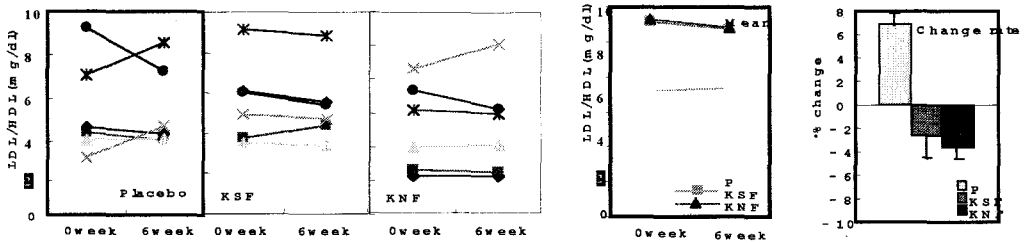


Fig. 90. Effects of baechu kimchi supplementation given as a pill for 6 weeks on plasma LDL/HDL concentration.

바. 동맥경화 관련지수

2차 실험에서 분석된 LDL-C과 HDL-C 농도 및 중성지방질 농도로부터 동맥 경화 관련지수를 살펴보았다. 혈액 중의 LDL-C/HDL-C 비는 심장마비 등의 심혈관계질환 발병의 지수로 사용되고 있다. LDL-C/HDL-C 비는 Fig. 90에서 보는 바와 같이 위약군이 가장 많이 높아진 반면 수용성 pill군과 비수용성 pill군은 각각 3.6%, 3.8% 낮아져서

유의적이지는 않았으나 동맥경화 예방효과가 있는 것으로 사료된다. 동맥경화지수는 위약군이 2.17에서 2.39로 13% 정도 증가하였고, 수용성 pill군은 3.3에서 3.2로 3.8%, 비수용성 pill군은 3.3에서 3.1로 3.2% 정도 감소하여(Fig. 91) 수용성 pill과 비수용성 pill 섭취에 따른 동맥경화지수의 변화는 작았으나 동맥경화지수를 낮추는 경향이었으므로 김치의 섭취로 동맥경화예방의 효과가 있는 것으로 사료된다.

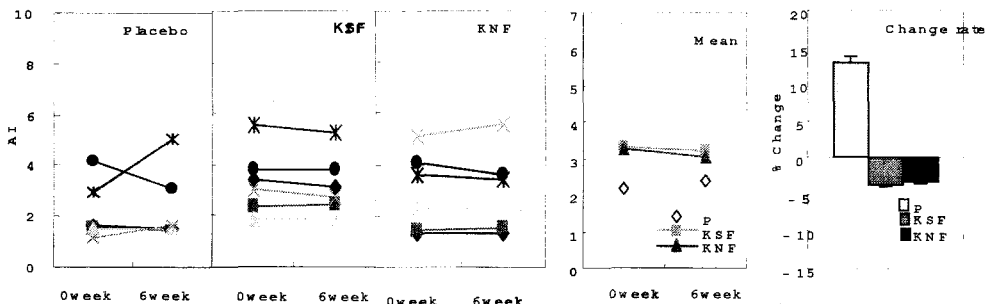


Fig. 91. Effects of baechu kimchi supplementation givens as a pill for 6 weeks on plasma Atherosclerosis Index.

사. 혈전 용해능에 미치는 영향

혈전용해능은 Table 105에서 보는 바와 같이 위약군이 0.082 ± 0.0060 unit에서 0.331 ± 0.1976 unit로 0.249unit만큼 증가하였고, 수용성 pill군은 0.031 ± 0.0165 unit에서 0.073 ± 0.0696 unit로 0.042unit의 변화량이 있어 혈전용해능이 미미하게 증가를 하였고, 비수용성 pill군은 0.056 ± 0.0242 unit에서 0.432 ± 0.3752 unit로 0.376unit의 증가를 보여 비수용성 pill섭취에 따른 현저한 혈전 용해능의 증가가 관찰되었다.

Table 105. Effects of korean cabbage kimchi supplementation on fibrinolytic activity after 6weeks of soluble or nonsoluble fraction kimchi pill

	0 week	6 week	change
Placebo	0.082 ± 0.0060	0.331 ± 0.1976	0.249
KSF	0.031 ± 0.0165	0.073 ± 0.0696	0.042
KNF	0.056 ± 0.0242	0.432 ± 0.3752	0.376

제 4 절 결론

배추김치에 동맥경화를 예방하는 효과가 있음을 *in vitro* 와 *in vivo*의 기초연구를 통하여 확인하였기에 김치의 동맥경화 예방성을 증진 할수 있으면서, 맛, 향미, 질감 등의 관능성이 우수한 기능성 배추김치를 제조하기 위한 연구를 실시하였다. 배추김치에 항산화성이 높은 것으로 알려진 갖잎을 비율을 달리하여 첨가한 배추갓김치를

담귀 발효 기간별로 관능검사와 항산화성을 실시하여 배추갓김치(30%)가 배추김치에 비해 항산화효과가 증가하고 관능적으로도 우수한 시료로 결정되었다. 이에 senescence accelerated mice(SAM, p-8)을 이용하여 1년간 동물실험을 한 결과, 대조군(김치를 첨가하지 않은군)과 배추김치군을 비교하였을 때 배추갓김치를 섭취하게 되면 혈장지질 농도 및 간조직의 지질이 저하되고, 콜레스테롤의 생합성 조절효소인 HMG-CoA 환원효소의 활성이 억제됨이 확인되었고, 이러한 효과를 임상실험에서 확인하기 위하여 김치를 pill로 만들어 하루에 3g씩(김치 30g에 해당) 섭취시켰을 때 쌀가루를 첨가한 위약군을 섭취한 사람에 비해 혈중 중성 지방을 떨어뜨리고, 고밀도지단백질을 높여 동맥경화지수를 낮추는 결과를 얻어 기능성 배추김치의 동맥경화 예방성을 동물실험 및 임상실험을 통하여 확인하였다. 그리고 대량으로 담근 배추갓김치를 pH 4.1-4.3사이에 도달하였을 때 대조군인 배추김치와 같이 소비자들의 기호도 조사를 실시하였을 때 맛, 외관 등에서 기호성이 우수하게 나타났으며, 이 배추김치에 동맥경화를 예방하는 과학적인 근거가 있으므로 사먹겠다고 대답 사람이 약 80%로 상품성이 높은 것으로 조사되었다.

제 5 절 참고문헌

1. Harman D : A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, **11**,298,(1956)
2. Ceromi, A. : Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am, Geriater. Soc.*, **33**, 626(1958)
3. Yoshikawa, M. and Hirai, S. : Lipid peroxide formulation in the brain of aging rats. *J. Gerontol.*, **22**. 162(1967)
4. Mededeev, ZhA. : Repetition of molecular- genetic information as a possible factor in evolutionary change in life span. *Experimental enrontology*, **7**,57(1967)
5. Hayflick, L. : Cell biology human aging. *Sci. Am.*, **242**,58(1980)
6. Prasad, K.N : Human Radiation Biology. ed. Harper and Row. New York(1987).
7. Olson, C. B : A review of why and how we age. : A defence of multifactorial aging. *Mec, Aging Dev.*, **41**,1(1987)
8. Harman D : The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**. 7124-7128 (1981)
9. Harman D : Free radical theory of aging , The Free radical disease. *Aging* **7**. 111-131(1984)
10. 김봉인, 강문정, 김명숙, 류지된, 김소용 : 피부과학, 형설출판사, P105 (1999)
11. 야스다 토시야끼, 황정원 : 피부 관리학, 미용을 위한 피부과학, 현문사, P116(1995)

12. Champion, R.H., Burton, J.L. and Ebling, F.J.G. : Textbook of dermatology blackwell scientific publication.(1992)
13. Komura, S., Yoshino, K., Kondo, K., and Yagi, K. : Lipidperoxide levels in the skin of the senescence-accelerated mouse. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 5, 255-260(1988)
14. Tomio, O., ritsuko, H., Kyoji, Y., Sadaaki, k., Kyoji., K., Nobuko, O. and kunio, Y: Deposition of lipofuscin and elastic fibers in the skin of the senescence-accelerated mouse, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 9, 177-177, (1990)
15. 양성렬, 최기호, 손세호, 안봉환, 이민화, 김영표: 흰쥐의 나이에 따른 피부 조직의 산화상태와 항산화 활성의 변화 ; 한국노화학회 제 2권 제 2호, 111-117(1992)
16. Sahu, A., Kalra, P.S., Crowley, W.R., and Karla, S.P. : Evidence that hypothalamic neuropeptide Y secretion decreases in aged male rats : implications for reproductive aging. *Endocrinology*, 122(5) : 2199-2203
17. 강현경 : Downregulation of telomerase by aging and oxidative stress in rat testis. 부산대학교 석사학위논문(1998)
18. 최영현, 최병태, 정해영, 조운복, 이원호 : 노화촉진 생쥐(SAM)정소에서 연령 증가에 따른 염색체 및 조직학적 변화에 관한 연구. *한국 노화학회지* 4, p46-50(1994)
19. Yuriko TAKADA, Nahoko OGATA, Hiroshi OHKUMA, Masanobu UYAMA : Age-related changes in the retinal pigment epithelium and brunch's membrane of the senescence accelerated mouse : *J. Clin. Electron Microscopy*, 24, 5-6(1991)
20. 이서래 : 김치의 맛과 영양. *식품과 영양*.
21. 유리나 : 김치 내 고춧가루 매운성분(캡사이신)의 면역 증강 및 항성인병 효과. *김치의 과학과 기술(부산대학교 김치연구소 제 2회 심포지움)* 1, 143.(1995)
22. Kawada, T., Hagigara, K., and Iwai, K. : Effect of capsaicin on lipid metabolism in rats fed diet. *J. Nutr*, 116, 1272(1986)
23. Wsrshafsky, S., Kamer, R.S. and Sivak, S. L. : Effect of garlic on total serum cholesterol : A meta-analysis, *Ann. Zntern. Med*, 119, 599-605 (1993)
24. 송영옥 : 김치 및 김치 부재료의 동맥경화 예방효과. *김치의 과학과 기술*, 부산대학교 김치연구소 제6회 심포지엄, p 5-7(1997)
25. 권명자 : 배추김치의 동맥경화 예방효과에 관한 연구. 부산대학교 대학원 박사학위 논문 (1998)
26. 황지원 : 김치의 용매획분이 토끼의 혈중 지질 조성에 미치는 영향. 부산대학교 대학원 석사학위 논문 (1999.2)
27. 김미정 : 김치 및 김치재료가 피브린 분해활성 및 면역세포 증식에 미치는 영

향, 부산대학교 석사학위논문 (1998)

28. 김현주: 배추김치의 용매 활성획분의 동맥경화 예방효과, 부산대학교 식품영양학과, 석사학위논문(2000)
29. 전해년 : 김치 획분이 콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼 장기의 지질 특성에 미치는 영향, 부산대학교 식품영양학과, 석사학위논문(2000)
30. 최선혜 : 김치 pill 섭취가 혈중 지질 농도에 미치는 영향, 부산대학교 식품영양학과, 석사학위논문(2000)
31. 최명원 : 배추김치 추출물의 in vivo 항암효과, 부산대학교 석사학위논문(1996)
32. 허영미 : 배추김치의 항돌연변이 및 항암효과, 부산대학교 석사학위논문(1996)
33. 류승희, 전영수, 권명자, 문정원, 이영순, 문갑순 : 김치 추출물의 활성산소에 대한 피부세포 독성완화효과. *한국식품영양과학회지*, **26(5)**, 814-821(1997)
34. 류승희, 전영수, 문정원, 이영순, 문갑순 : 김치 주·부재료의 활성산소에 대한 피부세포 독성완화 효과. *한국식품영양과학회지*. **26(6)** 998-1005(1997)
35. 류복미 : 김치식이가 Hairless Mouse의 피부노화 억제에 미치는 영향. 부산대학교 박사학위 논문 (2000)
36. 조은주: 배추김치의 표준화와 암예방 효과. 부산대학교 박사학위 논문 (1999)
37. 현운애 : 갓 김치의 담금법과 발효특성에 관한 연구 부산대학교 석사학위 논문 (2000)
38. 맛과 기능성 품질이 차별화된 명품김치의 개발, 부산대학교 김치연구소 (2000)
39. 신호선 : 식품분석이론과 실험. 신광출판사 91 (1983)
40. Whistler, R. L. and Wolform, M. L. : Methods in carbohydrate chemistry. *Academic press, New York*, p.383 (1962)

제9장 항노화 기능성 김치의 제조 및 산업화 연구

제 1 절 서설

제 5, 6, 7장의 기초 연구를 토대로 항노화 A형(AI 및 AII) 및 B형 기능성 김치의 레시피 및 담금공정을 확립하고 산업화에 대한 관련연구를 수행하였다. 이를 위하여 항노화항산화 기능성 김치의 제조방법 개선연구, 항노화 AI 갓김치1의 공정 개선연구, 항노화 피부미용증진 김치 개발, 항노화 AII형 갓김치의 최종 상품화 및 산업화 연구, 항노화 B형 김치(항동맥경화성 갓김치) 개발등의 일련의 연구를 수행하였다.

제 2 절 항노화 AI형 김치의 개발 및 산업화연구

1. 항노화항산화 기능성김치의 제조방법

가. 항산화기능성 김치의 공정개선연구

1) 갓김치 절임방법개선

항산화기능성 김치의 공정개선 연구중 갓김치 절임 방법에 따른 갓김치의 발효특징을 비교하기 위해 다듬은 갓을 염수법, 건염법으로 절이기 조작을 행하였다. 염수법은 갓 무게 2배의 10% 염수에 담겨서 절이고, 건염법은 갓 무게의 10%에 해당하는 양의 소금을 갓에 뿌려 절였다.

절단유무에 따른 발효 양상 비교를 위하여 갓을 3×4cm로 절단 후 염수법으로 절이거나 갓 채로 염수법으로 절이는 방법도 실험하였다.

또한 절임 후 탈수시간은 염수법으로 절인 다음 탈수를 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 달리하여 비교하였고, 절임 조건은 염수법으로 절임시 외기 및 수온을 5℃, 15℃로 온도를 달리하여 비교하였다. 절인 갓의 염도(예비실험 결과)는 $1.5 \pm 0.1\%$ 로 조정하였다.

2) 갓김치 담금방법 개선

절여진 갓에 양념을 버무려 Fig. 93과 같이 김치를 담겼다.

갓김치 담금에 사용된 양념비율은 Table 15(제5장)와 같고, 김치의 최종 염도는 $2.5 \pm 0.1\%$ (예비실험결과)로 하였다. 김치는 500g씩 플라스틱 용기에 담아 15℃에서 발효시켜 0, 2, 4, 6, 8일째에(2일간격으로) 발효속성에 관한 이화학 실험 및 관능검사를 실시하였다.

포장 갓김치의 유통특성을 살펴보기 위하여 Fig. 93과 같이 김치를 담겨 AI laminated film(PET 12 μ m/PE 20 μ m/AL 7 μ m/LLDPE 60 μ m)로 500g씩 밀봉·포장(가열접착 밀봉기, Laboratory heat sealer, 12ASL/1, 한국)하였다. 공장 김치의 유통과정과 동일한 조건을 맞추기 위하여 0℃에서 하루 둔 뒤 0, 5, 10 그리고 15℃에서 발효시켜 0℃, 5℃ 포장 김치는 5일째마다, 10℃, 15℃에 저장된 포장김치는 2일마다 꺼내 이

화학 실험 및 관능검사를 실시하였다.

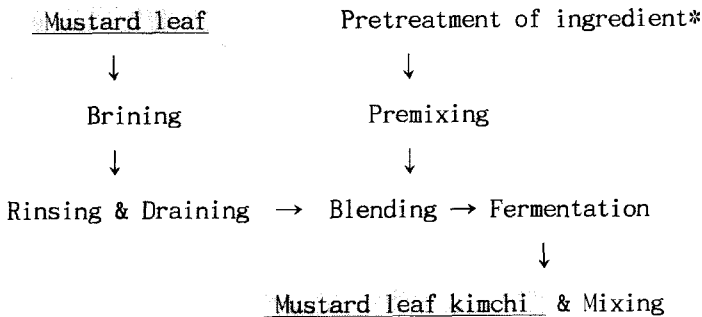


Fig. 93. Scheme of preparation of mustard leaf kimchi (*other minor raw materials)

나. 항노화 AI형 갓김치의 맛과 품질개선

1) 염 농도의 조정

항노화 기능성 갓김치의 맛과 품질개선을 위해 먼저 염 농도에 따른 갓김치의 발효양상을 비교하여 적정 염 농도를 결정하기 위한 실험을 행하였다. 기존의 갓김치는 고춧가루, 젓갈 등의 양념이 많은 현대인이 즐기기에 다소 짠 김치인데 그 염도는 $3.5 \pm 0.1\%$ 이므로 이를 기준으로 갓김치 최종 염도를 3.5%, 3.0%, 2.5%가 되도록 여러 차례 관능을 실시하여 기본 recipe를 결정한 후 김치를 제조하여 15°C에서 발효시키면서 발효 양상을 비교하였다. 기본 recipe는 5장의 Table 15와 같다. 그 결과 pH는 염 농도가 가장 높은 3.5%인 갓김치 군이 발효 전기간동안 가장 높았으며 다음은 3.0%군, 2.5%군이였다. 산도의 변화에서는 2.5%군이 산도가 가장 높게 올라갔으며 다음은 3.0%, 3.5%군이였으므로 염 농도가 높을수록 발효가 약간 지연되는 것을 알 수 있다.

세 군의 갓김치들을 적숙기에 관능검사를 실시한 결과 염 농도 3.5%로 담근 갓김치는 풋내, 짠맛, 덜 익은 맛, 질겅함에서 높은 점수를 얻었고 2.5%의 갓김치는 신내 및 신맛에서 높은 점수를 얻어 pH와 산도에서와 같이 낮은 염도의 김치가 발효가 빨리 되는 것을 알 수 있다. 종합적인 평가에서는 3.0%의 갓김치가 가장 높은 점수를 얻어 갓김치 최종 염 농도를 3.0%로 조정하는 것이 적당하다고 보여진다(Fig.94).

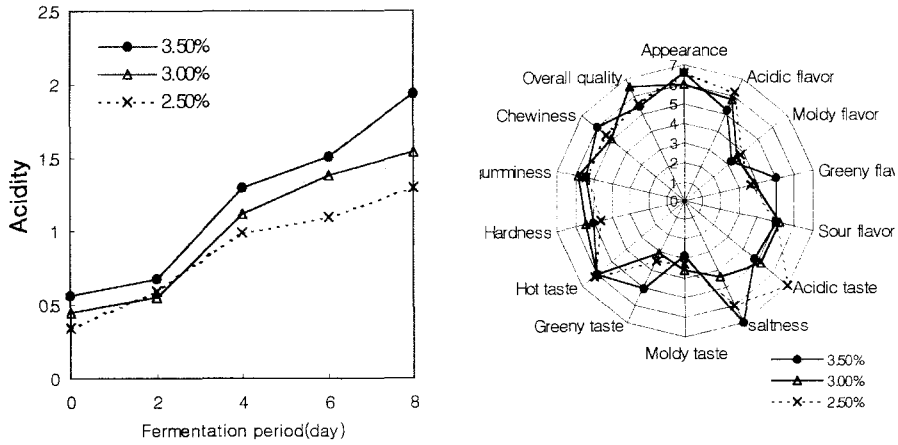


Fig.94 . 염 농도를 달리한 갓김치 발효 양상 및 관능검사 결과

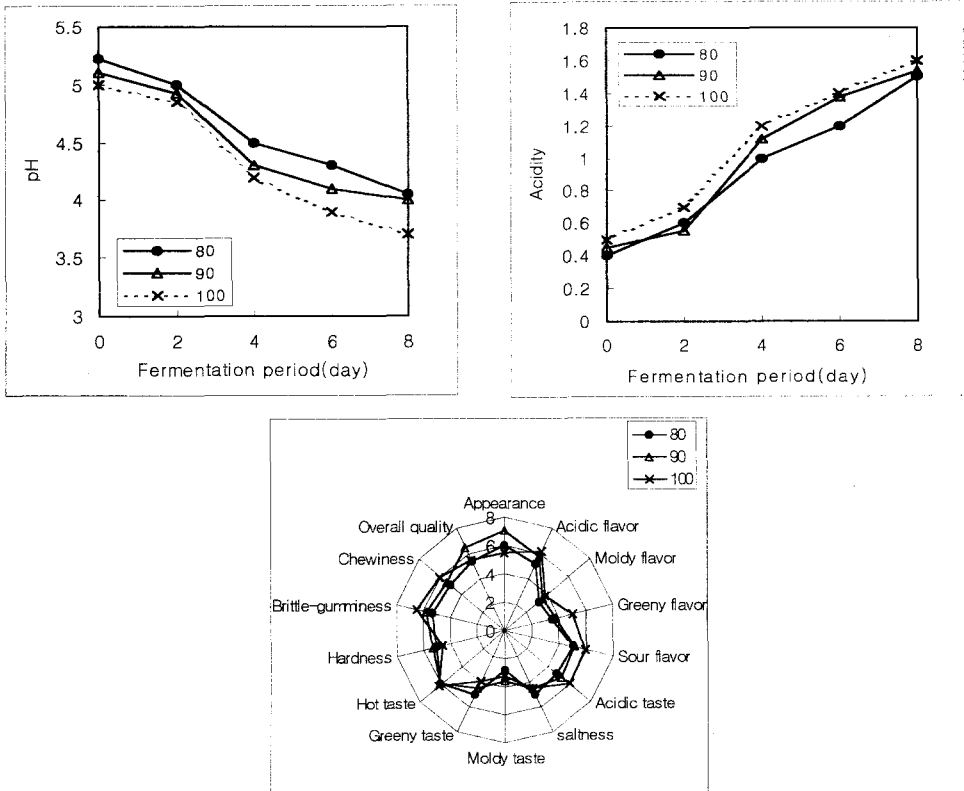


Fig.95. 고춧가루 조합량을 달리한 갓김치 발효양상 및 관능검사 결과

2) 고춧가루 조합량 조정

갓김치의 외관 및 맛을 크게 좌우하는 고춧가루의 적당한 조합량을 조정하기 위해 고춧가루의 양에 따른 갓김치의 발효양상을 비교하였다. 기본 recipe에서 고춧가루 조합량을 절인 갓 1000에 대해 80, 90, 100으로 달리하여 김치를 담궈 15℃에서 발효시켜 발효 양상 및 관능검사 결과를 비교한 결과 pH는 고춧가루 양이 많아짐에 따라 급속히 낮아짐을 알 수 있었고 산도도 고춧가루 양에 따라 증가하였다. 적숙기(담금 4일째) 관능검사 결과 외관에 있어 고춧가루가 가장 많은 100을 넣은 갓김치 군에서 가장 낮은 결과를 보였으며 또 신내, 신맛, 아삭아삭함에서는 높은 점수를 얻었다. 종합적인 평가에서는 90을 넣은 갓김치 군이 가장 높은 점수를 얻었고 외관도 좋은 점수를 얻었으므로 갓김치 양념 조합시 절인 갓 1000에 대해 90을 넣는 것이 적당하다고 할 수 있다(Fig. 95)

3) 젓갈류(멸치젓) 조합량 조정

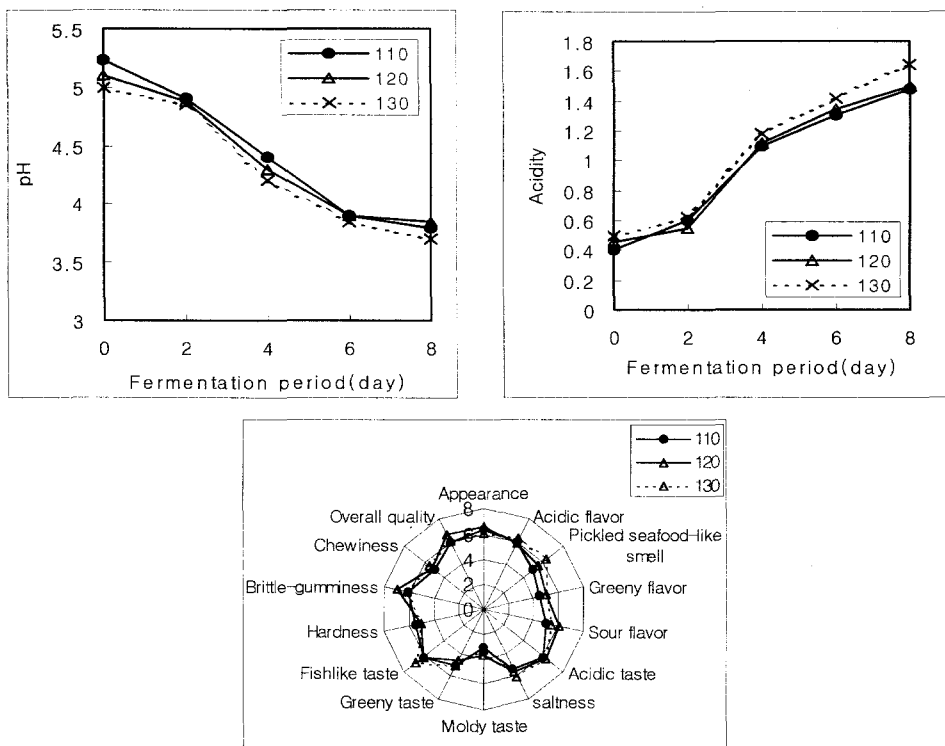


Fig. 96 .젓갈의 조합량을 달리한 갓김치 발효양상 및 관능검사 결과

갓김치의 풍미를 좌우하며 갓김치 담금에서 주로 사용하는 멸치젓의 조합량에 따른

갓김치 발효양상 및 관능 검사 결과를 비교하여 적정 조합량을 결정하기 위해 기본 갓김치 recipe에 멸치젓의 조합량만을 달리하여 김치를 담궈 15℃에서 발효시켜 실험에 이용하였다. 멸치젓 조합을 절인 갓 1000에 대해 110, 120, 130으로 그 함량을 달리하여 발효양상을 비교한 결과 pH 및 산도는 세 군의 갓김치에서 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 발효후기에 젓갈이 가장 많은 절인 갓 1000에 대해 130이 들어간 군에서 산도가 두 군보다 약간 높아짐을 볼 수 있다(Fig. 96). 적숙기(4일째)에 실시한 관능 검사의 결과 젓갈의 조합이 높을수록 젓갈내와 비린맛에서 높은 점수를 얻었고 아삭아삭함과 새콤한 내, 종합적인 평가에서는 120을 넣은 갓김치 군이 높았으므로 갓김치 담금시 갓 1000에 멸치젓 120 으로 멸치젓을 넣는 것이 추천할 만하다.

2. 항산화 AI형 갓김치의 공정개선 연구

가. 주재료의 전처리에 의한 절임 비교

갓김치 절임 시 전처리 과정에서 갓을 통째로 절이거나 썰어 절임에 따른 절임 과정과 발효양상을 비교하기 위해 갓을 3×4cm로 절단 후 또는 통째로 염수법으로 절였다. 절임 시간은 절단하여 절이는 것이 30분만에 절여져 통째로 절이는 방법(40분)이 10분 늦게 절여졌으며 이렇게 절인 갓으로 김치를 담궈 발효양상 및 관능검사의 비교는 다음과 같다(Fig.97) 절단하여 절여 담근 갓김치가 통째 절여 담근 갓김치에 비해 급속히 pH는 저하하였고 산도는 높아지므로 절단 후 절여 담근 갓김치가 발효가 빨리 진행됨을 알 수 있다. *Leuconostoc sp.*의 수는 두 군이 비슷하나 *Lactobacillus sp.*는 발효후기에 절단 후 절여 담근 갓김치가 훨씬 그 수가 많아졌으며 환원당 함량은 절단 후 담근 갓김치가 적었다. 관능검사 결과 절단 후 담근 갓김치가 신내, 새콤한 내, 신맛, 질깃함에서 유의적으로 높은 점수를 얻었으며 종합적인 평가에서도 통째 절여 담근 갓김치 보다 우위인 것으로 보아 갓김치의 산업화에서 김치를 담고 차리는 데 편리한 방안으로 통째 절여 담는 기존의 방법과 달리 절단하여 담그는 것을 추천할 만하다.

나. 절임방법개선

갓김치 절임 시 염수법과 건염법과 같은 절임 방법에 따른 갓김치의 발효 과정 중 그 특징을 비교하기 위해 염수법과 건염법으로 절인 갓으로 김치를 담궈 15℃에서 0, 2, 4, 6, 8일간 발효시켜 실험에 사용하였다. 외관상 염수법으로 절인 갓이 균일하게 절여졌으며 염수법 및 건염법으로 절여 담근 갓김치 두 군 모두 4~6일째에 pH 4.4~4.8, 산도 0.6~1.0%로 나타났다. pH는 두 절임 방법에 차이가 없었고, 산도의 경우 염수법으로 절여 담근 갓김치가 발효 과정 중 약간 낮았다(Fig. 98)

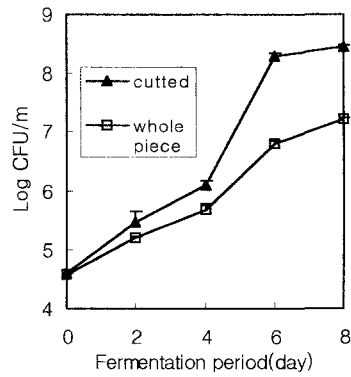
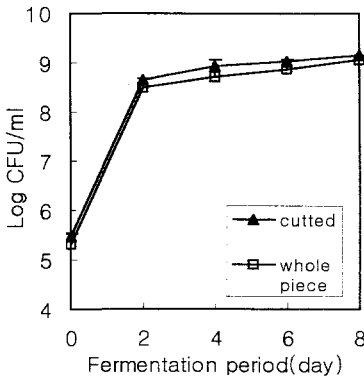
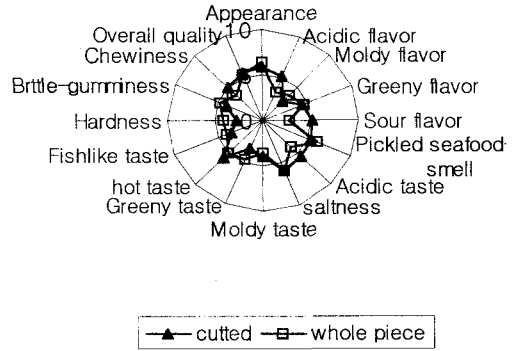
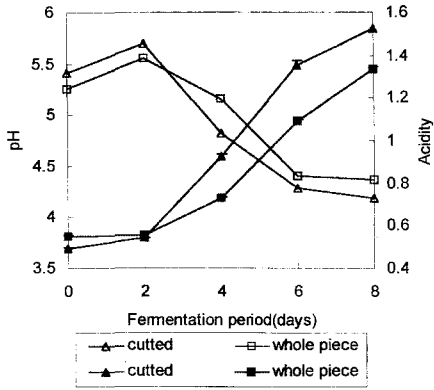


Fig. 97 주재료의 전처리에 의한 갓김치의 숙성중 pH, 산도, 관능검사, *Leuconostoc* sp. 및 *Lactobacillus* sp. 변화

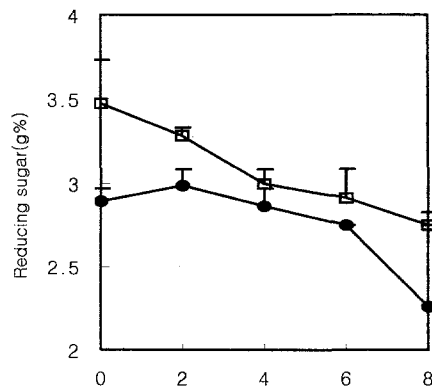
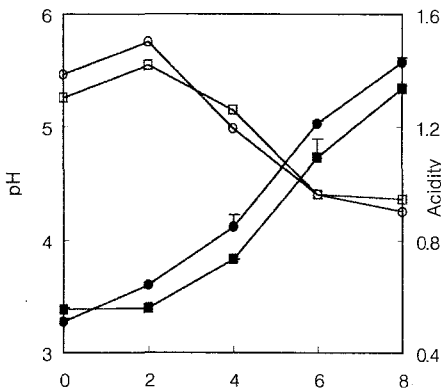


Fig. 98. Changes of pH, acidity, reducing sugar in mustard leaf kimchi prepared with different brining methods during fermentation at 15°C. ●, ○ : brine with salt ■, □ : brine with salt soln.

두 군의 환원당 함량 4일째 김치의 경우 염수법(2.99 g%), 건염법(2.86 g%)의 순으로 전체적으로 염수법의 환원당 함량이 높았다. 이는 깍두기 발효중 염수법, 절이지 않는 방법, 건염법의 순으로 환원당 함량이 높았다. 젖산균수를 측정하였을 때 김치 발효 초기에 관여하는 *Leuconostoc sp.*는 발효초기엔 두 군이 비슷한 경향을 보이다가 발효후기에, 발효후기에 관여하는 *Lactobacillus sp.*는 발효초기에 염수법에서 낮은 경향을 보였다.

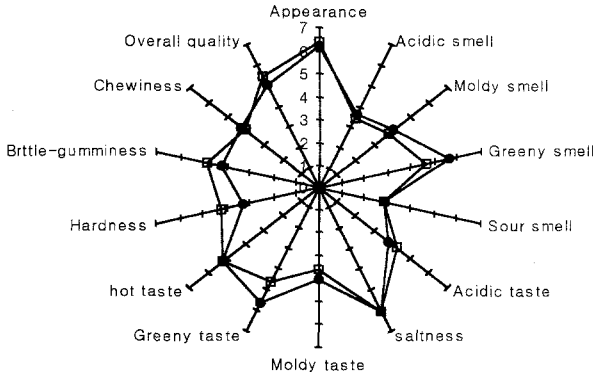


Fig. 99. QDA profile of mustard leaf kimchi prepared with different brining methods after 4days at 15°C. ● : brine with salt □ : brine with salt soln.

김치의 품질에 영향을 미치는 주요 인자는 맛, 냄새, 조직감 그리고 외관상 결보기 등으로, 염수법과 건염법으로 담근 갓김치의 관능검사 결과 담금 후 4일째에서 풋내와 덜익은 맛에서 건염법이 높은 점수를 얻었고, 종합적인 평가와 아삭아삭함은 염수법이 높은 점수를 얻었다(Fig. 99)

이와 같은 결과를 볼 때 갓김치 절임은 균일하게 절여지고 관능 특성에서도 좋은 점수를 얻는 염수법으로 절임이 건염법보다 더 적당한 것으로 나타났으며 갓김치 산업화를 위해서도 외관상 골고루 절여지며 많은 양을 간편히 절일 수 있는 염수법이 추천할 만하다는 결론을 얻을 수 있었다.

다. 갓김치 절임온도 개선

갓 절임 시 온도를 달리하였을 때 갓김치 발효의 특징을 살펴보기 위해 5°C, 15°C의 염수에 갓을 절여 김치를 담근 후 15°C에서 0, 2, 4, 6, 8일의 발효양상을 비교하였다. 관능적으로 가장 적절하다고 평가된 절임갓의 염도가 1.5±0.1%에 도달하는 시간은 5°C(50분)가 15°C(40분)보다 더 오래 걸렸다. 절임 시간이 길어질수록 절임 초

기에 비교적 빠르게 증가하던 염절임 속도는 차츰 그 증가 속도가 완만해졌다. pH와 산도의 변화는 발효초기엔 5℃에서 절여 담근 갓김치가 pH에서 15℃보다 더 낮았고, 산도도 5℃가 더 높았으나 발효 중반을 지나서는 비슷해지는 결과를 보였다(Fig. 100). *Leuconostoc sp.*와 *Lactobacillus sp.*의 변화는 발효 전과정 동안 5℃, 15℃ 두 군이 모두 비슷한 양상을 보였다. 환원당 함량은 5℃에서 절인 후 담근 갓김치가 급속히 저하하였으나 8일째에는 함량이 비슷해졌다. 관능 검사 결과 새콤한 내, 젓갈 내, 신맛, 아삭아삭 함 및 종합적인 평가에서 높은 점수를 얻어 5℃에서 절임이 갓김치에서 갓의 절임 조건으로 더 적당한 것으로 보인다. (Fig. 101)

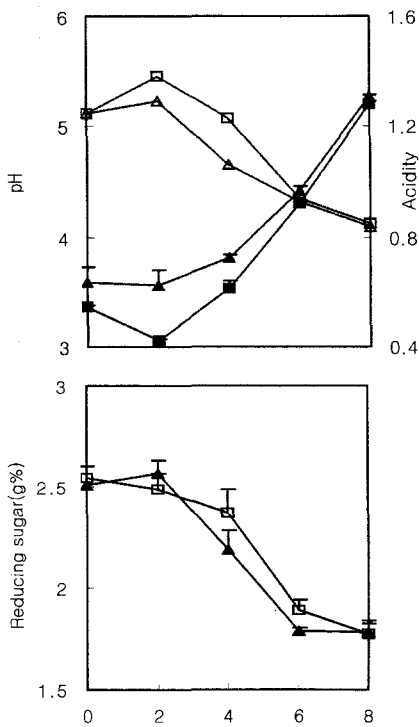


Fig. 100. Changes of pH, acidity, reducing sugar in mustard leaf kimchi prepared with different brining temperature during fermentation at 15°C. ▲, △ : 5°C ■, □ : 15°C

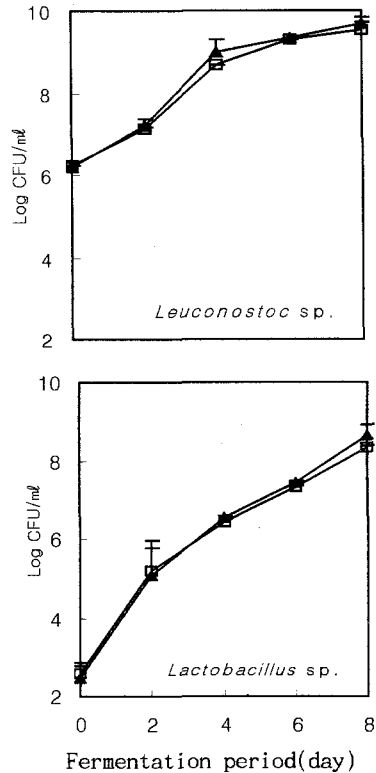


Fig. 101. Changes of *Leuconostoc sp.* and *Lactobacillus sp.* in mustard leaf kimchi prepared with different brining temperature during fermentation at 15°C. ▲ : 5°C □ : 15°C

라. 절임 후 탈수시간 비교

절임 후 탈수 시간에 따른 갓김치의 발효양상을 비교하기 위해 갓을 10% 염수로 절인 후 물빼는 시간을 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 달리하여 탈수한 후 김치를 담귀 발효시켜 적속기에 꺼내 실험한 결과에서 탈수 시간에 따른 갓김치의 특성 차이는 Fig. 25, 26과 같다. 물빼는 시간이 길어질수록 김치액은 줄었으며 색도에도 영향을 주어 3시간째에는 Lightness가 낮아져 김치 색깔이 어두워짐을 볼 수 있다. 환원당 함량에서는 탈수 시간이 길어질수록 약간씩 함량이 줄어들었으며, 갓김치 조직감은 탈수시간에 따라 Puncture, Cutting test 모두 결과가 높아지는 것으로 나타나 탈수 시간이 길어짐에 따라 질겨짐을 알 수 있었다. 황은 탈수시간이 증가함에 따라 Lightness가 감소하고 Reducing sugar가 증가하는 것으로 보고하여 본 실험과 유사한 경향을 보였다. 따라서 갓의 절임 후 탈수 시간은 30분에서 1시간 이내가 가장 적당하며 오래 탈수하면 김치가 질겨지고 색깔도 좋지 못하며 김치액이 적어 외관도 좋지 못함을 알 수 있다.

마. 포장에 따른 발효 양상

산업화에 따른 포장 갓김치의 유통 시 발효 양상의 비교를 위해 갓을 절단하여(3×4cm) 김치를 담근 후 Al laminated film(PET 12 μ m/PE 20 μ m/AL 7 μ m/LLDPE 60 μ m)을 14.7 × 21.5cm 크기로 sealing하여(Laboratory heat sealer, 12ASL/1) 제작한 포장지에 500g씩 넣어 0℃에서 하루를 둔 후 0℃, 5℃, 10℃, 15℃에서 발효시켰다. 0℃, 5℃에서 발효시키는 김치는 50일간 발효시키면서 5일마다 실험하였고 10℃, 15℃의 김치는 2일 마다 꺼내어 20일간 실험에 사용하였으며 그 결과 pH는 15℃의 김치는 발효 2일째부터 급속히 떨어졌으나 10℃는 6일 이후부터, 5℃의 김치는 25일, 0℃의 김치는 35일 이후부터 떨어지기 시작하였다. 10℃와 15℃에서 발효시키는 김치는 8일과 4일 후부터는 pH 하락이 완만해졌으나 5℃, 0℃에서 발효시킨 김치는 50일까지 하락 곡선을 나타냈다(Fig. 102). 산도 역시 15℃에서 발효시킨 김치가 가장 빨리 증가하였고 그 순서는 15℃ > 10℃ > 5℃ > 0℃이었다. 전반적으로 pH는 발효초기에 거의 일정하다가 급속히 감소한 후 다시 완만해지는 경향을 나타내었고 산도는 pH와 반대로 점차 증가하다가 완만해지는 S자형 곡선 양상을 나타내는 것은 홍등과 신등의 보고와 유사했으나 적속기에 도달하는 시간은 훨씬 길어 갓김치의 저장성이 우수함을 알 수 있다. 젖산균 수의 변화는 *Leuconostoc sp.* 는 10℃, 15℃에서 발효시킨 김치균은 4일째까지 증가하다가 4일 이후로 감소하는 경향을 보이며 0℃, 5℃균의 변화는 20일까지 그 수가 비슷하다가 그 이후부터 5℃가 더 많았다(Fig.102). *Lactobacillus sp.* 의 변화는 10℃, 15℃에서 발효시킨 갓김치 균은 8일째까지는 15℃에서 발효시킨 균의 수가 더 많았으나 그 이후로는 비슷했으며, 0℃, 5℃에서 발효시킨 김치 균들은 10일까지는 비슷하다가 그 이후부터 현저히 5℃균이 그 수가 많이 증가하였다.

본 실험의 결과, 각 온도별 최적의 가식기간을 결정할 수가 있었는데 15℃의 김치

는 4~6일, 10℃는 8~12일, 5℃는 40~50일 그리고 0℃는 50일 이상에서 나타났다.

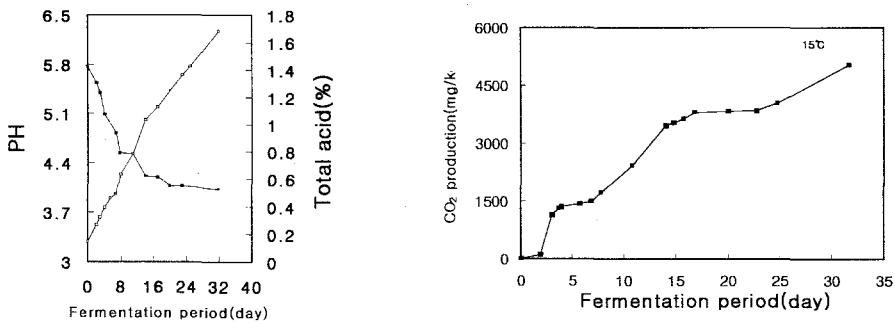


Fig. 102. 병 포장한 갓김치의 발효기간 중 pH, 총산, CO₂ 농도 변화

제 3 절 향노화 AII 형 갓김치 개발 및 산업화연구

1. 향노화 AII형 갓김치의 피부 미용성 증진 김치 개발

가. 향노화 AII형 갓김치의 피부 미용성 증진을 위한 부재료 조정연구

1) 갓김치의 피부 미용성 증진을 위한 부재료 선정

갓김치 중에는 carotenoids와 비타민 C, 페놀화합물 등과 같은 항산화 물질과 피부에 유용한 무기질 등이 다른 김치에 비해 많이 함유되어 있는 것으로 앞선 실험결과에 의해 나타났다. 따라서 갓김치에 피부미용 성분이 높은 부재료를 첨가함으로써 가능성이 향상된 갓김치를 개발하고자 여러 문헌조사를 실시하였다. 피부미용에 좋은 식품으로 1차적으로 선정된 식품은 호두, 울무, 매실, 오이, 파래, 당근, 피망, 알로에, 다시마, 달래, 녹차, 붉은고추, 늙은호박 등이었다. 이들에 관한 선연구로 식품의약품 안전청 식품 평가부에서 나온 「다류 소재 식물류 중의 항산화 물질 함량 분석」에서 여러 식품 중 선정 식품에 대한 항산화성 물질의 양을 조사하였다(Table 106). 이 자료에서는 식물간 항산화성을 알아보기 위해서 총페놀성 물질, 비타민 C 함량, β -carotene, α -tocopherol, Se함량 등을 보고하였는데 일반적으로 페놀성 물질은 생체내에서 암 발생을 저하시키고, 산화 방지 효과가 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 셀레늄의 높은 섭취는 심장질환 등의 질병을 예방하며 항산화, 항암, 노화 예방 등에 효과가 있는 것으로 보고되어지고 있으며 비타민 C, β -carotene, α -tocopherol도 항산화, 항암, 심장질환 예방 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들의 함량을 조사함으로써 각 재료간의 항산화성을 비교하였다. 그 결과 시료 100g당 들어있는 총페놀성 물질 함량은 녹차가 가장 높았고, 그 다음으로 호두

였으며 β -carotene과 α -tocopherol, 비타민 C 모두 녹차가 가장 높게 나타났다. 다 시마도 β -carotene과 비타민 C의 함량이 높았다. 그리고 늙은호박에는 황색을 나타 내는 carotenoids 화합물이 다량 존재한다는 것은 잘 알려진 사실로 다양한 약리효과 를 가지는 것으로 보고되어 있다. 또한 녹차의 항산화성도 여러 문헌에서 많은 연구 보고가 있는데 특히 polyphenol류를 다량 함유하고 있어 강한 항산화력을 나타낸다. 나머지 선정된 부재료에 대한 항산화성분 물질의 함량은 「한국인 영양 권장량」 7차 개정안(2000년)에서 수분, β -carotene, 비타민 C, α -tocopherol의 양을 참조하였으며, 셀레늄은 「식품성분표」 5차 개정판(1996년)을 기준으로 하였다(Table 107). β -carotene은 당근과 붉은고추에서 가장 많았고, α -tocopherol은 늙은호박에서 다른 식품에 비해 월등히 높게 나타났다. 비타민 C는 피망, 붉은고추에서 가장 함유량이 높았다. 따라서 갓김치의 기능성 증진 부재료는 비교적 항산화성 물질의 함량이 높은 녹차와 늙은호박, 당근, 붉은고추로 결정하였다.

Table 106. Contents of total phenolics, moisture, β -carotene, α -tocopherol, vitamin C and selenium in various foods (per 100g)

	Total phenolics ¹⁾ (g)	Moisture (g)	β -carotene ¹⁾ (μ g)	α -tocopherol ¹⁾ (mg)	Vitamin C ¹⁾ (mg)	Se ¹⁾ (μ g)
Green tea	6.88	7.07	3651.99	15.74	199.46	ND ²⁾
Kelp	0.07	12.13	897.87	0.35	27.05	ND
Walnut	1.10	3.05	ND	0.96	0.23	ND
Job's-tears	0.02	11.82	ND	ND	0.15	ND

¹⁾Contents of total phenolics, β -carotene, α -tocopherol, vitamin C and selenium were corrected in the dry basis.

²⁾ND : Not detected.

Table 107. Contents of total phenolics, moisture, β -carotene, α -tocopherol, vitamin C and selenium in various foods (per 100g)

	Moisture ¹⁾ (g)	β -carotene ¹⁾ (μ g)	α -tocopherol ¹⁾ (mg)	Vitamin C ¹⁾ (mg)	Se ²⁾ (μ g)
Pumkin	91.00 ³⁾	712.00	47.90	15.00	ND ⁴⁾
Carrot	89.60	7,540.00	0.40	6.00	2.20
Red pepper	84.60	6,466.00	0.69	116.00	0.70
Cucumber	96.30	181.00	0.50	10.00	0.30
Sea lettuce	89.50	2,244.00	1.00	13.00	ND
Red sweet pepper	91.70	2,336.00	0.90	191.00	ND
Wild garlic	89.60	1,823.00	0.40	33.00	ND
Japanese apricot	90.50	123.00	0.89	6.00	ND

¹⁾From Recommended Dietary Allowances for Koreans, 7th Revision, 2000.

²⁾From Food Composition Table, 5th Revision, 1996.

³⁾All various foods were the raw basis.

⁴⁾ND : Not detected.

2) 갓김치의 피부 미용성 증진을 위한 부재료 첨가방법 및 혼합비율

가) 부재료 첨가방법

갓김치에 들어가는 부재료인 늙은호박은 내부씨와 껍질을 제거하고 4~5cm로 썰어 동결건조한 후 막자사발에서 곱게 간 것을 사용하였다. 녹차도 기능성 성분의 파괴를 최소화하기 위한 방법으로 동결건조법을 이용하여 건조한 후 곱게 간 것을 사용하였다.

나) 부재료 혼합비율

본 실험에 앞서 늙은호박분말과 녹차분말의 첨가비를 결정하기 위해 훈련된 관능요원 12명을 대상으로 각각의 분말을 0.5%, 1%, 2% 비율로 첨가한 갓김치를 이점순위검사(Friedman 분석)를 통해 종합적 평가에 대한 특성을 대조군과 비교하여 그 결과를 통해 녹차 및 늙은호박분말의 첨가비를 수정하여 다시 반복된 랜덤화 완전 블록 계획법으로 묘사분석을 실시하였다. 그 결과 녹차분말의 첨가비가 많을수록 외관 및 향미에서 낮은 점수를 얻었으며, 늙은호박분말의 양이 증가할수록 초기에는 대조군보다 높은 점수를 나타내다가 빠른 속성으로 신미가 많이 증가하여 적숙기 이후에는 대조군보다 낮은 관능점수를 나타내었다. 따라서 이들 부재료의 첨가비는 0.5%이하로 결정되었으며, 각각의 실험군은 갓김치에 늙은호박분말 0.5%첨가군, 녹차분말 0.5%첨가군, 늙은호박분말과 녹차분말을 각각 0.4%:0.1%와 0.3%:0.2%첨가군으로 결정하여 대조군과 함께 총 5개의 실험군으로 하여 실험을 행하였다.

3) 항노화 A II형 갓김치의 표준 재료배합비 및 담금공정

가) 항노화 A II형 갓김치 표준 재료배합비

먼저 갓김치 담금법 연구를 위해 전통적인 전라도식 갓김치와 문헌에 나타나 있는 갓김치를 분석하여 이를 기준으로 새로운 재료 배합비를 구하였으며, 젓갈을 달리한 갓김치의 발효양상도 비교하였다. 또한 전라도 지방과 문헌의 담금법 및 새로 수정된 담금법 등으로 갓김치를 제조하여 담금법에 따른 발효양상과 주요 성분의 변화를 연구한 선행 연구 결과를 이용하여 표준 담금법을 정하였고 그 재료 배합비는 다음과 같다.

Table 108. Ingredients ratio of mustard leaf kimchi

Ingredients	Amount (g)
Mustard leaf	1000
Garlic	30
Ginger	15
Green onion	55
Red pepper powder	39
Pear	225
Roasted sesame	3
Glutinous rice paste	80
Fermented anchovy juice	26
Fermented shrimp	26
Shredded red pepper	little

나) 항노화 AII형 갓김치 담금 공정

담금과정을 보면, 갓은 절단하지 않고 그대로 사용하여 10% 소금물에 50분간 절이고 갓의 2배의 물에서 세척한 후 탈수는 30분에서 1시간 이내로 하였다. 양념으로 첨가하는 붉은고추는 잘게 다지고, 당근은 채쳐서 준비하며 녹차 및 늙은호박을 분말로 첨가하므로 찹쌀풀은 물과 찹쌀가루의 비가 10:1로 혼합하여 묽게하고 배도 즙을 사용하여 양념이 너무 되어 마르지 않도록 하였다. 혼합한 양념의 최종단계에서 늙은호박분말과 녹차분말을 비율대로 첨가하여 갓과 함께 버무리고 500g짜리 파인트자에 300g씩 정확히 칭량하여 담은 후 5℃에서 60일간 저장하였다.

4) 항노화 A II형 갓김치의 부재료 첨가에 따른 피부미용 성분 함량

김치 속에 피부미용 증진작용이 있다고 알려져 있는 chlorophyll, 페놀화합물, 비타민 C, carotenoids 등의 성분과 피부와 관련이 있는 무기질의 함량을 측정하였다.

가) Chlorophyll 함량

부재료 첨가를 달리한 갓김치의 chlorophyll 함유량을 보면 대조군이 35.57mg%으로 가장 낮는데 비해 늙은호박분말 0.5% 첨가군이 47.30mg%이고 늙은호박분말과 녹차분말을 각각 0.4%:0.1%와 0.3%:0.2%비로 첨가한 군은 51.61mg%, 58.81mg%이었으며, 녹차분말 0.5% 첨가군은 69.46mg%로 chlorophyll 함량의 변화는 녹차의 첨가 비율이 높을수록 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Preparation of mustard leaf *kimchi*

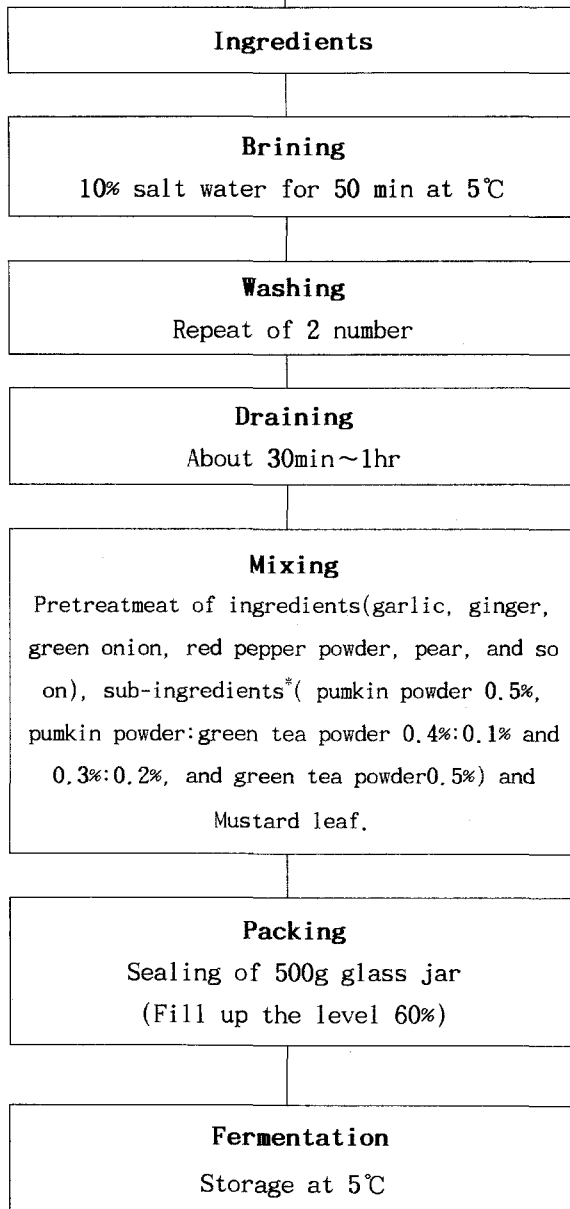


Fig. 103. Scheme of preparation sub-ingredient added mustard leaf kimchi.

*Control : mustard leaf kimchi, P : pumkin powder(0.5%) added mustard leaf kimchi,

PG I : pumkin powder:green tea powder(0.4%:0.1%) added mustard leaf kimchi,

PG II : pumkin powder:green tea powder(0.3%:0.2%) added mustard leaf kimchi,

G : green tea powder(0.5%) added mustard leaf kimchi. (Total sample number: 5)

Chlorophyll 및 그 유도체들은 빛이 존재할 때는 감광체(photosensitizer)로 작용하여 안정한 triplet oxygen (3O_2)로부터 singlet oxygen(1O_2)을 생성한다. Singlet oxygen은 불포화지방산의 이중결합에 위치한 탄소와 반응하여 과산화물을 생성시키며 이 과산물은 분해되어 유리기에 의한 자동산화가 시작된다. 이러한 감광체로서의 작용은 pheophorbides, pheophytins, chlorophyll의 순으로 높으며 온도가 높을수록 prooxidant로서의 역할은 증가한다고 한다. 반면에, 광선이 차단된 상태에서는 chlorophylls과 pheophytins는 methylinoleate의 자동산화에서 항산화효과를 보였다고 보고하였다. Chlorophylls는 hydroperoxide가 형성되기 전 자동 산화의 초기 단계에서 생성된 유리기와 반응하며 올리브유에 chlorophyll을 첨가하면 산화초기 peroxide 생성률이 저하되며 chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin a, pheophytin b의 순으로 항산화성이 높다고 보고되고 있다.

Table 109. Chlorophyll of various mustard leaf kimchi added sub-ingredient during fermentation at 5°C in 30 day

Samples ¹⁾	chlorophyll (mg%)		
	Total chlorophyll	chlorophyll a	chlorophyll b
Control	35.57 ± 1.62 ²⁾	27.42 ± 0.73	8.15 ± 1.25
P	47.30 ± 2.88	36.11 ± 2.18	11.19 ± 0.72
PG I	51.61 ± 2.22	37.28 ± 0.69	14.33 ± 1.65
PG II	58.81 ± 1.86	42.08 ± 0.22	16.73 ± 1.69
G	69.46 ± 1.88	46.03 ± 0.46	23.42 ± 1.69

¹⁾Control : mustard leaf kimchi

P : pumpkin powder(0.5%) added mustard leaf kimchi

PG I : pumpkin powder:green tea powder(0.4%:0.1%) added mustard leaf kimchi

PG II : pumpkin powder:green tea powder(0.3%:0.2%) added mustard leaf kimchi

G : green tea powder(0.5%) added mustard leaf kimchi

²⁾Mean ± S.D.

나) Carotenoids와 총 페놀함량

기능성 증진 갖김치의 5°C에서 숙성중 적숙기인 30일째 날의 carotenoids와 페놀함량을 조사하였다. Carotenoids의 양을 보면 전반적으로 비슷한 양상을 보이나 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군이 높게 나타났다. 총 페놀함량의 측정 결과를 보면 녹차분말 0.5% 첨가군과 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군에서 비교적 높게 나타났다. 이것은 푸른 녹차 성분이 높을수록 함유량이 높은 것으로 푸른잎이 많은 부분에서 페놀 함량이 높았다는 연구보고와 일치하였다.

Table 110. Total phenol and Carotenoids of various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C in 30 day

(mg%)

Samples ¹⁾	Attributes	
	Total phenol	Carotenoids
Control	22.56 ± 0.87 ²⁾	3.76 ± 0.02
P	19.00 ± 0.54	4.88 ± 0.03
PG I	22.35 ± 0.28	4.96 ± 0.24
PG II	28.99 ± 0.95	5.80 ± 0.02
G	29.51 ± 0.51	5.77 ± 0.03

¹⁾ P, PG I, PGII and G : see the legend in Table 109.

²⁾ Mean ± S.D.

다) 비타민 C 함량

갓김치의 총 비타민 C 함량을 보면 대조군의 20.45mg%에 비해 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2% 첨가군이 39.49mg%로 상당히 높았다. 그리고 늙은호박분말 0.5% 첨가군과 녹차분말 0.5% 첨가군은 각각 23.27mg%, 28.34mg%로 비슷한 양상을 나타내었으며 늙은호박분말과 녹차분말 0.4%:0.1% 첨가군도 26.52mg%로 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 111. Ascorbic acid of various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C in 30 day

(m g %)

Samples ¹⁾	Ascorbic acid		
	Total ascorbic acid	Dehydroascorbic acid	Hydroascorbic acid
Control	20.45 ± 1.10 ²⁾	15.60 ± 1.29	4.94 ± 0.18
P	23.27 ± 0.18	17.94 ± 0.55	5.33 ± 0.37
PG I	26.52 ± 1.10	20.28 ± 0.74	6.24 ± 0.37
PG II	35.49 ± 1.10	26.46 ± 1.01	9.04 ± 0.09
G	28.34 ± 0.18	21.58 ± 0.74	6.74 ± 0.92

¹⁾ P, PG I, PGII and G : see the legend in Table 109.

²⁾ Mean ± S.D.

비타민 C는 항산화제로 비타민 E와 함께 free radical scavengers 역할을 한다는 것으로 알려져 있고, 비타민 E가 재활용될 수 있게 도와준다. 감염에 대한 저항력을 강화시켜 두드러기, 알레르기 피부에 좋으며, 각종 공해 및 스트레스에 대한 방어작

용을 하게 된다. 비타민 C는 결합조직을 구성하는 중요한 단백질인 collagen을 합성 하는데 중요한 역할을 한다. collagen 합성에 필요한 효소인 수산화 효소를 활성화 시키는 작용을 하는데, 아미노산인 proline과 lysine이 수산화되어 hydroxyproline, hydroxylysine을 형성하는 과정에 비타민 C가 관여를 한다. 또한 모세혈관의 저항성을 강화하여 항고혈 작용을 한다.

라) 무기질 함량

갯김치 중 피부와 관련이 있는 무기질은 여러 가지가 있으나 그 중 마그네슘과 아연, 셀레니움의 양을 측정하였다. 그 결과를 보면 마그네슘 함량은 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군에서 0.309wt%로 대조군과 녹차분말 0.5% 첨가군의 0.253wt%, 0.238wt%인데 비해 높은 수치를 나타내었으며, 아연 함량도 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2% 첨가한 실험군이 39.58ppm으로 가장 높았다. 셀레니움 함량을 보면 늙은호박분말 0.5% 첨가군과 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.3% 군이 114.42ppb, 103.65ppb로 다른 실험군에 비해 함유량이 높게 나타났다.

피부와 관련이 있는 무기질은 여러 가지가 있으나 특히 마그네슘(Mg)은 일반적으로 녹엽식품에 많이 함유되어 있으며, 만성적인 마그네슘 결핍은 피부병, 탈모현상을 일으키며 잇몸이 붓는 경우가 있다. 아연은 피부의 신진대사에 관여하며 모발, 간, 눈, 췌장, 피부, 손톱, 남성의 성선 등에 분포되어 있기 때문에 아연이 결핍되면 피부와 모발, 손톱 등에 이상 현상이 나타나며 미각의 둔화, 식욕부진, 성장부진, 상처회복 지연, 면역이 약화되고 collagen 합성이 감소하게 된다. 셀레니움은 비타민 E와 함께 과산화지질의 생성을 억제하며, 상처 치유를 촉진시켜 주고 조직의 탄력성 유지와 피부암의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

Table 112. Mineral content various mustard leaf kimchi added sub-ingredient during fermentation at 5°C in 30 day

Samples ¹⁾	Mineral (mg%)		
	Mg (wt%)	Zn (ppm)	Se (ppb)
Control	0.252 ²⁾	26.74	68.02
P	0.240	27.77	114.42
PG I	0.253	29.86	33.06
PG II	0.309	39.58	103.65
G	0.238	24.55	94.08

¹⁾ P, PG I, PGII and G : see the legend in Table 109.

²⁾Mean ± S. D.

나. 향노화 A II형 갓김치의 상품화를 위한 맛 및 보존성 연구

1) pH 및 산도 변화

녹차 및 늙은호박분말 첨가에 따른 갓김치의 pH와 산도의 변화는 Fig. 104에 나타내었다. pH나 산도 모두 담금후 20일까지는 비교적 완만하게 변화되나 20일 이후부터 40일까지는 급격한 변화를 보이고 다시 40일 이후부터 변화량이 감소하는 것을 볼 수 있다. 일반적으로 pH 4.2~4.6, 산도 0.5~0.75%가 가장 맛있는 김치로 보고되어 있으며, 김치 숙성의 적기는 관능검사에서 pH 4.2, 산도 0.6%일때가 양호하다고 했는데 김치재료 및 부재료의 첨가, 숙성온도 등 여러 가지 인자에 따라 약간씩 다르게 조건이 결정될 수 있다고 본다. 늙은호박분말 0.5% 첨가군은 전반적으로 변화량이 크며 20일 이후부터 pH는 가장 낮고 산도 또한 가장 높게 나타났는데, 숙성 30일째의 pH 4.3, 산도 0.89%로 대조군의 pH 4.4, 산도 0.8%와 비교할 수 있다. 그 다음으로 늙은호박분말과 녹차분말을 0.4%:0.1%비로 첨가한 실험군이 산도가 높았는데 숙성 30일경 pH가 4.42이고, 산도는 0.78%로 나타났다. 이에 비해 녹차분말 0.5% 첨가군은 변화량이 적은 동시에 20일 이후부터는 시료 중 가장 높은 pH와 가장 낮은 산도를 나타내었다.

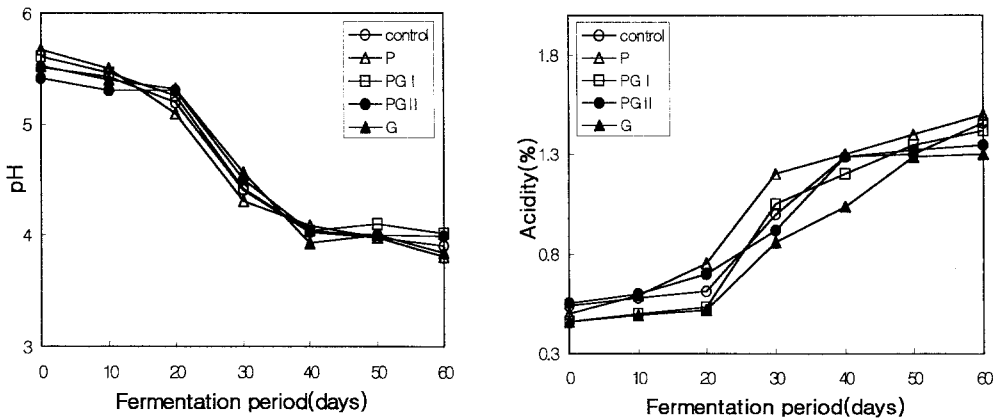


Fig.104. Changes of pH and acidity in various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days.

P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

즉, 숙성 30일째 pH 4.56이고 산도 0.69%로 다른 실험군에 비해 아주 적은 변화를 볼 수 있었다. 그리고 숙성 후반인 40일 이후부터는 pH 및 산도 모두 완만히 변화되는

것을 볼 수 있는데 이것은 갓김치 및 국물 중 각종 성분의 완충작용 때문으로 보인다. 전반적으로 갓김치에 늙은호박분말의 첨가량이 증가할수록 발효가 빠르고, 녹차분말은 첨가량이 증가할수록 저장성이 증가하여 그에 따른 pH 및 산도의 변화가 적은 것으로 생각된다.

2) 환원당 함량 변화

발효기간 중 환원당의 변화는 Fig. 105와 같으며 담금 직후 환원당의 함량을 보면 늙은호박분말 0.5% 첨가군은 4.38%, 늙은호박분말과 녹차분말을 각각 0.4%:0.1%와 0.3%:0.2% 첨가군은 3.99%, 3.52%으로 높고, 녹차분말 0.5% 첨가군은 3.46%, 대조군은 3.43%으로 늙은호박분말의 첨가비가 증가할수록 환원당 함량은 높았으며, 숙성이 진행되면서 모든 실험군에서 당은 계속적인 감소를 보였다. 이것은 조 등이 갓김치 숙성 중의 각종 pH가 감소하면서 젖산을 생성하는 미생물에 의하여 당이 소모된다는 보고와 일치하였다.

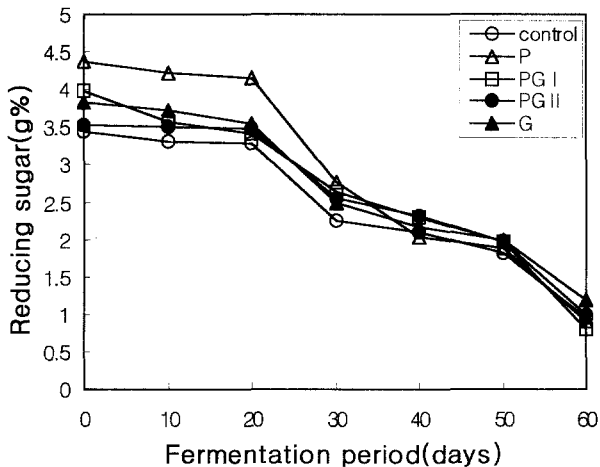


Fig. 105. Changes of reducing sugar in various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days.
P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

채소류의 당함량은 종류와 온도, 햇빛 등의 재배환경에 의해 달라지며 김치를 담그는 경우 원료의 종류, 첨가되는 부재료의 종류, 절임시간, 소금농도에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려지고 있다. 담금 직후부터 초기에는 변화가 적으나 숙성 후반부터 환원당은 감소하여 40일경 늙은호박분말 0.5% 첨가군은 3.13%이고, 녹차분말 0.5% 첨가군은 3.21%으로 늙은호박분말의 첨가량이 많은 실험군에서 감소량도 컸다. 따라

서 호박분말의 첨가비가 증가함에 따라 산도가 증가하여 환원당이 감소되는 것으로 생각되며 이것은 산이 증가 함에 따라 환원당 함량이 감소한다는 보고와 일치하였다.

3) 색도 및 경도 변화

부재료 첨가에 따른 색도의 변화를 알기 위해 Hunter L, a, 및 b값으로 측정된 결과는 Table 113과 같았다. 전반적인 경향을 보면 늙은호박분말 0.5% 첨가군은 Lightness(L)가 다른 시료에 비해 가장 높은 반면 Red(a)는 적고, 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군은 Lightness가 가장 적으나 Red는 많은 것으로 측정되었다. Yellow(b)가 숙성중 전시료에서 증가되었는데 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군과 녹차분말 0.5% 첨가군은 비교적 증가량이 적었다. 이것은 갓김치의 숙성과정 중 용출된 착색물의 분해와 천연색소의 pH 변화에 따른 색의 변화, 고형분의 분해로 인한 투명도의 감소 등이 색의 변화를 유발하는 것으로 생각된다.

Table 113. Hunter's color values in various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days

Attributes	Samples ¹⁾	Fermentation period(days)						
		0	10	20	30	40	50	60
L	Control	23.55±0.07 ^{2)a}	22.25±0.07 ^a	24.00±0.01 ^b	18.75±0.35 ^c	20.68±0.04 ^a	19.45±0.07 ^a	21.45±0.07 ^a
	P	16.84±0.05 ^c	18.68±0.04 ^b	25.15±0.01 ^a	24.65±0.07 ^a	19.33±0.1 ^c	20.00±0.71 ^a	18.20±0.14 ^b
	PG I	17.02±0.01 ^b	17.20±0.14 ^c	16.50±0.14 ^e	20.38±0.04 ^b	19.95±0.07 ^b	18.20±0.28 ^b	19.00±0.71 ^b
	PG II	12.15±0.07 ^d	11.06±0.00 ^d	17.46±0.06 ^d	18.00±0.57 ^c	17.25±0.07 ^d	18.25±0.07 ^b	16.27±0.02 ^c
	G	14.25±0.07 ^e	15.96±0.07 ^e	19.08±0.04 ^c	13.93±0.71 ^d	15.69±0.02 ^e	16.55±0.07 ^c	17.00±0.28 ^c
a	Control	7.50±0.42 ^c	7.95±0.07 ^c	7.95±0.21 ^c	10.18±0.04 ^a	8.30±0.14 ^b	8.00±0.14 ^{cd}	7.59±0.13 ^d
	P	6.40±0.57 ^b	6.39±0.01 ^d	7.69±0.02 ^c	6.90±0.01 ^e	8.35±0.01 ^b	7.90±0.00 ^d	8.00±0.01 ^c
	PG I	8.00±0.14 ^{bc}	7.94±0.06 ^c	9.20±0.14 ^b	8.55±0.07 ^c	7.47±0.04 ^c	8.23±0.04 ^{bc}	7.70±0.14 ^d
	PG II	9.56±0.06 ^a	10.30±0.01 ^a	10.58±0.03 ^a	8.38±0.03 ^d	8.10±0.14 ^b	8.40±0.14 ^b	9.25±0.07 ^b
	G	8.70±0.14 ^b	8.84±0.08 ^b	9.01±0.01 ^b	8.93±0.04 ^b	9.70±0.00 ^a	8.70±0.14 ^a	9.85±0.07 ^a
b	Control	25.95±0.07 ^b	22.17±0.05 ^d	31.85±0.07 ^a	28.58±0.04 ^d	33.09±0.02 ^a	34.57±0.04 ^b	35.68±0.04 ^b
	P	23.28±0.03 ^d	25.35±0.07 ^c	25.35±0.07 ^c	37.21±0.01 ^a	31.45±0.07 ^c	35.65±0.06 ^a	37.87±0.11 ^a
	PG I	26.57±0.04 ^a	28.25±0.07 ^a	23.70±0.14 ^d	32.33±0.01 ^b	32.27±0.05 ^b	33.45±0.07 ^c	34.68±0.03 ^c
	PG II	20.54±0.05 ^e	18.75±0.07 ^c	28.65±0.08 ^b	30.00±0.28 ^c	28.33±0.04 ^d	32.00±0.14 ^d	30.23±0.04 ^e
	G	23.46±0.08 ^c	25.62±0.03 ^b	23.00±0.01 ^e	20.07±0.05 ^f	24.64±0.01 ^e	29.15±0.07 ^c	32.00±0.14 ^d

¹⁾P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

²⁾Mean±S.D.

^{a~e}Within the column, values not sharing a common superscript differed significantly according to one-way analysis of variance and Duncan's

multiple range test ($p < 0.01$)

부재료 첨가에 따른 갓김치의 경도는 Table 114에 나타내었다. 모든 갓김치 시료들은 숙성이 진행됨에 따라 조직의 두께는 점차 감소하였으며, 이러한 사실은 세포 유조직내의 공기의 탈기와 수분손실에 따라 점차 경도는 감소한다는 보고와도 일치하였으며 대조군과 늙은호박분말 0.5% 첨가군에서 경도의 감소가 크게 나타났다. 반면 녹차분말 0.5% 첨가군은 숙성기간 전반적으로 경도가 높고 40일경의 경도가 5.28mm로 대조군의 4.2mm에 비해 경도 변화가 적었다. 늙은호박분말과 녹차분말을 각각 0.4%:0.1%와 0.3%:0.2% 첨가군은 각각 4.36mm, 4.94mm로 나타나 녹차분말의 첨가량이 증가할수록 경도의 변화도 적은 것으로 생각된다. 이것은 늙은호박분말 첨가에 의해 빠른 산패로 갓김치가 쉽게 물러지는 것으로 생각되며 녹차분말의 저장성 증진이 조직의 빠른 연화를 지연시키는 것으로 생각된다.

Table 114. Hardness of various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 day

Attributes	Samples ¹⁾	Fermentation period(days)						
		0	10	20	30	40	50	60
Hardness (mm)	Control	2.25±1.07 ²⁾	5.44±0.80	5.46±0.36 ^a	4.44±0.39	4.20±0.40 ^a	4.30±0.46	4.08±0.24
	P	4.74±0.73	5.48±0.99	4.00±1.05 ^b	4.34±0.54	4.36±0.63 ^{ab}	4.38±0.63	3.80±0.43
	PG I	5.42±1.07	4.94±0.53	4.48±0.70 ^{ab}	4.63±1.23	4.94±1.09 ^b	4.34±0.54	4.06±0.38
	PG II	4.52±0.91	4.98±1.47	4.44±0.99 ^{ab}	5.20±1.72	4.10±0.32 ^b	4.92±0.61	4.24±0.53
	G	4.34±1.21	6.24±1.58	5.76±1.34 ^a	5.52±0.36	5.28±0.55 ^b	4.86±0.42	4.38±0.44

¹⁾P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

²⁾Mean±S.D.

^{a~b}Within the column, values not sharing a common superscript differed significantly according to one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4) 총균수 및 젖산균수 변화

부재료 첨가에 따른 갓김치의 발효숙성 중 총균수의 변화는 Fig. 106에 나타내었다. 전반적으로 늙은호박분말 0.5% 첨가군이 대조군에 비해 총균수의 증가량이 가장 크고 많았으며, 녹차분말 0.5% 첨가군이 총균수의 변화가 적었는데 숙성 30일째 8×10^8 CFU/ml이었다. 그리고 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군은 9×10^8 CFU/ml으로 60일 경에는 대조군이 8×10^7 CFU/ml, 늙은호박분말 0.5% 첨가군이 1×10^8 CFU/ml, 늙은호박분말과 녹차분말을 각각 0.4%:0.1%와 0.3%:0.2%비로 첨가한 군은 7×10^7 CFU/ml과 3×10^7 CFU/ml이었다. 따라서 녹차분말 0.5% 첨가군이 총균수는 가장

적었고, 늪은호박분말과 녹차분말의 첨가비가 0.3%:0.2%인 군에서도 전반적으로 총균 수가 적게 나타났다.

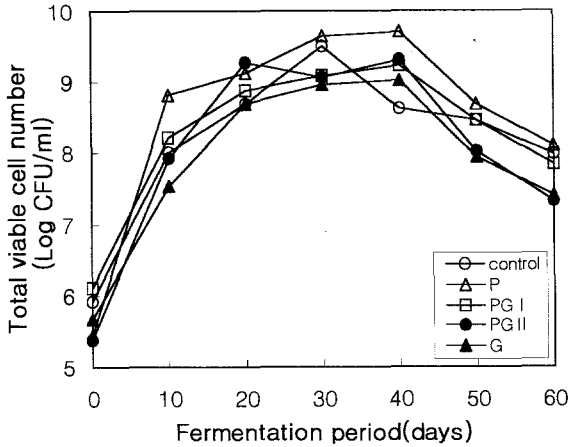


Fig. 106. Changes of Total viable cell number in various mustard leaf kimchi added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days. P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

젖산균수의 변화는 Fig. 107와 같다. 늪은호박분말 0.5% 첨가군은 발효초기부터 *Lactobacillus* 속과 *Leuconostoc* 속의 수가 많아 10일째 각각 2×10^7 CFU/ml, 2×10^6 CFU/ml으로 대조군이 각각 7×10^6 CFU/ml와 3×10^5 CFU/ml에 비교해 증가폭이 높은 반면 발효후기에는 *Leuconostoc* 속의 수가 감소하였다. 김치의 발효는 젖산균에 의해 주도되고 주 발효균은 *Leuconostoc mesenteroides*로 이것은 김치의 맛과 냄새에 좋은 영향을 주며 김치의 적숙기에 그 수가 최고로 되며 이것이 감소하는 시기에 산패를 일으키는 *Lactobacillus plantarum*이 생기는 것으로 알려져 있다. 녹차분말 0.5% 첨가군은 전반적으로 젖산균수가 적고 증가폭도 적었다. 늪은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군은 숙성 30일경 *Lactobacillus* 속과 *Leuconostoc* 속이 각각 3×10^8 CFU/ml, 1×10^7 CFU/ml로 대조군의 9×10^9 CFU/ml, 7×10^6 CFU/ml로 *Lactobacillus* 속은 적는데 비해 *Leuconostoc* 속의 수는 비교적 높게 나타났다. 따라서 이것은 늪은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군이 다른 군들보다 산패는 지연되는 반면 관능성은 높다는 이유가 될 수 있을 것으로 생각된다.

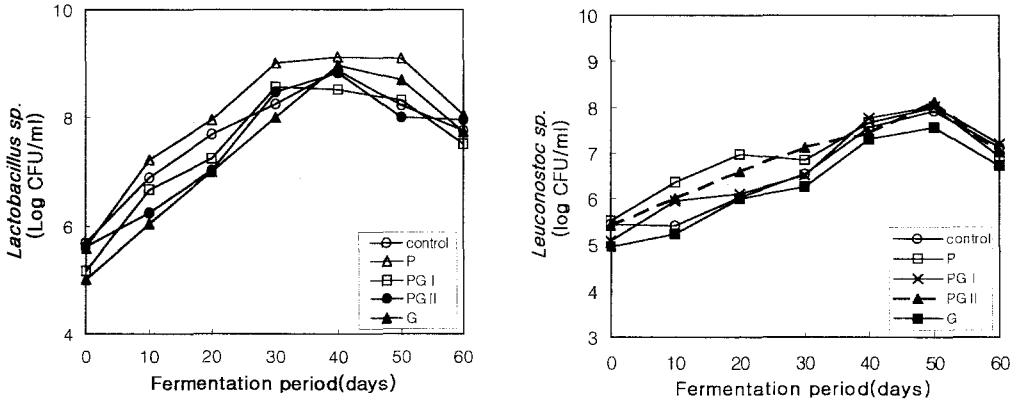


Fig. 107. Changes of *Lactobacillus sp.* and *Leuconostoc sp.* in various mustard leaf kimchi added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days.
P, PG I, PGII and G : see the legend in Table 109.

5) 관능적 특성의 변화

Table 115는 관능 요원 12명이 부재료 첨가한 갓김치의 숙성 과정중 관능점수를 나타낸 것이다. 초반에는 늙은호박분말 0.5% 첨가군에서 가장 높은 관능점수를 나타냈으나 숙성이 진행됨에 따라 관능점수는 낮은 반면에, 녹차분말 0.5% 첨가군은 초기에 아주 낮은 점수를 나타내다가 40일 이후부터는 대조군과 늙은호박분말 0.5% 첨가군보다 관능적으로 높은 점수를 얻었다. 30일경 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군이 전반적 향미, 맛, 향의 관능성이 전반적으로 가장 높은 점수를 얻었는데 각각 6.33, 6.75, 6.9로 대조군의 5.83, 5.52, 5.83보다 높고 다른 실험군에 비해서도 가장 높게 나타났다. 이것은 녹차분말을 첨가함으로써 녹차의 쓴맛이 초기 갓김치의 쓴맛과 함께 관능을 저하시키나 숙성이 진행됨에 따라 녹차의 항산화성으로 산패를 지연시켜 관능이 향상되며, 늙은호박은 많은 당을 함유하여 초기 갓김치 쓴맛을 상쇄시켰으나 점차 빠른 산패로 관능점수가 낮아지는 이유로 생각된다. 따라서 녹차분말과 늙은호박분말을 혼합한 군에서는 늙은호박분말의 감미와 녹차의 산패지연으로 인한 관능성 향상이 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군에서 가장 높은 관능점수를 얻은 것으로 생각된다.

Table 115. Scores of sensory properties of various mustard leaf *kimchi* added sub-ingredient during fermentation at 5°C for 60 days

Attributes	Samples ¹⁾	Fermentation period (days)						
		0	10	20	30	40	50	60
Appearance	Control	4.67±0.96 ^a						
	P	5.70±0.58 ^a	5.33±0.50 ²⁾	4.50±0.50	5.83±1.89	4.80±1.86	4.67±0.96	5.25±0.82
	PG I	5.33±0.50 ^a	5.33±0.50	4.83±0.50	6.17±0.82	6.20±0.83	5.67±0.00	5.50±1.41
	PG II	5.50±0.58 ^a	5.00±0.00	4.67±1.02	6.33±0.57	6.50±1.15	6.00±0.82	5.75±0.50
	G		4.83±1.26	4.33±0.04	5.17±0.50	5.00±1.50	5.00±0.00	4.50±1.26
			3.80±0.50 ^b					
Odor	Control	5.50±0.42	5.00±0.00	5.00±0.00	5.52±1.26	6.00±0.15	5.33±0.82	5.00±0.25
	P	6.00±0.82	5.50±1.00	5.30±1.00	5.83±1.26	4.00±0.00	4.83±0.00	4.75±1.00
	PG I	5.33±0.50	6.00±0.00	5.50±1.00	5.00±0.00	5.25±0.50	6.17±0.50	5.75±0.86
	PG II	5.00±0.00	5.83±1.89	5.67±0.96	6.75±0.42	6.20±0.82	6.20±0.52	6.17±0.52
	G	4.40±0.96	5.67±0.96	5.00±0.00	6.33±0.82	6.00±0.50	5.30±1.00	6.00±1.89
Taste	Control	4.83±0.50	5.83±0.00 ^{ab}	5.50±1.00	5.83±1.26	5.80±1.89 ^{ab}	5.50±1.50 ^{ab}	4.50±1.00
	P	6.50±0.96	6.70±0.96 ^a	5.83±1.89	5.00±0.00	4.80±1.86 ^a	4.30±1.50 ^a	5.00±0.50
	PG I	5.00±0.00	6.20±1.26 ^a	5.75±1.26	6.83±0.53	5.50±1.50 ^a	5.30±0.58 ^{ab}	5.50±1.82
	PG II	5.50±1.29	5.83±1.89 ^{ab}	6.00±1.00	6.90±0.96	7.00±1.00 ^b	7.00±1.41 ^b	6.56±0.50
	G	4.00±0.82		4.83±1.26	5.50±0.42			6.15±0.25
			5.17±1.41 ^b			6.25±1.26 ^{ab}	6.25±0.96 ^b	
Texture	Control	5.00±0.00	5.50±0.42	5.50±1.00	5.83±1.89	5.60±0.52	5.30±0.50	5.00±0.42
	P	5.00±0.00	6.50±0.83	6.00±0.82	4.67±0.50	4.60±0.52	4.25±0.82	4.50±0.42
	PG I	5.50±1.00	5.33±1.50	5.67±1.50	6.00±0.00	4.75±0.50	5.67±1.89	4.25±0.50
	PG II	5.70±0.50	6.17±0.85	5.83±1.89	5.33±0.46	5.80±0.96	5.80±1.50	6.50±0.42
	G	6.33±0.95	5.17±1.41	5.00±0.00	5.50±1.00	5.50±1.00	5.50±0.58	5.90±0.78
								4.75±1.50 ^a
Overall acceptability	Control	4.67±0.50	5.50±1.00	5.33±0.50	5.67±0.50	5.80±0.96	5.17±0.96	3.80±1.00 ^b
	P	6.60±1.00	6.00±0.00	5.50±0.42	5.33±0.83	4.80±0.96	4.50±1.50	
	PG I	4.00±0.82	6.20±0.95	5.00±0.00	6.17±0.82	6.00±0.50	5.50±0.50	5.50±1.00 ^a
	PG II	6.00±0.00	6.50±1.25	5.50±1.00	6.50±0.07	6.75±1.00	6.00±0.00	
	G	5.20±0.50	4.83±0.83	4.83±1.26	5.17±0.83	5.75±0.50	5.75±0.50	6.00±0.50 ^a
								5.75±0.86 ^a

¹⁾P, PG I, PG II and G : see the legend in Table 109.

²⁾Mean±S.D.

^{a-b} Within the column, values not sharing a common superscript differed significantly according to one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test (p<0.05)

Table 115는 관능 요원 12명이 부재료 첨가한 갓김치의 숙성 과정중 관능점수를 나타낸 것이다. 초반에는 늙은호박분말 0.5% 첨가군에서 가장 높은 관능점수를 나타냈으나 숙성이 진행됨에 따라 관능점수는 낮진 반면에, 녹차분말 0.5% 첨가군은 초기에 아주 낮은 점수를 나타내다가 40일 이후부터는 대조군과 늙은호박분말 0.5% 첨가군보다 관능적으로 높은 점수를 얻었다. 30일경 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군이 전반적 향미, 맛, 향의 관능성이 전반적으로 가장 높은 점수를 얻었는데 각각 6.33, 6.75, 6.9로 대조군의 5.83, 5.52, 5.83보다 높고 다른 실험군에 비해서도 가장 높게 나타났다. 이것은 녹차분말을 첨가함으로써 녹차의 쓴맛이 초기 갓김치의 쓴맛과 함께 관능을 저하시키나 숙성이 진행됨에 따라 녹차의 항산화성으로 산패를 지연시켜 관능이 향상되며, 늙은호박은 많은 당을 함유하여 초기 갓김치 쓴맛을 상쇄시켰으나 점차 빠른 산패로 관능점수가 낮아지는 이유로 생각된다. 그래서 녹차분말과 늙은호박분을 혼합한 군에서는 늙은호박분말의 감미와 녹차의 산패지연으로 인한 관능성 향상이 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2%로 첨가한 군에서 가장 높은 관능점수를 얻은 것으로 생각된다.

2. 향노화 AII type 갓김치의 최종 상품화 및 산업화 연구

가. 담금 공정의 개선

1) 재료 구성 및 선별

표준으로 정한 갓김치 레시피에 첨가되는 피부 미용성 증진 부재료는 늙은호박, 녹차, 붉은고추, 당근이다. 먼저 주재료인 갓은 봄, 가을 갓이 여름 갓보다 크기가 크고 굵으며 밀도가 높다고 선행 연구에서 보고한 바 있다. 갓의 아린맛이나 향은 봄, 가을 갓이 훨씬 세고 여름갓은 조직이 부드러운 만큼 그 향이 강하지 않다. 갓 특유의 아린맛을 즐기는 전라도 지방에서는 봄, 가을 갓을 선호하나 경기지방 및 기타 지역에서는 여름갓을 선호한다. 소비자 검사를 위한 표준 레시피에 사용한 갓은 가을갓을 이용하였다. 원산지는 전라남도 여천군 돌산면으로 돌산 청갓이라고 한다. 갓의 크기는 30~45cm로 포기당 무게는 25~50g으로 꽃대가 올라오지 않은 신선한 것을 구입하여 단시간 내에 사용하였다. 그리고 갓김치에 들어가는 부재료인 늙은호박과 녹차는 첨가에 따른 갓김치 관능성에 영향을 줄 수 있으므로 이들은 동결건조 후 분말화하여 사용하였다. 늙은호박은 경남 남해에서 10월 중순경에 수확한 평균 무게 3~4kg인 것을 구입하여 내부씨와 껍질을 제거하고 4~5cm로 썰어 동결건조한 후 막자사발에서 곱게 간 것을 사용하였다. 녹차도 기능성 성분의 파괴를 최소화하기 위한 방법으로 동결건조법을 이용하였다. 당근과 붉은고추는 일반적으로 김치 담금시 자주 사용되는 부재료로 신선한 것을 그대로 사용하였다. 갓김치의 맛을 좌우하는 첫같은 전라도 지방 담금법의 특성에 따라 멸치젓에다 새우젓을 동량으로 첨가하였다.

2) 절임방법

김치를 절임하는 방법은 건염법, 염수법이 있고, 절임 방법에 따른 갓김치의 발효양상과 특성을 비교한 결과는 다음과 같다. 먼저 염수법은 갓 무게 2배의 10% 염수에 담궈서 절이고, 건염법은 갓 무게의 10%에 해당하는 양의 소금을 갓에 뿌려 절였다. 이렇게 절인 갓으로 갓김치를 담아 15℃에서 0, 2, 4, 6, 8일간 숙성시키면서 발효양상을 조사한 결과를 보면 외관상 염수법으로 절인 갓이 균일하게 절여졌으며 pH와 산도의 변화를 보면 두 군 모두 비슷하였다. 환원당 함량은 염수법이 건염법보다 높았고, 미생물은 두 군 모두 비슷한 양상을 보였으나 발효 후기에 관여하는 *Lactobacillus sp.*는 발효 초기에 염수법에서 낮은 결과를 보였다. 그리고 관능평가에서도 종합적인 평가와 아삭아삭함은 염수법이 건염법보다 높은 점수를 나타내었다. 따라서 최종 상품화를 위해 사용한 절임법은 염수법을 이용하여 갓김치를 담았다.

Table 116. Brining method

Brining method	Brining condition
Salt water	two time of mustard leaf weight in 10% salt water
Salt dry	10% salt of mustard leaf weight

3) 절임온도

일반적으로 계절에 따라 절임시 외기 온도의 변화가 크고, 온도 변화로 인해 절임 시간이나 절임 후 염농도가 달라질 수 있다. 따라서 절임하는 온도는 전체적인 갓김치에 많은 영향을 끼칠 수 있다. 선행 실험에서 우수하게 평가된 염수법을 이용하여 절임한 후 수온을 5℃, 15℃로 온도를 달리하여 비교 실험한 보고에서 얻은 결과는 Table 117과 같다. 일정한 염농도에 도달하는 온도별 시간은 5℃에서는 50분, 15℃는 40분으로 이 두군을 이용하여 담은 갓김치의 발효양상을 비교하였을 때 갓김치 절임시 온도 조건은 짧은 시간에 절임으로 크게 차이는 없으나 5℃에서 절임이 15℃절임보다 더 적당한 것으로 나타났었다. 따라서 최종 상품화를 위해 사용한 절임 온도는 5℃였다.

Table 117. Brining temperature

Brining temperature	Brining time
5℃	50min
15℃	40min

4) 절임형태

절단유무에 따른 발효 양상 비교를 위하여 갓을 3×4cm로 절단 후 염수법으로 절이거나 갓을 그대로 염수법으로 절이는 방법으로 실험한 결과에서 절단하여 절여 담은

갓김치가 통째로 담근 갓김치보다 발효가 빠름을 알 수 있었다. 따라서 최종 상품화를 위한 갓김치는 상품성과 외관 등의 관능성을 고려하여 절단하지 않고 그대로하여 갓김치를 담았다.

5) 세척공정의 개선

갓김치를 담는 과정 중 절임 후 세척공정에서 세척시 물의 양과 세척 횟수에 따라 최종 염농도가 달라 질 수 있으며, 이런 염농도의 차이는 발효 과정에서 미생물과 pH 및 산도에 영향을 주고, 이로 인한 환원당, 색, 관능성 등이 김치를 담을 때마다 차이가 생길 수 있다. 또한 여러 가지 기능성 성분에도 영향을 줄 수 있으므로 이를 개선하기 위해 세척공정에 따른 염농도 변화에 대한 실험을 행하였다. 먼저 갓을 줄기부터 잎까지 모든 부위를 이용하여 동일한 실험조건인 10%의 소금물에서 5℃, 50분간 절임 후 염농도는 3.1%에서 세척조건을 달리하여 실험을 행하였다. 첫 번째로 절임갓의 2배의 고인 물에서 1번, 2번, 3번을 세척 후 각각의 염농도를 측정하였다. 두 번째 흐르는 물에서 1번, 2번, 3번을 세척 후 반복하면서 각각의 염농도를 측정하였다. 그 결과 고인물에서 한번 세척시 2.58%, 두번 세척시 1.90%로 비교적 염농도의 변화가 적은데 비해 흐르는 물에서는 한번 세척시 2.22%, 두번 세척시 1.69%로 염농도의 변화가 커 담금후 최종 염농도 조절이 어려웠다. 그리고 갓김치의 최종 염농도는 2.5~3%로 절임시 염농도를 1.8~1.9%로 유지할 때 조절될 수 있었다. 따라서 절임 후 세척시 고인물에서 2번 세척할 때 가장 적절하게 염농도가 유지될 수 있었으며 이를 최종 상품화를 위한 세척 조건으로 사용하였다.

Table 118. Salt degree according to wash condition

Number of washing	Salt degree (%)	
	Stable water	Flowing water
1	2.58±0.35	2.22±0.42
2	1.90±0.21	1.69±0.36
3	1.72±0.30	1.44±0.12

6) 탈수 및 탈염

절임 후 탈수 시간에 따른 갓김치의 발효양상을 비교하기 위해 갓을 10% 염수로 절인 후 물빼는 시간을 30분, 1시간, 2시간, 3시간으로 달리하여 탈수한 후 김치를 담귀 발효시켜 적숙기에 꺼내 실험한 결과에서 탈수 시간에 따른 갓김치의 특성 차이는 비교하였다. 물빼는 시간이 길어질수록 김치액은 줄고, 색도에도 영향을 주어 3시간째에는 Lightness가 낮아져 김치 색깔이 어두워짐을 볼 수 있었다. 환원당 함량에서는 탈수 시간이 길어질수록 약간씩 함량이 줄어들었으며, 갓김치 조직감은 탈수시간이 길어짐에 따라 질겨짐을 알 수 있다. 따라서 과도한 탈수 시간은 갓김치의 외관 및 조직감에 영향을 미치므로 1시간이내에 하는 것이 적당하였다. 이런 선연구 결과

에 의해 최종 상품화를 위한 갓김치의 탈수 시간은 30분에서 1시간 이내로 하였다.

7) 항노화 A형 갓김치의 상품화를 위한 최적 절임조건

갓의 선별	잎의 상처나 병든 것, 꽃대 제거
절임법	염수법 (갓 무게의 2배의 10% 염수 이용)
절임온도	5℃
절임시간	50분
절임형태	절단하지 않고 그대로 절임
세척	갓의 2배의 고인물에서 2번 반복 세척
탈수	30분에서 1시간

8) 부재료 및 전처리

부재료	전처리	
마늘	곱게 다진 것 사용	
생강	곱게 다진 것 사용	
고춧가루	박달재 태양초 고춧가루 사용	
파	소파를 3cm로 썰어 사용	
배	다져서 즙만 사용	
참쌀풀	물과 참쌀가루의 비를 10 : 1로 하여 끓인 것 사용 (녹차와 늙은호박분말을 첨가함으로써 반죽이 되어지는 것 방지)	
당근	신선한 것을 곱게 채썰어 사용	
통깨	볶은 것을 사용	
붉은고추	빛이 고운 것을 잘 다져 사용	
젓갈	젓갈	맑은 멸치 액젓 사용
	새우젓	새우 살이 통통하고, 빛이 좋은 것을 선택하여 새우육과 국물을 섞어 사용
늙은호박	평균 무게 3~4kg인 것을 구입하여 내부씨와 껍질을 제거하고 4~5cm로 썰어 동결건조한 후 막자사발에서 곱게 간 것 사용	
녹차	동결건조하여 곱게 간 것 사용	

자) 재료배합비 및 담금법

갓김치 담금법 개선을 위해 선행 연구에서 전통적인 전라도 지방의 갓김치 담금법과 문헌의 담금법을 분석하고 수차례 재현, 보완하여 보다 현대인의 입맛에 맞는 레시피를 선정된 바 있다. 이렇게 선정된 담금법을 이용하여 기능성 증진을 위한 갓김치를 제조하고자 하여, 갓김치에 피부 미용성의 함량이 높은 부재료로 녹차 및 늙은호박이 첨가되었다. 이들 부재료는 갓김치의 맛과 외관에 영향을 줄 수 있으므로 모두 동결건조한 후 분말화하여 사용하였다. 이외에 피부 미용성 성분의 함량이 높은

식품으로 붉은고추와 당근이 선별되었는데 이들은 일반적으로 김치에 부재료로 자주 첨가되는 재료이므로 가공하지 않고 그대로 첨가하였다. 이렇게 담은 갓김치를 이용하여 여러 가지 연구를 수행한 결과 갓김치 속에 항산화 작용이 있다고 알려진 chlorophyll, 페놀 화합물, 비타민 C, β -carotene 등은 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군에서 함유량이 높았다. 피부 미용성분인 마그네슘, 아연, 셀레늄의 무기질 또한 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군이 가장 많이 함유하는 것으로 나타났으며, 관능검사에서도 다른 실험군에 비해 높은 점수를 얻었다. 따라서 최종 소비자 검사에 사용하는 피부 미용성 증진 갓김치로 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%를 첨가하였고, 사용한 갓김치의 표준 재료 배합비는 다음과 같다.

Table 119. Standard ingredients ratio of mustard leaf kimchi

Ingredients	Amount (g)
Mustard leaf	1000
Garlic	30
Ginger	15
Green onion	55
Red pepper powder	39
Pear	225
Roasted sesame	3
Glutinous rice paste	80
Fermented anchovy juice	26
Fermented shrimp	26
Carrot	10
Shredded red pepper	10
pumpkin powder	3 ¹⁾ (15) ²⁾
green tea powder	2 ¹⁾ (3.2) ²⁾

¹⁾Weight of freeze-dried material

²⁾Weight of raw material

위의 재료 배합비에 준해 담금방법은 다음과 같다.

- 먼저 갓은 깨끗이 다듬어 소금물 10%에서 50분 정도 절인다.
- 양념으로 들어가는 파, 당근, 붉은고추는 깨끗이 씻은 후, 파는 3cm로 썰고, 당근은 곱게 채썰며, 붉은고추는 잘 다져둔다.
- 마늘, 생강은 곱게 갈고 배는 갈아서 즙을 내어서 준비한다.
- 찹쌀풀은 미리 끊여 식혀둔다.
- 배합비율에 따라 멸치젓과 새우젓에 고춧가루, 통깨와 준비해 둔 마늘, 생강, 파, 당근, 붉은고추, 배즙 등을 모두 넣어 고루 잘 섞는다.
- 절여진 갓은 깨끗이 씻어 채에 받쳐 물기를 빼둔다.
- 늙은 호박과 녹차는 분말화하여 준비한다.

- 물기를 뺀 갖에 준비해둔 양념을 잘 무쳐 향아리에 채곡채곡 담고 우거지를 덮어 꼭꼭 눌러준다.
 - 실온에서 24시간 방치 후 5℃ 냉장보관하여 숙성시킨다.
- 9) 향노화 AII형 갓김치의 제조 공정도

갓김치 제조 공정

갓구입 및 선별

- 여천군 돌산면에서 수확한 돌산 청갓으로 잎에 상처나 병든 것과 꽃대 제거.
- 갓은 짧은 것을 선택하고 갓의 향을 원할때는 굵지 않고 얇은것 선택.

부재료 전처리

- 당근은 채썰고, 붉은고추, 마늘 및 생강은 곱게 다짐. 배는 즙을 내고, 찹쌀풀은 미리 끓여 식혀둬.

절임

- 갓 중량의 2배의 10% 소금물에서 5℃ 50분간 절임.
- 골고루 잘 절여지도록 절임 중간에 위·아래를 섞어주고, 절임 상태를 보고 잘 절여진 잎은 먼저 건져둬.

세척

- 고인물에서 2번 반복세척. 세척시 조직이 치이지 않게함.

탈수

- 30분에서 1시간 정도 자연 탈수를 실시. 지나친 탈수는 갓의 외관 및 조직감이 나쁜 영향을 미치므로 탈수 시간을 잘 지킴.

기능성 증진 부재료 전처리

- 늪은호박은 내부씨와 껍질을 제거하고 4~5cm로 썰어 동결건조한 후 막자사발에서 곱게 갈고, 녹차도 동결건조하여 분말화함.

양념 배합

- 멸치젓과 새우젓에 고춧가루, 통깨와 준비된 찹쌀풀, 마늘, 생강, 파, 당근, 붉은고추, 배즙 등과 늪은호박분말, 녹차분말을 모두 넣어 고루 잘 섞음.
- 고춧가루가 뭉치지 않도록 잘 저어줌.

갓에 양념 버무리기

- 겹쳐진 갓은 잘퍼서 골고루 양념을 버무리.
- 골고루 섞이도록 버무리며 너무 힘을 주지 않도록함.

충진 및 포장

- 제조된 김치를 일정량을 항아리에 담고 우거지를 덮어 눌러줌.

저장

- 상온에서 24시간 방치 후 5℃에서 숙성.

2) 소비자 관능검사

가) 소비자 관능검사를 위한 갓김치 제조

선행 실험의 결과로 갓김치 속에 항산화 작용이 있다고 알려진 chlorophyll, 페놀 화합물, 비타민 C, β -carotene 등은 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군에서 함유량이 높았다. 피부 미용성분인 마그네슘, 아연, 셀레늄의 무기질 또한 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%비로 첨가한 실험군이 가장 많이 함유하는 것으로 나타났으며, 관능검사에서 다른 실험군에 비해 높은 점수를 얻었다. 따라서 향노화 A type 갓김치의 최종 상품화를 위해 선정된 갓김치 실험군은 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%로 첨가한 실험군이었으며 이와 같이 선정된 갓김치 실험군으로 소비자 관능검사를 실시하였다. 피부 미용성 증진 갓김치의 소비자 관능검사는 대조군과 함께 비교하여 대조군에 비해 기능성 증진 갓김치의 소비자 선호도 및 기호도를 조사하고자 11월 5일에서 6일의 이틀동안 부산대학교 김치연구소에서 대량으로 갓김치를 담았다. Table 120는 최종 소비자 관능검사에 사용한 대조군과 실험군의 레시피이다. 갓김치는 담금직후 24시간 상온에서 방치하고, 5℃에서 저장하여 갓김치가 가장 맛이 좋은 30일경으로 대조군이 pH 4.3, 산도 0.79%이고, 실험군은 pH 4.37, 산도 0.72% 일때 소비자 관능검사를 실시하였다.

Table 120. Ingredients ratio of the mustard leaf *kimchi* for consumer field test

Ingredients	Control mustard leaf <i>kimchi</i>	Funtional mustard leaf <i>kimchi</i> ³⁾
Mustard leaf	1000	1000
Garlic	30	30
Ginger	15	15
Green onion	55	55
Red pepper powder	39	39
Pear	225	225
Roasted sesame	3	3
Glutinous rice paste	80	80
Fermented anchovy juice	26	26
Fermented shrimp	26	26
Carrot	10	10
Shredded red pepper	10	10
pumpkin powder	-	3 ¹⁾ (15) ²⁾
green tea powder	-	2 ¹⁾ (3.2) ²⁾

¹⁾Weight of freeze-dried material

²⁾Weight of raw material

³⁾pumpkin powder and green tea powder (0.3%+0.2%) added mustard leaf *kimchi*

나) 소비자 관능검사

관능검사에 참가한 총 인원은 122명으로 보통 갓김치는 나이가 많은 세대들에게는 잘 알려져 있으나 젊은 층에서는 그렇게 대중적이지 못한 것이 사실이다. 그리고 갓김치의 기호성은 일반 김치와는 달리 개인의 성향이나 연령 등에 따라 차이가 크므로 연령별로 관능성의 차이를 비교하기 위해 30세를 기준으로 분류하였다. 즉 30세 이상의 소비자군이 50명, 30세 이하의 소비자군이 72명으로 분류되었으며 이들의 기호도 및 선호도의 차이를 비교하였다.

(1) 소비자 : 30세 이상

대 상 인 원	총 50명
성 별	남 : 2(4%), 여 : 48(96%)
고 향 (자 란 곳)	부산: 15명(30%), 경남: 18명(36%), 경북: 10명(20%), 기타: 7명(14%)

(가) 개인 성향조사

갓김치를 먹어본 경험	있다: 49명(98%), 없다: 1명(2.1%)
갓김치에 대한 기호도	매우좋음: 6명(12%), 좋음: 19명(38%), 보통: 20명(40%), 싫음: 4명(8%)
구입여부	예: 41명(82%), 아니오: 9명(18%)
구입시 가격정도	현재가격: 30명(60%), 기존의 10%인상: 19명(38%), 기존의 20%인상: 1명(2%), 기존의 30%인상: 0명

먼저 연령층이 높은 30세 이상의 소비자들은 갓김치를 먹어보지 못한 사람은 거의 없었으며 갓김치에 대한 기호도도 총 50명중 매우좋다가 6명(12%), 좋다가 19명(38%)로 싫다의 4명(8%)에 비해 좋다 이상이 25명(50%)이었으며 보통이 20명(40%)로 나타났다. 구입여부에 관한 질문에서도 시판된다면 구입하겠다가 41명(82%)로 구입하지 않겠다의 9명(18%)보다 아주 높았다. 구입시 가격에 대한 질문에서는 현재의 가격 수준이 적당하다는데 30명(60%)이 응답함으로써 과반수 이상을 차지하였다.

(나) 소비자 관능검사 결과

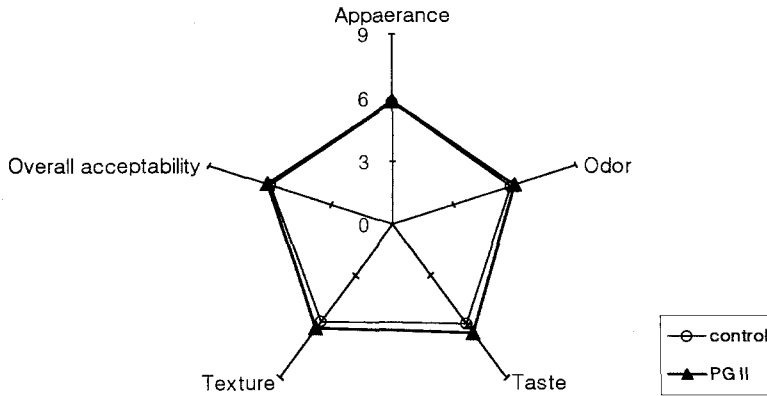


Fig.108. QDA profile of mustard leaf *kimchi* with added sub-ingredient during fermentation at 5°C after keeping at room temperature for 24 hours in 20 day.

Control : mustard leaf *kimchi*

PG II : pumpkin powder:green tea powder(0.3%:0.2%) added mustard leaf *kimchi*

소비자 기호도 조사에서는 전반적인 외관, 냄새, 맛, 질감, 종합적 평가 모두 높은 호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%로 첨가한 기능성 갓김치군에서 대조군에 비해 높은 점수를 얻었다. 특히 맛과 질감에 있어서는 높은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%로 첨가한 기능성 갓김치 군이 각각 6.33 ± 1.83 , 6.08 ± 1.83 인데 비해 대조군은 5.85 ± 1.71 , 5.69 ± 1.75 로 월등히 높았다.

(2) 소비자 : 30세 이하

대상인원	총 72명
성별	남 : 12(16.7%), 여 : 60(83.3%)
고향 (자란 곳)	부산: 60명(83.3%), 경남: 7명(9.7%), 경북: 1명(1.4%), 기타: 4명(5.6%)

(가) 개인 성향조사

갓김치를 먹어본 경험	있다: 62명(86.1%), 없다: 10명(13.9%)
갓김치에 대한 기호도	매우좋음: 3명(4.8%), 좋음: 22명(35.5%), 보통: 35명(56.5%), 싫음: 2명(3.2%)
구입여부	예: 45명(62.5%), 아니오: 27명(37.5%)
구입시 가격정도	현재가격: 30명(41.7%), 기존의 10%인상: 30명(41.7%), 기존의 20%인상: 12명(16.6%), 기존의 30%인상: 0명

30세 이하의 소비자들은 30세 이상의 소비자들에 비해 갓김치를 먹어보지 못한 사람이 총 72명 중 10명(13.9%)로 비교적 높았으며, 기호도에서는 좋다 이상이 25명(35.2%)로 30세 이상의 47.9%에 비해 낮게 나타났다. 구입여부에 관한 질문에서는 시판된다면 구입하겠다가 30세 이상이 81.2%였는데 비해 62.5%였고, 구입하지 않겠다가 30세 이상이 18.8%인데 비해 37.5%로 구입하지 않겠다가 조금 더 높게 나타났다. 구입시 가격에 대한 질문에서는 현재의 가격 수준이 적당하다는데 41.7%, 기존 가격의 10%인상까지가 41.7%로 동일한 응답을 하였다.

(나) 소비자 관능검사 결과

소비자 기호도 조사에서 전반적인 외관, 냄새, 맛, 질감, 종합적 평가 모두 30세 이상과 비슷하게 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%로 첨가한 기능성 갓김치군이 대조군에 비해 높은 점수를 얻었다. 특히 맛과 종합적 평가에서 늙은호박분말과 녹차분말 0.3%:0.2%로 첨가한 기능성 갓김치 군이 5.71 ± 1.95 , 5.88 ± 1.64 이고, 대조군은 5.50 ± 1.72 , 5.58 ± 1.62 로 다소 적은 차이나 기능성 갓김치 실험군이 높은 점수를 얻은 것으로 나타났다.

전체적으로 두 가지 시료중 하나를 선택하는 선호도조사에서는 전체 122명 중에서 늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2% 첨가군이 64명(52.5%)으로 대조군의 58명(47.5%)보다 근소한 차이나 선호도가 더 높게 나타났다.

대조군	58명(47.5%)
늙은호박분말과 녹차분말을 0.3%:0.2% 첨가군	64명(52.5%)

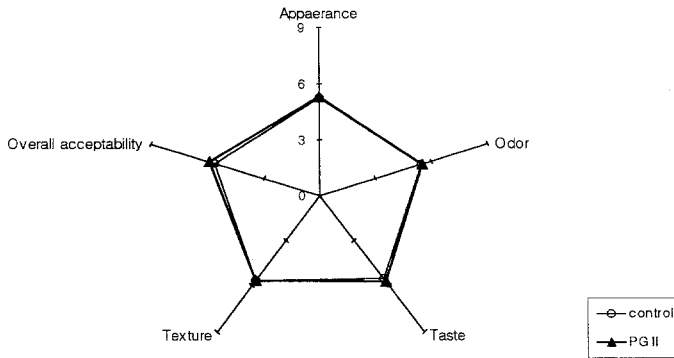


Fig.109. QDA profile of mustard leaf *kimchi* with added sub-ingredient during fermentation at 5°C after keeping at room temperature for 24 hours in 20 day.

P, PG I, PGII and G : see the legend in Fig 108.

관능검사 평가표

일시 : 2000년 12 월 일

◆안녕하십니까?

부산대학교 김치연구소에서 과학적인 연구를 통하여 피부 미용성 갓김치를 개발 하였습니다. 드셔 보시고 질문지 각 문항에 빠짐없이 답해 주시면 감사하겠습니다.

나이		성별	남 · 여		고향(자란곳)	
----	--	----	-------	--	---------	--

I. 개인 성향조사

1. 갓김치를 먹어본 적이 있습니까?

- ①예 ②아니오

2. 먹어본 적이 있다면, 갓김치를 얼마나 좋아 하십니까?

- ①매우 좋아한다 ②좋아한다 ③보통이다 ④싫어한다 ⑤매우 싫어한다

3. 과학적으로 효과가 입증된 피부미용성 갓김치를 판매한다면, 구입하겠습니까?

- ①예 ②아니오

4. 피부미용성 갓김치를 구입할 경우, 가격이 어느 정도까지면 적당하겠습니까?

- ①현재 상품화된 갓김치의 가격 ②기존 상품보다 10% 높은 가격
 ③기존 상품보다 20% 높은 가격 ④기존 상품보다 30% 높은 가격

II. 갓김치의 소비자 검사

1. 기호도 조사

1) 외관

대단히 싫음		싫음		싫지도좋지도않음		좋음		대단히좋음
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2) 냄새

대단히 싫음		싫음		싫지도좋지도않음		좋음		대단히좋음
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3) 맛

대단히 싫음		싫음		싫지도좋지도않음		좋음		대단히좋음
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4) 질감

대단히 싫음		싫음		싫지도좋지도않음		좋음		대단히좋음
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5) 종합평가

대단히 싫음		싫음		싫지도좋지도않음		좋음		대단히좋음
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. 선호도 조사

두 가지 김치중 어느 것이 더 좋습니까? _____

◆ 질문에 대해 주셔서 대단히 감사합니다.

제 4 절 향노화 B type 김치(향동맥경화성 김치) 개발

1. 레시피의 개발

절인배추에 대하여 갓잎 30중량%, 고춧가루 3.4% 및 마늘 3.1%의 양을 중량비로 첨가하였을 때 혈장 및 간의 지질저하 효과가 가장 높았으며, 새우젓과 까나리 액젓을 1:1의 비율로 사용하고 새우 우린 물로 양념베이스를 만들었을 때 김치가 담백하고도

깊은 맛은 내며, 김치의 외관도 윤기가 나며 먹음직스러웠다. 이러한 연구결과 개발된 동맥경화예방 기능성 배추김치의 레시피는 절인배추 70g, 절인갓 30g, 고춧가루 4.0g, 마늘 3.7g, 생강 0.2g, 새우젓 2.3g, 까나리액젓 2.3g, 찹쌀풀 1.3g, 설탕 1.0g, 새우우린물 4.3g 이다.

기능성 배추김치의 대량생산을 위해 김치의 절임 및 담금공정에 관하여 연구에서 음식의 염 농도는 혈압상승과 관계가 있으므로, 본 발명의 동맥경화 예방효과를 갖는 배추갓김치의 제조에서는 김치가 습습하다고 느껴지도록 절인 배추의 염도가 $2.0 \pm 0.1\%$ 가 되도록 절여준다. 즉, 배추는 $3 \times 4\text{cm}$ 로 절단하고, 갓잎은 약 4cm 길이로 절단한 다음, 배추 중량의 2배에 해당되는 10%(천일염(w) : 물(v)) 염수(수온 18℃)에서 배추를 2 ± 0.5 시간 동안 절인 후, 배추를 절인 동일염수에서 갓을 20 ± 5 분 동안 절이고, 2번 세척을 한 다음, 2시간 동안 자연법으로 탈수를 하고, 준비된 양념을 넣고 김치를 담구어 김치의 최종 염도가 $2.2 \pm 0.1\%$ 가 되도록 하였다. 제조된 배추갓김치는 실온에서 일정 시간(여름철 3시간, 겨울철 15시간) 둔 다음 5℃에서 저장하였을 때 김치의 적성이 가장 우수하였다.

2. 산업화를 위한 담금공정의 개발

배추김치에 동맥경화를 예방하는 효과가 있음을 기초 연구를 통하여 확인하였기에, 김치의 동맥경화를 예방성을 증진할 수 있으면서, 맛, 향미, 질감 등의 기호도가 우수한 기능성 배추김치를 제조하기 위한 연구를 실시하였다. 갓(mustard leaf)은 개자(Brassica juncea)의 잎으로서, 종래에는 이를 단독사용하여 김치를 제조하여 왔다. 특히 갓에 포함된 이소티오시아네트, 각종 아미노산 및 핵산 성분에 의해 특쓰는 향취와 갓 특유의 감칠맛을 내기 때문에 식욕을 자극하고 입맛을 돋우기 위한 별미로서 제조되어 왔다. 그러나, 동맥경화를 예방할수 있는 기능성 김치의 제조를 위한 부재료로서 갓을 첨가하였다. 여러 가지 재료들 중에서 갓을 첨가하는 이유는 갓은 동맥경화를 예방할 수 있으면서 배추김치의 적성을 저해하지 않아 기호성이 우수하기 때문이다. 갓의 첨가량은 갓의 첨가량이 많으면 많을수록 항산화효과가 증가하여 동맥경화 예방 효과가 우수하지만, 산도가 증가하고, 맛, 향미, 외관 등의 기호성이 나빠 배추김치로서 적합하지 않게 되기 때문에, 김치 총 중량에 대하여 25-30%의 양으로 첨가하는 것이 바람직하다. 김치를 제조하기 위해서는 배추, 갓 뿐만 아니라 고춧가루, 마늘, 젓갈류 등이 필요한데, 특히 고춧가루와 마늘의 경우에는 동맥경화 예방효과에 영향을 미칠 뿐만 아니라 김치의 관능성에도 영향을 미치는 재료이다. 따라서, 이들의 첨가량이 중요한데, 김치 총 중량에 대해 고춧가루 2-4%, 마늘 2-4%를 첨가할 때 동맥경화 예방효과 및 기호성 면에서 가장 바람직하다. 배추갓김치 제조방법에서, 젓갈류는 통상의 김치제조방법에 사용되는 새우젓, 까나리액젓, 멸치젓, 찹쌀풀등을 사용할 수있지만, 특히 새우젓과 까나리 액젓을 1:1의 비율로 사용하였을 때 김치에

서 젓갈 냄새가 가장 적고, 맛이 깨끗하였다. 아울러, 양념베이스 또한 통상의 김치 제조방법에서 사용되는 새우우린 물, 멸치 우린물, 고기 우린물 등을 선정하여 사용할 수 있지만, 새우 우린물로 양념 베이스를 만든 김치가 담백하고도 깊은 맛을 내며, 김치의 외관도 윤기가 나며 먹음직스럽기 때문에 바람직하다.

배추갓김치 제조 공정

<p>주재료 구입 및 선별 배추(Korean cabbage)는 부산 농산물 시장에서 구입(중량 3kg 내외) 갓(Mustard leaf)은 부산 돌산갓 직판장에서 구입(잎 부분만 사용)</p>
<p>부재료 전처리 고춧가루는 충북제천 봉양농산 박달재 태양초 고춧가루 그 외 부재료는 인근 재래시장에서 구입</p>
<p>절임 배추는 3cm×4cm의 크기로 잘라 10% 소금물(수온 10℃)에 2시간동안 절임 갓은 잎부분만을 사용하여 배추를 절인 동일염수에 20분간 10% 소금물에 절임</p>
<p>세척 고인물에서 2번 반복세척. 세척시 조직이 치이지 않게 함.</p>
<p>탈수 2시간 동안 자연 탈수를 실시. 지나친 탈수는 갓의 외관 및 조직감에 나쁜 영향을 미치므로 탈수 시간을 잘지킴.</p>
<p>기능성 증진 부재료 전처리 항산화성이 높은 갓의 잎부분만 3cm×4cm로 썰어 첨가함</p>
<p>양념 배합 고춧가루, 마늘, 생강, 새우젓, 까나리 액젓, 찹쌀풀, 설탕, 새우 우린물 등을 모두 넣어 고루 잘 섞음.</p>
<p>배추,갓에 양념 버무리기 겹쳐진 갓은 잘퍼서 골고루 양념을 버무리며. 골고루 섞이도록 버무리며 너무 힘을 주지 않도록함</p>
<p>충진 및 포장 제조된 김치를 일정량 항아리에 담고 포장</p>
<p>저장 상온에서 24시간 방치 후 5℃에서 숙성.</p>

3. 소비자 기호도 결과

항동맥경화 김치의 소비자 기호도 조사를 실시하여 일반 김치로서의 적응성을 검토하였다. 대조군 김치(정량적으로 표준화한 레시피로 담근 배추 김치)와 항동맥경화 김치(배추갓 김치)를 담근 후 pH가 4.3 정도에 도달하였을 때 20대에서 60대 사이의 성인 240명을 대상으로 선호도 조사를 한 결과를 표 2에 나타내었다. 김치의 맛이 보통 김치 보다 더 좋다고 응답 한 수가 66% 이고 이를 연령별로 살펴보면 40대 이상의 대상자는 80.3%가 맛이 더 좋다고 응답하였다. 동물실험과 임상실험에서 기능성 김치 섭취시 동맥경화 예방 효과가 있다는 과학적인 근거가 있으면 믿겠느냐는 질문에 63%가 믿을 수 있다고 응답하였고, 만약 건강증진을 위해 일반 김치보다 비싸도(15%이상) 항동맥경화 김치를 구입할 의사가 있느냐는 질문에는 79.4%가 구입하겠다고 응답하여 개발된 항동맥경화 김치의 상품성이 있음을 확인하였다.

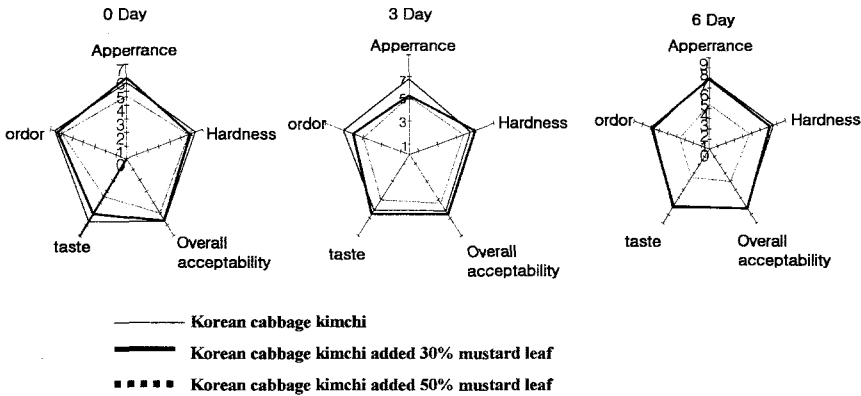


Fig. 92. QDA profile of various kinds of Korean cabbage kimchi fermented at 5°C for 6 days

[표 1] 항동맥경화 김치 레시피

	정량적으로 표준화한 김치 ¹⁾		항동맥경화 김치 ²⁾	
	(g)	(%)	(g)	(%)
절인 배추	100.0	81.6	70.0	59.4
절인 갓	-	-	30.0	25.4
고춧가루	2.5	2.0	4.0	3.4
마늘	1.4	1.1	3.7	3.1
생강	0.6	0.5	0.2	0.2
새우젓	-	-	2.3	1.9
멸치젓	2.0	1.6	-	-
까나리 액젓	-	-	2.3	1.9
참쌀풀	-	-	1.3	1.1
설탕	1.0	0.8	1.0	0.8
무	13.0	9.8	-	-
파	2.0	1.6	-	-
새우 우린물	-	-	4.3	3.6

¹⁾ 조 등이(1999) 요리책, 문헌 등의 배추 김치 담금법에 사용된 부재료의 양을 평균하여 정량적으로 표준화한 배추김치 레시피

[표 2] 향동맥 경화 김치의 소비자 선호도 조사 결과(n=240)

	연 령		
	20~40대(n=177)	40~60대(n=63)	합 계(n=240)
맛이 보통 김치보다 더 좋다	108(61.02%)	51(80.95%)	159(66.25%)
과학적 근거가 있으면 동맥 경화 예방 효과가 있다고 믿는다	107(60.45%)	46(73.02%)	153(63.75%)
비싸도(15%) 기능성 김치를 구입하겠다	136(76.84%)	55(87.30%)	191(79.58%)

제 5 절 결론

앞에서와 같이 김치의 항산화성, 피부미용증진 특성 그리고 향동맥경화 기능성 등에 대한 일련의 이론에 대한 기초 연구와 품질개선 및 제조방법에 대한 기초연구를 바탕으로 이들의 산업화에 대한 연구를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 향노화성이 높은 갓김치를 기본 모델로 하여 이에 대한 품질개선 실험을 행하여 향노화 AI형 갓김치 및 향노화 AII형 갓김치를 개발하였다. 그리고 이들 향노화 AI 및 AII 갓김치의 최적절임 조건, 발효방법 등 제조공정에 따른 적정조건을 확립하였고 향노화 AI 갓김치(항산화 기능성 김치) 및 향노화 AII형 갓김치(피부미용증진김치)의 상품화를 위한 상품적응성 및 기호도 테스트를 실시하여 관능적인 특성을 조정하였다. 한편 향노화 B형 김치(향동맥경화성 김치)의 산업화를 위한 제조방법 확립과 공정최적화에 의한 공정개선을 행하였다. 그리고 상품적응성 및 기호도 테스트를 행하여 품질조정을 기할 수 있었다.

제 6 절 참고문헌

1. Dugan, L.R., Natural antioxidants, in Autoxidation in Food and Biological Systems (M.G. Simic and M. Karel, eds), Plenum Press, New York, 261(1980)
2. Kim, S. J. and Park, K. H. : Retardation of kimchi fermentation by extracts of *Allium tuberosum* and growth inhibition of related microorganisms. *J. Food Sci, Technol.* , 27, 813-818(1995)
3. 임종락, 박현모, 한홍의 : 김치에 서식하는 gram 양성 세균의 분리 및 젖산균의 동정. *한국 미생물학회지*, 27, 404(1980)
4. 계인숙 : 녹차 Polyphenol의 Peroxynitrite 및 활성산소 소거작용에 관한연구.

- 부산대학교 석사학위논문(1999)
5. Borenstein, B. and Bunnell, R. H. : Carotenoids, properties and utilization in foods. *Advances in Food Research*, 15, 195(1966)
 6. Yong-Kon Park, Hwan-Soo Cha, Mee-Weon Park, Yoon-Han Kang and Ho-Moon Seog : Chemical Components in Different Parts of Pumpkin, *J. Korean Soc. Food Sci, Nutr.* 26(4), 639-646(1997)
 7. 현윤애 : 갓김치의 담금법과 발효특성에 관한 연구 : 부산대학교 석사학위논문(2000)
 8. 김광욱, 김상숙, 성내경, 이영춘 공저 : 관능검사 방법 및 응용. 신광출판사
 9. 신호선 : 식품분석 이론과 실험, 신광출판사 91(1983)
 10. 김재선, 박근형 : 부추추출물의 김치발효지연 및 관련 미생물 증식억제. *한국식품과학회지*, 27, 814(1995)
 11. James, G. C. and Sherman, N. : *Microbiology : A laboratory manual*, 2nd., the Benjamin/ Cummings Pub., New-York, 76(1987)
 12. 노홍균, 이명희, 이명숙, 김순동 : 김치액의 색상에 의한 배추김치의 품질평가. *한국양양식량학회지*, 21(2), 163-170(1992)
 13. 이철호, 황인주, 김정교 : 김치제조용 배추의 구조와 조직감 측정에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 20, 742-748(1988)
 14. 신동화 : 공장 김치의 발효온도 및 포장방법별 성분과 미생물의 변화. 김치의 과학, *한국식품과학회편*, 서울, 82(1995)
 15. Eun-Seung Song : Antioxidative Characteristics of Chlorophylls and Carotenoids in Mustard Leaf Kimchi. Graduate School, Pusan National University(1997)
 16. Il-Kyung Kim, Seung-Ryeul Shin, Joo-Baek Lee and Kwang-Soo Kim : Changes on the Physical and Sensory Characteristics of Dongchimi Added with Ginseng and Pineneedle. *J. Korean Soc. Food Sci, Nutr.*, 26(4), 575-581(1997)
 17. Bok-Mi Ryu, Young-Soo Jeon, Gap-Soon Moon and Young-Sun Song : The Changes of Pectic Substances and Enzyme Activity, Texture, Microstructure of Anchovy Added Kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25(3), 470-477(1996)
 18. Young-Suk Joo, Surk-Gou : Changes in Major Taste Components and Microflora in Mustard Leaf Kimchi. during Fermentation. 한국음식문화연구원. Sunchun National University(1994)
 19. 송은승 : 갓김치에 함유된 Chlorophylls 및 Carotenoids의 항산화 특성. 부산대학교 박사학위 논문(1997)
 20. 류복미 : 김치식이가 Hairless Mouse의 피부노화 억제에 미치는 영향.

부산대학교 박사학위논문(2000)

21. 엄수연 : 페놀화합물의 효소적 갈변반응생성물질의 항산화 특성. 부산대학교 박사학위 논문(1995)
22. 한국영양학회 : 한국인 영양 권장량. 제7차 개정(2000)
23. 농촌진흥청 농촌생활연구소 : 식품 성분표. 제5차 개정판(1996)
24. 송은승 : 갓김치에 함유된 Chlorophylls 및 Carotenoids의 항산화 특성. 부산대학교 박사학위논문 (1997)
25. 이정수 : 된장에 함유된 페놀물질의 항산화 작용 특성. 부산대학교 박사학위논문 (1997)
26. Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E. : Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 43, 556 (1978)
27. White, R. C., Jones, I. D. and Eleanor, G. : Determination of chlorophyll, chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in plant material. J. Food Sci., 28, 431~436 (1963)
28. 돌산갓 재배기술, 여천군 농촌지도소
29. 김우정, 구경형, 조한옥 : 김치의 절임 및 숙성과정 중 물리적 성질의 변화. 한국식품과학회지, 20, 483~487 (1988)
30. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사, 학연사, p192 (1989)
31. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedure of statistics, Mcgraw-Hill kogakusha, Ltd., Todyo, p. 96 (1980)
32. 황경미 : 깍두기의 담금방법 표준화와 암예방효과. 부산대학교 석사학위논문 (1999)
33. 채서일, 김범중 : SPSS/PC+를 이용한 통계분석, 범문사, 서울, 66(1989)