

겨우살이 첨가 김치의 발효양상과 항돌연변이 및 암세포성장저해효과

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

최선미 · 길정하 · 전영수 · 박건영

Fermentation Characteristics, and Antimutagenic and Anticancer Effects of Mistletoe Added *Kimchi*

Sun-Mi Choi, Jeung-Ha Kil, Young-Soo Jeon and Kung-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Fermentation characteristics, and antimutagenic and anticancer effects of mistletoe added *kimchi* were studied. The changes in pH, acidity and the value of prevalence test of the mistletoe added *kimchi* during the fermentation were determined. Ames antimutagenicity test against aflatoxin B₁ (AFB₁) and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) in *Salmonella typhimurium* TA100, and MTT assay using HT-29 human colon carcinoma cells and AGS human gastric adenocarcinoma cells were employed to test the chemopreventive effect of the *kimchis*. Mistletoe added *kimchis* were fermented at 15°C for 1 days and then ripened at 5°C to reach optimum pH of 4.3. Mistletoe added *kimchis* fermented slowly compared to the control *kimchi* when the changes of pH and acidity of the *kimchis* were compared. Sour flavor of mistletoe in the *kimchis* was decreased during the fermentation. Mistletoe added *kimchis* exhibited higher inhibitory effect against the mutagenicities induced by AFB₁ and MNNG in the Ames test than the control *kimchi*. Especially, 2% mistletoe added *kimchi* showed the highest inhibitory effect (75%, 68%) in the Ames test ($p < 0.05$). Two % mistletoe added *kimchi* showed the highest anticancer effect against HT-29 human colon cells ($p < 0.05$). Mistletoe added *kimchis* exhibited significantly higher anticancer effect than the control *kimchi* in AGS cells, too, however, there was no significant different effect among the different levels of mistletoe (0.5 ~ 2.0%) addition ($p < 0.05$). It can be concluded that addition of mistletoe in *kimchi* increased preservation period of the *kimchi* and enhanced antimutagenic and anticancer effects of the *kimchi*.

Key Words: *Kimchi*, Mistletoe, Ames mutagenicity test, MTT assay

서 론

김치는 배추 등의 주재료와 고춧가루, 마늘, 파, 생강 등의 부재료로 제조된 우리나라 고유의 저장 발효식품으로 한국인의 식생활에서 큰 비중을 차지하고 있다. 김치는 주재료가 채소이므로 채소가 갖는 비타민과 무기질의 조절영양소로서의 역할 및 식이섬유소의 공급원 그리고 발효과정에서 생성된 맛, 기능성물질, 젖산균 및 유기산에 의해 체내에서 중요하게 작용한다.¹⁾ 즉, 채소는 비타민 C, β -carotene, flavonoid, chlorophyll, 섬유소 등이 풍부하며 발효과정에서 생성되는 여러 젖산균 등에 의하여 항산화작용,²⁾ 항노화작용,³⁾ 피부노화방지,⁴⁾ 혈전응고방지,⁵⁾ 다이어트 효과,⁶⁾ 면역기능증진,⁷⁾ 항돌연변이성,⁸⁾ 항암성⁹⁾ 등의 기능성을 가지고 있다고 알려져 있다. 선행연구에서 일반 김치에 천일염 대신 구운 소금을 사용하고 다른 부재료를 첨가하거나 함량을 증가시킴으로 암예방기능성이 더욱 증진된 일반인들을 위한 암예방기능성김치를 제조하였고,^{10,11)} 또한 암환자를 위한 김치개발도 시도하였다.¹²⁾ 그 외에도 김치에 녹차, 키토산, 당귀잎, 버섯, 청각, 양파 등의 첨가 및 함량을 조절하여 항산화, 항돌연변이, 항암, 면역증진 등의 기능성을 높인 여러 연구가 있다.^{13,14)}

겨우살이(mistletoe, *Viscum album coloratum*)는 뽕나무, 밤나무 등의 가지에 기생하는 야생 상록 수로서 예로부터 동서양에서 갖가지 질병치료 즉, 고혈압, 동맥경화증, 암 등에 대하여 효과가 있는 신비의 약제로 사용하여 왔다.¹⁵⁾ 이 식물은 최근 높은 인체 면역 증강효과와 항암 바이러스효과가 있는 것으로 밝혀져¹⁶⁾ 국내외에서 주목을 받고 있다. 겨우살이는 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있으며¹⁶⁾ 동물 및 인간에 대한 임상 실험결과 종양세포에 대하여 직접, 간접적으로 대응하는 macrophage 및 자연살해세포의 활성을 증가시킴으로써 종양세포의 성장을 억제하고¹⁷⁾ 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾ 겨우살이에는 루페올, 아세틸콜린, 베타아미린, 렉틴, 플라보노이드 성분 등이 함유되어 있으며 가장 주목할 만한 것은 렉틴 성분이다.¹⁹⁾ 렉틴은 인체 내의 암세포를 제

거하는 NK cell 활성화에 가장 중요한 역할을 하는 물질이다.²⁰⁾

본 연구에서는 암예방 및 항암기능성이 더욱 증진된 김치를 제조하기 위하여 겨우살이를 김치에 첨가하여 김치의 발효양상에 미치는 영향을 조사하고 암예방기능성도 높으면서 기호도도 높은 겨우살이 첨가 농도를 조사하였다. Ames test를 이용하여 AFB₁과 MNNG에 대한 이들 김치의 항돌연변이효과를, MTT assay를 이용한 HT-29 인체결장암세포와 AGS 인체위암세포에 대한 암세포성장저해효과의 기능성을 연구하여 겨우살이를 김치에 첨가함으로써 김치의 발효와 기능성에 미치는 효과를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 재료

배추는 가락 신1호, 짓갈은 청정멸치액젓((주)대상), 고춧가루는 영양농협청결고춧가루 가공공장에서 구입하여 사용하였다. 무, 파, 마늘, 생강, 갖은 부산 부전시장에서 구입하였다. 소금은 NaCl : KCl=7 : 3비율로 혼합하여 1번 구운 소금을 사용하였고¹⁰⁾ 겨우살이 물추출물(제품명: 미슬로씨)은 주식회사 미슬바이오텍(경북, 포항)에서 선사받았다. 겨우살이 물추출물은 겨우살이를 증류수에 4시간동안 교반한 후 여과한 액을 14,800 rpm에서 20분간 원심분리하여 취한 상등액을 여과하여 동결건조하였다.²¹⁾

2) 김치제조 및 시료의 추출

10% 염용액을 만들어 배추를 각각 10시간 염절입한 후 씻어서 김치를 제조하였다. 겨우살이 물추출물의 첨가비율은 겨우살이 물추출물이 효과를 내는 농도인 10 mg/mouse를 이용하여¹⁷⁾ 항돌연변이 및 암세포성장저해 등의 기능성 효과가 나타날 것으로 생각되는 0.05, 0.1, 0.2%를 첨가하여 김치를 제조하였다. 김치는 15°C에서 1일간 발효한 후 5°C에서 발효시키면서 pH 및 산도의 변화를 관찰하였다. 김치재료와 겨우살이의 첨가비율은 배추 100에 대하여 고춧가루 2.5, 마늘 2.8, 생강 0.6, 무 11.0, 설탕 1.0, 잔파 2.0, 초피 0.1, 배 2.8, 버섯·다시마물 5.0과 함께 겨우살이 물추출

물을 0.05, 0.1, 0.2% 첨가하여 김치를 제조하였다. 적숙기의 김치(pH 4.3)는 동결건조한 후 시료를 마쇄하여 분말로 조제하고 분말시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 2회 반복하여 여과한 후 회전식 진공 농축기로 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이들 추출물들은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다.

3) 김치발효 중 pH 및 산도 변화측정

김치의 pH는 pH meter (Corning 220, USA)로 실온에서 측정하였다. 산도는 시료 20 ml를 20배 희석하여 여기에서 10 ml를 취하여 AOAC방법²²⁾으로 측정하였다. 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 1 ml 첨가하고 0.1 N NaOH로 적정하여 분홍색을 띠는 점을 종말점으로 하였다. 적정값은 lactic acid로 환산하고 함량 %로 나타내었다.

$$\text{Lactic acid (\%)} = \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times \text{normality of NaOH} \times 0}{\text{weight of sample (g)}}$$

4) 반복화된 randomized block design에 의한 관능검사

반복된 랜덤화 완전 블럭 계획(replicated randomized complete block design)²³⁾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 싫고, 9에 가까울수록 극도로 좋은 것으로 나타내었다. 또 객관적인 평가로는 후각적 지각인 신내(sour smell), 군덕내(moldy smell), 쓴내(bitter smell)와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 군덕맛(moldy flavor), 쓴맛(bitter flavor) 그리고 질감으로 경도(hardness)를 평가하였으며, 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고, 9에 가까울수록 극도로 강하게 감지하는 것으로 나타내었다. 후각적 지각으로 코로 감지되는 것으로 평가하였고, 미각적 지각은 여러 차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 경도는 앞니를 사용하여 섬유질과 동일한 방향으로 2~3회 씹는데 드

는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 신내와 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 쓴내와 쓴맛은 초록색 풀에서 나는 쓴맛이나 수렴성을 연상케 하는 정도, 군덕내와 군덕맛은 오래된 김치에서 나는 불쾌한 정도로 정의하였다.²³⁾

5) Ames test

간접돌연변이 유발물질인 aflatoxin B₁ (AFB₁)과 직접돌연변이 유발물질 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA)에서 구입하여 각각 DMSO와 증류수에 녹여 사용하였다. 사용 균주로는 *Salmonella typhimurium* TA100으로 미국 California대학 B. N. Ames박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그리고 이 실험균주는 매 실험직전 histidine요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. AFB₁ 돌연변이원을 활성화시키기 위하여 Maron과 Ames의 방법²⁴⁾에 따라 간의 microsomal 효소화합물인 S9 mixture를 조제하였다. Preincubation test는 S9 mix 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주($1-2 \times 10^9$ cell/ml) 0.1 ml, 희석된 시료(50 μ l)와 돌연변이 유발 물질(50 μ l)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 45°C의 top agar 2 ml씩을 각 tube에 붓고 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. MNNG는 S9 대신에 인산용액 0.5 ml를 이용하여 위와 같은 방법으로 하였다. 한편, 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다.²⁵⁾

6) MTT assay

세포배양을 위해 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), 0.05% trypsin- 0.02% EDTA 그리고 100 units/ml penicillin-streptomycin은 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양은 CO₂ incubator (Forma, USA)를 사용하였다. HT-29 인체결장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell)와 AGS 인체위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)는 한국세포주은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS세

포는 100 units/ml의 penicilin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 암세포를 96 well plate에 well 당 1×10⁴ cells/ml가 되도록 seeding하고 시료를 농도별로 첨가한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 72시간 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 20μl를 첨가하고 4시간 동안 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{26,27)}

7) 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.²⁸⁾

결 과

1) 김치의 발효기간에 따른 pH 및 산도의 변화

신내가 강한 겨우살이를 첨가한 김치의 발효에 따른 pH 및 산도의 변화를 알아보았다(Table 1). 담근 직후의 pH 변화를 보면 겨우살이를 첨가한 김치는 신내가 강하였지만 pH에서는 대조군김치와 겨우살이를 첨가한 김치간에 pH의 차이는 크게 없었다. 발효가 진행됨에 따라 대조군김치의 발효속도보다 겨우살이를 첨가한 김치의 발효속도가 지연되었으며 3주째의 pH를 보면 대조군김치가 4.30인 것에 비하여 겨우살이를 첨가한 김치의 pH는 높았으며 첨가량이 많아짐에 따라 pH는 더욱 서서히 감소되었고 겨우살이를 0.2% 첨가한 김치의 pH는 4.43을 나타내었다. 적숙기를 지나면서 겨우살이를 첨가한 김치는 더욱 서서히 발효가 진행되었으며 발효 5주째에도 대조군김치의 pH가 4.09인 것에 비해 겨우살이를 첨가한 김치는 pH가 높았다(4.12~4.20).

산도의 변화에서도 pH의 변화와 마찬가지로 처음에는 대조군김치와 겨우살이를 첨가한 김치간의 산도에는 크게 차이가 없었지만 발효가 진행됨에 따라 겨우살이를 첨가한 김치의 산도가 대조군김치의 산도보다 낮았으며 겨우살이의 농도가 높아질수록 산도도 낮게 나타났다. pH의 변화와 마찬가지로 3주째를 보면 항암김치가 0.71%인

Table 1. Changes of pH and acidity in mistletoe added kimchi during fermentation at 5°C after 1 day ripening at 15°C

	Fermentation time (week)	Control kimchi	Mistletoe added kimchi (%)		
			0.05	0.1	0.2
pH	0	5.72	5.72	5.71	5.71
	1	5.31	5.31	5.32	5.32
	2	4.82	4.94	4.95	5.02
	3	4.30	4.35	4.40	4.43
	4	4.20	4.22	4.29	4.32
	5	4.09	4.12	4.15	4.20
Acidity (%)	0	0.31	0.31	0.31	0.32
	1	0.34	0.36	0.31	0.31
	2	0.54	0.50	0.48	0.45
	3	0.71	0.68	0.68	0.60
	4	0.78	0.75	0.73	0.71
	5	0.89	0.85	0.83	0.78

데 비하여 겨우살이를 첨가한 김치의 산도는 0.60~0.68%로 낮았다. 겨우살이의 첨가로 인하여 김치의 발효속도가 감소되어 겨우살이첨가로 발효가 억제되는 것으로 나타났다(Table 1).

2) 관능검사

겨우살이를 첨가한 김치와 대조군김치의 관능검사 결과를 보면 외관에서는 거의 차이가 없었고 신내에서는 겨우살이추출물 자체가 신내가 강하였기에 관능검사에서도 대조군김치의 5.2보다 겨우살이의 첨가농도에 따라 신내를 느끼는 정도가 점차 증가하여 겨우살이를 0.1%, 0.2% 첨가한 김치는 5.6으로 신내를 조금 더 느꼈다. 신맛도 신내와 마찬가지로 겨우살이 첨가농도의 증가에 따라 신맛을 느끼는 정도도 다소 증가하여 대조군김치가 5.6인데 비하여 겨우살이를 0.2% 첨가한 김치는 5.9를 나타내었다. 대조군김치가 신맛이 약해서 겨우살이를 첨가한 김치보다 소금의 KCl에 의한 쓴맛이 더 감지되는 것으로 나타났다. 경도에서는 김치간에 차이가 없었고 종합적인 평가에서는 겨우살이를 0.05% 첨가한 김치가 6.3으로 선호도가 가장 높았으나 대조군김치와 겨우

살이 0.1% 첨가한 김치는 6.2였고 겨우살이를 0.2% 첨가한 김치는 6.1로 각 김치군간에 차이가 크게 없었다(Table 2). 따라서 김치에 신내가 강한 겨우살이를 첨가하면 발효초에는 신내가 강하게 나지만 김치가 발효하면 김치의 발효에 의한 신내와 조화를 이루어 대조군김치와 차이가 없으며 소금의 KCl에 의한 쓴맛을 겨우살이의 신맛이 약하게 함으로써 김치의 쓴맛이 대조군김치보다 약하게 감지되었다.

3) 항돌연변이효과

AFB₁에 대한 겨우살이 첨가김치의 항돌연변이 효과를 보면(Table 3), 1.25 mg/plate의 낮은 농도의 김치에서보다 2.5 mg/plate의 높은 농도에서 항돌연변이효과가 높았다. 2.5 mg/plate농도로 처리했을 때 대조군김치는 55%의 항돌연변이효과를 보인 반면, 겨우살이를 첨가한 김치는 더 높은 항돌연변이효과를 보였다. 즉, 겨우살이 0.05% 첨가 김치는 항돌연변이효과가 67%, 겨우살이 0.1% 첨가한 김치는 70%, 겨우살이 0.2% 첨가한 김치는

75%로 농도가 증가함에 따라 항돌연변이효과도 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 이 실험으로 대조군김치에 겨우살이의 첨가는 항돌연변이효과를 증대시킴을 알 수 있었다.

한편, MNNG에 대한 항돌연변이효과는 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과와 비슷한 효과를 보였으나 AFB₁에 대한 항돌연변이효과보다는 다소 낮았다.

Table 2. QDA profile of optimally ripened mistletoe added kimchi (pH 4.3) fermented at 5°C after 1 day ripening at 15°C

	Control kimchi	Mistletoe added kimchi (%)		
		0.05	0.1	0.2
Apper ance	6.5±0.7	6.5±0.2	6.2±0.5	6.2±0.6
Sour smell	5.2±0.9	5.5±0.8	5.6±0.6	5.6±0.4
Green smell	3.1±0.1	2.2±0.1	2.0±0.2	2.0±0.2
Moldy smell	2.0±0.2	2.3±0.3	2.6±0.4	2.6±0.3
Sour flavor	5.6±0.7	5.8±0.5	5.8±0.6	5.9±0.4
Bitter flavor	1.8±0.2	1.5±0.4	1.5±0.1	1.4±0.2
Moldy flavor	2.5±0.3	2.8±0.5	3.3±0.2	3.3±0.2
Hardness	6.3±1.1	6.0±0.9	6.2±1.3	6.1±1.0
Overall acceptability	6.2±0.6	6.3±0.9	6.2±1.1	6.1±0.8

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, chinese pepper smell, sour flavor, moldy flavor, chinese pepper flavor and hardness)

Table 3. Antimutagenic effect of methanol extracts from mistletoe added kimchi (pH 4.3) against aflatoxin B₁ (AFB₁, 2.0µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of sample, mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	98±4	
Control (AFB ₁)	135 ⁷ ±44a	
Control kimchi	797±19 ^b (44)	662±33 ^b (55)
Mistletoe added kimchi (addition %)	0.05 659±11 ^c (55)	511±37 ^c (67)
	0.1 619±30 ^{bc} (59)	475±21 ^{bc} (70)
	0.2 497±26 ^d (68)	412±10 ^d (75)

The values in parentheses are the inhibition rates (%)
^{a-c}Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test

Table 4. Antimutagenic effect of methanol extracts from mistletoe added kimchi (pH 4.3) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.43µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate (level of sample, mg/plate)	
	1.25	2.5
Spontaneous	89±7	
Control (MNNG)	134 ⁹ ±52a	
Control kimchi	829±20 ^b (40)	680±25 ^b (52)
Mistletoe added kimchi (addition %)	0.05 755±10 ^c (46)	586±14 ^c (60)
	0.1 703±19 ^d (51)	524±13 ^d (65)
	0.2 665±14 ^e (54)	483±11 ^e (68)

The values in parentheses are the inhibition rates (%)
^{a-c}Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple test

1.25 mg/plate의 낮은 농도에서보다 2.5 mg/plate의 높은 농도에서 높은 항돌연변이효과를 보였다. 2.5 mg/plate 처리농도에서 대조군김치는 52%의 항돌연변이효과를 보인 반면, 겨우살이의 첨가김치는 겨우살이의 첨가량이 증가함에 따라 항돌연변이효과가 높아졌으며 특히, 겨우살이가 0.2% 첨가된 김치는 68%의 항돌연변이효과를 나타내며 다른 군과도 유의적인 차이를 보였다(Table 4, $p < 0.05$).

4) 암세포성장저해효과

HT-29 인체결장암세포에서의 암세포성장저해효과를 보면(Table 5), 100 μ g/assay의 낮은 농도의

김치에서보다 200 μ g/assay의 높은 농도의 김치에서 암세포성장저해효과가 높았다. 대조군김치가 69%의 암세포성장저해효과를 보인 반면 겨우살이를 첨가한 김치는 높은 암세포성장저해효과를 나타내었는데 겨우살이 첨가농도가 0.05, 0.1, 0.2%로 증가함에 따라 92, 93, 96%의 증가를 보였으며 겨우살이 0.05%와 0.1% 첨가한 김치간에는 유의적인 차이가 없었으나 겨우살이를 0.2% 첨가한 김치에서는 96%로 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

AGS 인체위암세포에 대한 암세포성장저해효과는 HT-29 인체 결장암세포에서의 암세포성장저해효과보다 조금 높은 경향을 보였다. 200 μ g/assay의 높은 처리농도에서 대조군김치는 70%의 암세

Table 5. Inhibitory effect of methanol extracts from mistletoe added *kimchi* (pH 4.3) on the growth of HT-29 human colon cancer cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, μ g/assay)	
	100	200
Control	0.510 \pm 0.002a	
Control <i>kimchi</i>	0.262 \pm 0.007 ^b (48)	0.158 \pm 0.002 ^b (52)
Mistletoe added	0.05	0.055 \pm 0.003 ^c (89)
<i>kimchi</i> (addition %)	0.1	0.050 \pm 0.006 ^c (90)
	0.2	0.032 \pm 0.002 ^d (94)

The values in parentheses are the inhibition rates (%)

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

Table 6. Inhibitory effect of methanol extracts from mistletoe added *kimchi* (pH 4.3) on the growth of 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)	
	50	100
Control	0.533 \pm 0.005 ^a	
Control <i>kimchi</i>	0.373 \pm 0.007 ^b (30)	0.161 \pm 0.011 ^b (70)
Mistletoe added	0.05	0.048 \pm 0.004 ^c (91)
<i>kimchi</i> (addition %)	0.1	0.047 \pm 0.003 ^c (91)
	0.2	0.028 \pm 0.005 ^d (95)

The values in parentheses are the inhibition rates (%)

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

포성장저해효과를 보인 반면, 겨우살이를 첨가한 김치는 첨가 농도에 따른 유의적인 차이 없이 모두 97%의 높은 암세포성장저해효과를 보였다 (Table 6, $p < 0.05$).

고 찰

김치의 재료들은 주로 채소로서 그 자체로도 비타민, 무기질, 섬유소, phytochemical 등이 다량 함유되어 있어서 높은 암예방 및 항암기능성을 가지고 있으며^{1,8,9)} 부재료로 사용되는 고춧가루, 마늘, 생강 등의 함량을 증가시킨다든지, 키토산, 초피, 녹차, 갓, 청각, 버섯, 부추, 양파 등의 부재료를 첨가함으로써 암예방 및 항암기능성을 더욱 증진시킬 수 있으며 이에 관한 많은 연구들이 있다.^{11~14)}

본 연구에서는 종양세포에 대하여 직접, 간접적으로 대응하는 macrophage 및 자연살해세포의 활성을 증가시킴으로서 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고된¹⁸⁾ 겨우살이를 암환자를 위한 김치에 첨가하여 김치를 제조하였다. 겨우살이는 여러 종류의 나무를 숙주로 하여 생장하는 반기생식물로서 세계 전역에는 30속 1,500여종의 식물이 있는 것으로 알려져 있으며 유럽 뿐만 아니라 우리나라에서도 민간약제로 사용되어 왔다.²⁹⁾ 우리나라 겨우살이는 약 80%가 참나무에서 기생하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 본 실험에 사용한 겨우살이 물추출물은 증류수를 이용하여 추출한 후 동결건조한 것이었다. 겨우살이 물추출물의 첨가량은 마우스에서 겨우살이 추출물이 효과를 내는 농도인 10 mg/mouse를 이용하여 이것을 사람이 1일 먹는 김치의 분량(100 g)으로 환산해 볼 때 김치 100 g에 0.0588% 정도를 첨가하면 항돌연변이 및 암세포성장저해효과가 나타날 것으로 추정하여 김치에 0.05%, 0.1%, 0.2%의 겨우살이를 첨가하였다. 겨우살이첨가량이 많을수록 발효는 억제되어 대조군김치보다 발효가 서서히 진행되었다. 겨우살이 첨가량에 따른 기호도에서는 대조군김치에 비하여 신내는 약간 강하였으나 그 차이가 작았으며 겨우살이의 신내로 인하여 소금에 첨가된 쓴맛을 내는 KCl의 감지 정도는 더욱 낮아서 대조군김치가 1.8의 쓴맛을 느

끼는데 비하여 겨우살이를 0.2% 첨가한 김치는 약하게 감지하였다. 그리고 전체적인 기호도에서 대조군김치와 겨우살이를 첨가한 김치는 차이가 없었다. 따라서, 김치제조시 KCl에 의한 쓴맛을 약하게 하고 기능성이 높은 겨우살이를 첨가하는 것은 문제가 없는 것으로 보인다.

간접돌연변이원인 AFB₁과 직접돌연변이원인 MNNG에 대한 겨우살이 첨가김치의 항돌연변이 효과를 보면 대조군김치보다 겨우살이를 첨가한 김치가 더 높은 항돌연변이효과를 보였으며 겨우살이의 첨가량이 증가할수록 더 높은 항돌연변이 효과를 보였다. 박 등³⁰⁾의 겨우살이를 생즙, 가열추출물, 알콜추출물로 추출하여 Ames test를 한 결과, 돌연변이원에 대해 높은 항돌연변이효과를 나타내었으므로 겨우살이 첨가 김치의 기능성김치로서의 개발 가능성은 있다고 하겠다.

면역증강 작용 및 종양세포에 대한 직접적인 세포독성효과가 있는 겨우살이를 김치에 첨가하여 대조군김치와 비교하면서 HT-29 인체결장암세포와 AGS 인체위암세포를 이용하여 암세포성장저해효과를 알아본 결과에서도 항돌연변이에서의 효과와 같이 대조군김치에 비하여 겨우살이를 첨가한 김치의 암세포성장저해효과가 높게 나타났다. 겨우살이 추출물 및 렉틴을 이용한 *in vivo* 실험에서 발암억제효과가 나타났었고³¹⁾ 실험적 간암모델에서도 겨우살이 추출물 및 렉틴의 투여로 전암성 병변의 생성이 저해되었고 apoptosis를 촉진하는 단백질인 caspase-9과 fas-L의 발현정도가 더욱 증가되었다고 보고하였다.³²⁾

겨우살이의 항돌연변이 및 암세포성장저해효과는 lectin 이외에도 클로로필, viscotoxin, polysaccharide 등의 영향이라고 하며³¹⁾ 김치에는 주재료인 배추 이외에도 여러 부재료와 양념이 첨가되어 발효시킨 식품으로 비타민 C, 클로로필, 식물화합물, 섬유소, 유산균, sitosterol 등이 다량 함유되어 있으므로¹⁾ 겨우살이를 김치에 첨가함으로써 김치의 발효속도는 감소시키며 기호도의 경우도 차이가 거의 없었으며, 항돌연변이 및 암세포성장저해의 기능성은 더욱 증진될 것으로 기대된다.

결 론

겨우살이를 김치에 첨가하여 김치의 발효양상 및 기능성을 더욱 증진시키고자 겨우살이의 첨가 농도에 따른 발효양상, 관능검사, 및 암예방기능성을 조사하였다. 겨우살이의 첨가로 김치의 발효 속도는 대조군 김치에 비하여 감소되었으며 겨우살이의 신내는 김치를 제조하여 발효가 진행되면서 김치발효에 의한 신내와 서로 조화를 이루어서 맛있는 김치로 발효되었다. 겨우살이 첨가에 따른 김치의 항돌연변이효과는 겨우살이가 첨가되지 않은 대조군김치에 비하여는 유의적인 차를 나타내며($p < 0.05$) 항돌연변이성이 겨우살이 첨가량에 따라 증가를 하였다. 암세포성장저해효과는 항돌연변이효과와 같은 양상을 보였으며 낮은 농도에서도 현저한 효능을 나타내었다. 결국, 겨우살이를 김치발효 시 첨가할 경우 김치의 맛과 발효억제 및 암예방기능증진에 영향을 끼치는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부의 2002 보건의료기술진흥사업 중 벤처 및 중소기업 기술개발 지원연구개발사업(02-PJ1-PG11-VN01-SV04-0031)과 부산대학교 연구(보조)비(4년과제: 연구81510-757)의 지원에 의한 연구결과로 이에 감사드립니다. 또한 겨우살이 시료를 제공해주신 한동대학교 김종배 교수님께도 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 박건영. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암 효과. 한국영양식량학회지 1995; 24: 169-182.
- 2) 김현주, 권명자, 송영옥. 김치의 용매획분이 고콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼의 항산화효소계 및 인지질 지방산 조성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 2000; 29: 900-907.
- 3) 김종현, 권명자, 이소영, 류재두, 문갑순, 최홍식, 송영옥. 김치가 노화촉진취 간의 유리기 생성 및 항산화효소 활성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 2002; 31: 109-116.

- 4) 류승희, 진영수, 문정원, 이영순, 문갑순. 김치 주·부재료의 활성산소에 대한 피부세포 독성완화효과. 한국식품영양과학회지 1997; 26: 814-821.
- 5) 김미정, 송영선, 송영옥. *In vivo*와 *in vitro*에서 김치 및 김치재료의 피브린 분해활성. 한국식품영양과학회지 1998; 27: 633-638.
- 6) Choi SM, Jeon YS, Rhee SH, Park KY. Red pepper powder and kimchi reduce body weight and blood and tissue lipids in rats fed a high fat diet. *Nutraceuticals & Food* 2002; 7: 162-167.
- 7) Kim KH, Kim SH, Rhee SH, Park KY. Effects of kimchi extracts on interleukin-2 production and natural killer cell activity in mice. *J Food Sci Nutr* 1998; 3: 282-286.
- 8) Park KY, Kim SH, Son TJ. Antimutagenic activities of cell wall and cytosol fraction of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Food Sci Nutr* 1998; 3: 329-333.
- 9) Hur YM, Kim SH, Park KY. Inhibition effects of kimchi extracts on the growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J Food Sci Nutr* 1999; 4: 107-112.
- 10) 정근옥, 이강윤, 이성갑, 박건영. 소금이 마우스에서 고형암의 성장과 면역활성 및 지질과산화에 미치는 영향. 대한암예방학회지 2002; 7: 134-142.
- 11) Kim JY, Rhee SH, Park KY. Enhancement of anticancer activities of kimchi by manipulating ingredients. *J Food Sci Nutr* 2000; 5: 48-53.
- 12) 최선미, 진영수, 이숙희, 박건영. 암환자를 위한 김치의 개발. 대한암예방학회지 2001; 6:214-221.
- 13) Choi WY, Park KY. Increased preservative and antimutagenic activities of kimchi with addition of green tea leaves. *J Food Sci Nutr* 2000;5:189-193.
- 14) 박건영, 조은주, 이숙희. 부재료 첨가 배추김치의 항돌연변이 및 항암성 증진효과. 한국식품영양과학회지 1998; 27: 625-632.
- 15) Bloksma N, Schmiermann P, de Reuver M, Dijk HV, Willers JM. Stimulation of humoral and cellular immunity by Viscum preparations. *J Med Plant Res* 1982; 46: 2-8.
- 16) Mueller EA, Hamprecht, Anderer FA. Biological characterization of a component in extract of Viscum album enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* 1989; 17: 11-18.
- 17) 윤택준, 유영춘, 홍은경, 조영호, 이석원, 유보림, 김종배. 마우스 macrophage의 IL-1 및 TNF- α 의 분비유도에 있어서 한국산 겨우살이 추출물이 미치는 영향. 생약학회지 1994; 25: 132-139.
- 18) Heiny BM, Beuth J. Mistletoe extract standardized for

- the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotential in breast cancer patients. *Anticancer Res* 1994; 14: 1339-1342.
- 19) 노광수, 장철수, 오미정. 겨우살이 Lectin의 정제 및 생화학적 특성. *한국생물공학회* 1999; 14: 578-585.
 - 20) Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of korean mistletoe extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacology* 1998; 20: 163-172.
 - 21) Olsnes S, Stripe F, Sandvig K, Phil A. Isolation and characterization of Viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L (mistletoe). *J Biol Chem* 1982; 257: 13263-13270.
 - 22) AOAC. Official method of analysis, 15th ed. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA 1990.
 - 23) 김광욱, 이영춘. 식품의 관능검사. pp.192, 서울, 학연사, 1989.
 - 24) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 1783-1787.
 - 25) Ames BN, McGann J, Yamasaki E. Method detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-351.
 - 26) Park JG, Kramer BS, Steinber CJ, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 1987; 47: 5875-5879.
 - 27) Skehan P, Storeng R, Monks SA, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1107-1112.
 - 28) Steel RG, Torrie JH. Principles and procedure of statistics, pp 96, Tokyo, McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, 1980.
 - 29) 윤택준, 유영춘, 강태봉, 도명술, 서병신, Azuma I, 김종배. 한국산 겨우살이 추출물의 면역학적 활성. *한국면역학회지* 1997; 19: 571-581.
 - 30) 박원봉, 함승시, 최근표, 이득식, 강신태. 겨우살이 추출물의 항돌연변이 효과. *한국식품영양과학회* 1998; 27: 359-366.
 - 31) 김미정, 김정희. 실험적 간암모델에서 한국산겨우살이 추출물 및 락틴투여의 발암억제효과탐색. *한국식품영양과학회지* 2001; 30: 697-702.
 - 32) 김미정, 이미숙, 김정희. 실험적 간암모델에서 한국산 겨우살이 추출물 및 락틴투여가 전암성 병변의 생성 및 apoptosis에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 2002; 31: 782-787.
-