

## 키토산 첨가 김치의 암예방 효과

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

김 보 경 · 이 속 희 · 박 건 영

### Chemopreventive Effects of Chitosan Added Kimchi

Boh-Kyung Kim, Sook-Hee Rhee and Kun-Young Park

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

To increase, antimutagenic and anticancer effects of Kimchi chitosan was used as an added subingredient to the kimchi. One % chitosan oligosaccharide added kimchi in seasonings (COS-SK), 1% chitosan oligosaccharide added kimchi in brine (COS-BK), 1% water soluble chitosan added kimchi in seasonings (WSC-SK) and 1% water soluble chitosan added kimchi in brine (WSC-BK) were prepared. Kimchis were fermented at 15°C to reach optimum pH of 4.3. Chemopreventive effects of methanol extract from chitosan added kimchi were investigated in Ames test, SOS chromotest, MTT assay and *in vivo* micronucleus test. Water soluble chitosan and chitosan oligosaccharide added kimchi exhibited higher inhibitory activities against the mutagenicities induced by N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in *Salmonella typhimurium* TA100 than the standardized kimchi. Especially, COS-SK showed the highest inhibitory effect. MNNG- induced SOS response of the *E. coli* PQ37 was also blocked by chitosan added kimchi. COS-SK showed the highest antimutagenic effect against MNNG in the SOS chromotest. Anticancer effect of the chitosan added kimchi was also investigated in MTT assay by using AGS human gastric adenocarcinoma cells. COS-SK and WSC-BK showed the highest anticancer effect ( $p < 0.05$ ). To investigate anticlastogenic effect of chitosan oligosaccharide and the kimchis in mice, supravital staining of micronucleus assay using mouse peripheral reticulocytes was performed. Chitosan oligosaccharide itself and chitosan oligosaccharide added kimchi revealed higer anticlastogenic effect than SK in mice against mitomycin C. These results indicated that chitosan addition increased chemopreventive effect of the kimchi.

**Key Words:** Kimchi, Chitosan, Chitosan oligosaccharide, Ames test, MTT assay, Micronucleus assay

## 서 론

암은 생체 내 정상세포가 발암물질 등의 환경적 요인과 바이러스 감염, 유전적 요인, 돌연변이 등에 의하여 유발되며 우리나라의 경우 생활과 음식이 서구화되면서 암발병률이 점점 높아지고 있다.<sup>1,2)</sup> 우리의 식단에서 큰 비중을 차지했던 김치는 서구식단의 영향으로 그 섭취의 비중이 줄어들었지만 국제적으로는 건강식으로 많은 관심을 불러일으키고 있다.<sup>3)</sup> 김치는 채소 저장 발효식품으로 주재료가 되는 십자화과 채소인 배추와 여러 녹황색 채소류, 발효과정에서 생기는 유산균 등에 의하여 항산화, 항돌연변이, 항암, 항노화 등의 기능성을 가진다.<sup>4~8)</sup>

키토산은 게, 일반 새우, 크릴새우 등 갑각류의 껍데기, 투구벌레(투구풍뎅이), 메뚜기, 번데기 등 곤충류의 껍질, 대합, 굴 등의 패류, 오징어의 뼈, 곰팡이나 버섯 등 균류의 세포벽 등의 생물체에 천연적으로 존재하는 성분으로 다당류에 속하는 물질인 키틴질을 원재료로 하는 물질이다. 이 키틴질은 천연적으로 하등동물 껍질에 20~50%, 하등식물 세포벽에 45% 존재한다. 즉, 자연계에 폭넓게 분포하는 풍부한 biomass로서 천연 물질인 키토산 및 키틴 저분자의 식품보존제로서의 이용은 보고된 바 있다.<sup>9,10)</sup>

키토산 및 키토산올리고당의 이용은 활발하게 연구되어 왔는데, 항암작용, 면역강화작용, 식물병원성진균에 대한 식물의 저항성 유도 작용, 유산균 증식 촉진 작용, 무독성, 무공해성, 생분해성, 제산작용, 궤양억제작용, 혈청 콜레스테롤과 중성지질량을 감소시키는 약리 작용, 장내 유용세균의 발육 촉진, 면역 부활 작용 등이 있다.<sup>11~17)</sup> 키토산과 키토산올리고당은 sarcoma-180 고형암에 대한 항종양활성이 있음이 보고되고 있다.<sup>18,19)</sup> 김치 제조 시 키토산 혹은 키토산과 다른 보존제를 함께 첨가하였을 때 숙성 및 보존성 연장 효과에 대한 보고가 있다.<sup>20~25)</sup> 따라서 본 연구에서는 저장성 증진 효과가 있는 키토산을 부재료로 첨가하여 김치의 암예방 및 항암 효과에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 이의 암예방 기능성을 *in vitro*에서는 Ames test와 SOS chromotest에 의한

## 재료 및 방법

### 1) 재료

배추는 결구 배추로 포함성인 가락 신1호, 고춧가루는 영양 태양초, 젓갈은 청정멸치액젓((주)대상), 소금은 천일염((주)우일염업)을 사용하였으며, 이외 무, 파, 마늘, 생강은 부산 소재 부전시장에서 구입하였다. 설탕은 정제당을 사용하였으며, 키토산은 (주)MSC의 제품을 이용하였다.

### 2) 김치제조 및 시료의 추출

배추김치는 10% 소금물을 만들어 이등분한 배추를 10시간 염절입한 후 씻어서 제조하였다. 김치의 재료 배합비는 절인 배추 100에 대하여 고춧가루 3.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 멸치액젓 2.2, 설탕 1, 무 13, 파 2였으며 최종염도는 2.5%로 맞추었다. 이 때 첨가된 키토산은 절인 배추 100에 대하여 1%를 첨가하였다. 김치의 재료 배합비는 표준화 김치(standardized kimchi: SK)에 수용성키토산 1%를 양념에 첨가한 김치(1% water soluble chitosan added kimchi in seasonings: WSC-SK), 절일 때 첨가한 김치(1% water soluble chitosan added kimchi in brine: WSC-BK)와 키토산올리고당 1%를 양념에 첨가한 김치(1% chitosan oligosaccharide added kimchi in seasonings: COS-SK), 절일 때 첨가한 김치(1% chitosan oligosaccharide added kimchi in brine: COS-BK)로 제조하였다. 김치는 모두 15°C에서 발효하였고, 적숙기(pH 4.2~4.3)에 동결건조한 다음 마쇄하여 분말화한 후 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) Ames test에 의한 항돌연변이 실험

사용 균주로는 *Salmonella typhimurium* TA100으로 미국 California대학 B. N. Ames박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그리고 이 실험균주는 때 실험직전 histidine요구성, deep rough (*rfa*) 돌연

변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. 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. Preincubation test는 인산용액 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cell/ml) 0.1 ml, 희석된 시료(50  $\mu$ l)와 돌연변이 유발 물질(50  $\mu$ 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. 한편, 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다.

#### 4) SOS chromotest에 의한 항돌연변이 실험

실험에 사용된 균주는 *E. coli* GC4436으로부터 유래된 *E. coli* PQ37로써 균주는 90% glycerol과 L medium에서 하룻밤 배양한 균액을 1 : 1로 혼합하여 -20°C에 보관하였다. 사용균주는 6개월마다 새로 준비하였으며 그때마다 *uvrA* mutation, *rfa* mutation과  $PHO^c$  gene의 constitutivity 및 *sfia::lacZ* fusion의 inducibility를 검사하였다. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 미국 Aldrich사로부터 구입하여 증류수에 녹여 실험에 사용하였다. Frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 이 실험에서 Quillardet 등<sup>26)</sup>의 방법을 변형시킨 백과 함의 방법<sup>27)</sup>을 이용하였다. 냉동 보관된 PQ37균액 50  $\mu$ l를 5 ml의 La 배양액에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 이를 다시 5 ml의 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 농도별로 준비된 시료와 돌연변이원을 혼합한 시료 20  $\mu$ l를 미리 분주하여 둔 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕하여 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는  $\beta$ -galactosidase (-G)의 활성 측정을 위하여 O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) 100  $\mu$ l, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase (A-P)의 활성 측정

을 위해 P-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP) 100  $\mu$ l를 첨가하였다. 발색 시간은 30분으로 하였으며  $\beta$ -G는 1.5 M  $Na_2CO_3$  100  $\mu$ l로 A-P는 1 M HCl 50  $\mu$ l로서 효소에 의한 발색 반응을 정지시키고 5분 후 A-P쪽에 50  $\mu$ l의 2 M tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 분광광도계로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 OD 420 nm 측정치는 Miller의 공식<sup>28)</sup>에 의해 enzyme unit (Eu) 값을 구하였다.

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

#### 5) 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 CO<sub>2</sub> incubator (Forma, model 311 S/N29035, USA)를 이용하여 실험에 사용하였다. AGS 인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)는 한국세포주은행(서울의대)으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 다음 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. Culture flask에 부착된 암세포의 경우는 0.05% trypsin-EDTA를 2~3 ml 가하여 떼어낸 후 RPMI 1640 배지 5 ml을 넣어 1,000×g에서 5분간 원심 분리시켰다. 여기에 적당량의 배지를 넣어서 가벼운 pipetting으로 단일세포부유액을 만들었다. 96 well plate에 well당  $1 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 seeding 즉 100  $\mu$ l씩 가한 다음, 여기에 배양 배지를 80  $\mu$ l 첨가하였다. 시료는 각 농도별로 PBS로 희석한 후 각 well당 20  $\mu$ l씩 첨가하고, 한 칼럼에는 시료 대신 PBS만 20  $\mu$ l 첨가하여 100% 생존군으로 하였다. 이 plate를 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양시켰다. 배양한 plate의 각 well당 20  $\mu$ l의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-

2, 5-diphenyltetrazolium bromide)를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 배지를 30 µl 정도만 남기고 모두 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 DMSO를 150 µl 씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 5분간 가볍게 진탕해 주고 바로 96well plate용 광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 존재하는 생존 수와 비례한다.

6) 말초혈의 망상적혈구를 이용한 *in vivo* 실험

본 실험에 사용한 동물은 6~7주령의 웅성 ICR 계 마우스(한국화학연구소, 대전)로, 체중이 35 g 전후의 것을 사용하였으며, 사료는 표준사료((주)샘타코, 경기도 오산)로 사육하였다. 사육 시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였고, 동물실험실은 온도 22±1°C, 습도 55±5%를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다. 양성 대조군인 mitomycin C (MMC, 0.1 mg/ml)는 미국 Sigma 회사에서 구입하여 생리식염수에 용해시켜 0.1 ml/10 g body weight가 되도록 복강주사하였다. 시료는 멸균된 증류수를 사용하여 조제하였으며, 마우스 kg당 500 mg, 1000 mg을 경구로 투여하였다. 70°C에서 미리 가열시킨 slide glass의 중앙에 1 mg/ml의 농도로 증류수에 녹인 acridine orange 용액 10 µl를 떨어뜨린 후 유리막대로 균일하게 도말하여 건조시킨 후 밀봉하여 사용할 때까지 상온에서 보관하였다. MMC 투여 48시간 후에 마우스의 꼬리혈관으로부터 혈액 5 µl를 취하여 acridine orange-coated slide에 떨어뜨린 후 cover glass로 덮은 다음, 2시간 동안 4°C에 방치하여 세포와 acridine orange가 충분히 반응하게 하였다. Slide는 형광현미경 (Olympus, model U-ULH, Japan)으로 400배에서 관찰하였으며 망상적혈구는 I형에서 III형까지 2000개를 계수하고, 그 중 소핵을 지니는 망상적혈구를 계수하여 소핵유발 빈도를 결정하였다.<sup>29,30)</sup>

7) 통계 분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 분산분석(ANOVA)를 행한 후 SAS system (v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA)에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.<sup>31)</sup>

결 과

1) Ames test에 의한 항돌연변이 효과

Amest test를 이용하여 첨가방법을 달리한 키토산 첨가 김치 및 일반 배추김치(SK)의 MNNG에 대한 돌연변이억제효과를 측정하였다. 1.25 mg/

Table 1. Antimutagenic effect of methanol extracts from standardized kimchi and various kinds of chitosan added kimchi on the mutagenicity induced by N-methyl- N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG 0.45 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

	Revertants/plate	
	0.625 mg/plate	1.25 mg/plate
Spontaneous	98 ± 20 <sup>6)</sup>	98 ± 20
Control (MNNG)	1,058 ± 55 <sup>a)</sup>	1,058 ± 55 <sup>a)</sup>
SK <sup>1)</sup>	710 ± 20 <sup>b)</sup> (36) <sup>7)</sup>	674 ± 59 <sup>b)</sup> (40)
WSC-SK <sup>2)</sup>	412 ± 26 <sup>c)</sup> (67)	429 ± 29 <sup>db)</sup> (65)
WSC-BK <sup>3)</sup>	597 ± 19 <sup>c)</sup> (48)	569 ± 32 <sup>c)</sup> (51)
COS-SK <sup>4)</sup>	407 ± 14 <sup>e)</sup> (68)	348 ± 14 <sup>e)</sup> (74)
COS-BK <sup>5)</sup>	552 ± 35 <sup>cd)</sup> (53)	517 ± 36 <sup>cd)</sup> (56)

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

<sup>1)</sup>SK: Standardized kimchi

<sup>2)</sup>WSC-SK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in seasonings

<sup>3)</sup>WSC-BK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in brine

<sup>4)</sup>COS-SK: 1% Chitosanoligosaccharide added kimchi in seasonings

<sup>5)</sup>COS-BK: 1% Chitosanoligosaccharide added kimchi in brine

<sup>6)</sup>Values are mean ± SD.

<sup>7)</sup>Inhibition rate (%)

**Table 2.** SOS response of methanol extracts (200 µg/assay) from standardized kimchi and various kinds of chitosan added kimchi against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 70 ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	$\beta$ -galactosidase ( $\beta$ )		Alkaline phosphate ( $\alpha$ )		$\beta/\alpha$	SOS induction factor	Inhibition rate (%)
	OD <sub>420</sub>	Unit	OD <sub>420</sub>	Unit			
Spontaneous	0.496 ± 0.03 <sup>6)</sup>	16.5	0.467 ± 0.01	15.6	1.06	1.00	—
Control (MNNG)	0.899 ± 0.04	30.0	0.458 ± 0.02	15.3	1.96	1.85	—
SK <sup>1)</sup>	0.778 ± 0.02	25.9	0.469 ± 0.01	15.6	1.66	1.56	34
WSC-SK <sup>2)</sup>	0.642 ± 0.01	21.4	0.463 ± 0.03	15.4	1.39	1.31	64
WSC-BK <sup>3)</sup>	0.724 ± 0.03	24.1	0.454 ± 0.01	15.1	1.59	1.50	41
COS-SK <sup>4)</sup>	0.634 ± 0.02	21.1	0.462 ± 0.02	15.4	1.37	1.29	66
COS-BK <sup>5)</sup>	0.688 ± 0.03	22.9	0.452 ± 0.01	15.1	1.52	1.44	48

<sup>1)</sup>SK: Standardized kimchi

<sup>2)</sup>WSC-SK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in seasonings

<sup>3)</sup>WSC-BK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in brine

<sup>4)</sup>COS-SK: 1% Chitosanoligosaccharide added kimchi in seasonings

<sup>5)</sup>COS-BK: 1% Chitosanoligosaccharide added kimchi in brine

<sup>6)</sup>Values are mean ± SD.

plate 첨가농도에서 SK는 40%의 저해효과를 나타낸 반면에 수용성키토산의 경우 WSC-SK는 65%의 높은 저해효과를 보였고, WSC-BK는 51%로 저해 효과를 보였다. 수용성 키토산균보다 식미에 거부감이 없었던 키토산올리고당을 이용한 경우 COS-SK가 74%로 가장 높은 저해효과를 보였다. COS-BK도 56%의 저해효과를 나타내었다(Table 1). 일반배추김치에 키토산을 첨가한 배추김치는 일반배추김치의 항돌연변이 효과에 비하여 유의적으로 증가함을 나타내었다( $p < 0.05$ ).

## 2) SOS chromotest에 의한 항돌연변이 효과

SOS chromotest를 이용하여 MNNG에 대한 SK와 키토산 첨가 김치의 SOS 반응 억제효과를 살펴본 결과 SOS chromotest에서도 키토산 첨가균이 대조균인 표준화김치에 비하여 7~32% 높은 SOS 반응 억제 효과를 보여 Ames 실험계에서와 유사한 경향을 나타냈다. 수용성키토산 첨가균에서는 WSC-SK가 가장 높은 반응 억제효과를 보였고, WSC-BK와 WSC-SK는 유사한 경향을 나타내었다. 키토산올리고당 첨가균에서도 SK가 34%에 비하여, COS-SK이 66%의 높은 반응 억제 효과를

보였다. COS-BK는 48%의 SOS 반응 억제 효과를 보였다. WSC-SK와 COS-SK가 반응 억제 효과가 가장 높았다(Table 2). 키토산 첨가 김치의 항돌연변이 효과는 양념으로 첨가할 때 가장 높은 것으로 나타났다.

## 3) MTT assay에 의한 암세포 성장억제 효과

키토산 첨가 김치의 *in vitro* 항암 효과를 살펴 보기 위하여 methanol 추출물을 제조하여 AGS 인체 위암세포를 이용한 MTT assay를 행하였다. 그 결과 키토산 첨가 김치균이 SK의 32%에 비하여 유의적으로 높은 57~68%의 성장 억제 효과를 나타내었다( $p < 0.05$ , Table 3). 특히 WSC-SK와 COS-SK이 68%로 성장 억제 효과가 뛰어났다. 키토산 첨가균이 대조균에 비하여 항암활성이 증진되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 수용성 키토산과 키토산올리고당을 양념에 첨가했을 때 김치의 암세포 증식억제 효과가 증가되었다.

## 4) 소핵유발 억제효과

소핵의 유발빈도를 계수한 결과 키토산올리고당 첨가 김치에서 소핵 유발이 억제되는 것을 관

**Table 3.** Inhibitory effect of methanol extracts from water soluble chitosan and chitosan oligosaccharide added kimchi on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay

Treatment	Revertants/plate ( $\mu$ l/assay)	
	50	100
Control	0.903 $\pm$ 0.03 <sup>a,6)</sup>	0.921 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
SK <sup>1)</sup>	0.637 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> (29) <sup>7)</sup>	0.641 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> (30)
WSC-SK <sup>2)</sup>	0.451 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup> (50)	0.328 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup> (64)
WSC-BK <sup>3)</sup>	0.588 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup> (35)	0.426 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup> (54)
COS-SK <sup>4)</sup>	0.444 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup> (51)	0.333 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup> (64)
COS-BK <sup>5)</sup>	0.502 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup> (44)	0.403 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> (56)

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

<sup>1)</sup>SK: Standardized kimchi

<sup>2)</sup>WSC-SK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in seasonings

<sup>3)</sup>WSC-BK: 1% Water soluble chitosan added kimchi in brine

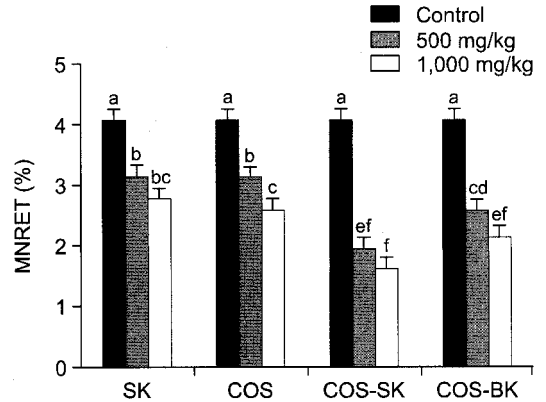
<sup>4)</sup>COS-SK: 1% Chitosan oligosaccharide added kimchi in seasonings

<sup>5)</sup>COS-BK: 1% Chitosan oligosaccharide added kimchi in brine

<sup>6)</sup>Values are mean  $\pm$  SD.

<sup>7)</sup>Inhibition rate (%)

찰할 수 있었다(Fig. 1). 이 때 키토산올리고당 그 자체와 김치에 첨가하였을 때의 효과를 비교하기 위하여 키토산올리고당 첨가 김치의 메탄올 추출물 내의 키토산올리고당 수율을 1/20으로 고려하여 키토산올리고당을 동량으로 경구투여 하였다. 실험 결과에서 보듯이 500 mg/mouse의 낮은 농도에서보다 1,000 mg/mouse의 고농도에서 소핵유발 억제효과가 높았다( $p < 0.05$ ). 최고 용량에 대한 공비 2로 설정된 500 mg/kg의 낮은 용량과 일반배추김치와 비교 시 키토산올리고당 첨가 김치는 소핵의 유발이 억제되었다. 이때 COS-SK가 COS-BK보다 소핵의 유발이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 동량으로 하였을 때 키토산올리고당 그 자체의 효과보다 키토산올리고당 첨가김치



**Fig. 1.** Anticlastogenic effect of various kinds of chitosan oligosaccharide added kimchi samples in MMC-induced mice using *in vivo* supravital staining micronucleus assay.

SK: Standardized kimchi, COS: Chitosan oligosaccharide itself, COS-SK: 1% Chitosan oligosaccharide added kimchi in seasonings, COS-BK: 1% Chitosan oligosaccharide added kimchi in brine.

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

의 소핵 유발 억제 효과가 더욱 큰 것을 살펴볼 수 있었다. 일반배추김치에 비해 키토산올리고당, COS-BK, COS-SK가 돌연변이 유발물질인 MMC에 의한 소핵유발을 더 많이 억제하는 것으로 나타났다.

## 고 찰

김치는 발효 과정 중 유산균의 생성과 항암 영양소로 알려진 vitamin C,  $\beta$ -carotene, flavonoid, chlorophyll 등이 풍부하며 항돌연변이, 항암, 면역증강효과 등이 있다고 보고되고 있고,<sup>32-34)</sup> 김치의 암예방 효과를 증진시키기 위해서는 재료의 선택, 발효방법 및 부재료의 첨가 등이 있다. 김치 제조 시 부재료로 키토산을 첨가하여 숙성 및 보존성 연장 효과에 대한 보고가 있다.<sup>20-25)</sup> 키토산의 항암효과<sup>35)</sup>와 키토산올리고당의 암예방 효과가 있는 것으로 보고되고 있으므로,<sup>36)</sup> 본 연구에서는 키토산을 배추김치에 첨가하여 저장성 증진은 물론이고 암예방 및 항암효과에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 그리고 김치의 저장성

및 암예방 기능성 증진을 위한 연구로서 키토산을 이용하여 김치를 제조할 때 첨가방법을 달리하여 연구하였다. Ames test에서 0.625 mg/plate보다 1.25 mg/plate 농도에서 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 1.25 mg에서 SK는 40%의 저해효과를 나타낸 반면에 WSC-SK는 65%, WSC-BK는 51%로 각각 저해효과를 보였다. 특히, 수용성 키토산군보다 식미에 거부감이 없었던 키토산올리고당의 경우 COS-SK가 74%로 가장 높은 항돌연변이 효과를 보였고, COS-BK는 56%의 저해효과를 나타내었다. 이것은 키토산의 첨가로 인하여 항돌연변이 효과가 유의적으로 증진되었다고 볼 수 있다( $p < 0.05$ ). SOS chromotest에서도 키토산 첨가군이 대조군인 표준화김치에 비하여 7~32% 높은 SOS 반응 억제 효과를 보여 Ames 실험계에서와 유사한 경향을 보여 김치에 키토산 첨가는 암예방 효과를 높일 수 있다고 하겠다.

키토산 첨가 김치군이 SK 32%에 비하여 상대적으로 57~68%의 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 특히 WSC-SK와 COS-SK가 68%로 성장 억제 효과가 뛰어났다( $p < 0.05$ ). 전체적으로 키토산 첨가군이 대조군에 비하여 항암활성이 증진되는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 특히 수용성 키토산과 키토산올리고당 양념 첨가 김치군이 가장 높은 성장 억제 효과를 나타냄을 살펴볼 수 있었다.

선행 연구에서 수용성키토산과 키토산올리고당을 첨가한 군들은 저장성 효과를 살펴보기 위한 이화학적 실험과 *in vitro*에서 항돌연변이 및 항암 효과에서 거의 유사한 결과를 보였다. 하지만 관능검사서서 수용성키토산 첨가군은 표준화 김치에 비교 시 전체적인 평가에서 낮은 관능성을 보인 반면 키토산올리고당 첨가군은 종합적인 평가에서 대조군인 표준화김치에 비하여 더 높은 관능성을 나타냈다.<sup>37)</sup> 그러므로 김치에는 키토산올리고당을 양념에 첨가하는 것이 유리하다고 하겠다. 표준화 김치에 비하여 키토산올리고당 그 자체와 키토산올리고당 첨가 김치는 유의적으로 높은 소핵유발 억제효과를 나타내었다. 이 때 키토산올리고당 그 자체와 김치에 첨가하였을 때의 효과를 비교하기 위하여 키토산올리고당 첨가 김치의 메탄올추출물 내의 키토산올리고당 수율을

1/20으로 고려하여 키토산올리고당을 동량으로 경구투여 하였는데, 키토산올리고당 그 자체의 소핵유발 억제효과보다 키토산올리고당 첨가 김치의 효과가 더 큰 것으로 나타났다. 김치에 키토산올리고당을 첨가는 동량의 키토산 자체보다 소핵유발 억제에 의한 암예방 효과 면에서 권장할 수 있다고 하겠다. 키토산을 배추김치에 첨가하는 방법은 첨가량은 소량이지만 저장성 증진과 함께 배추김치의 암예방 기능성을 높일 수 있다고 하겠다.

## 결 론

키토산 첨가 김치는 본 연구에서 수행한 Ames test와 SOS chromotest에 의해 MNNG에 대한 항돌연변이 실험에서 높은 암예방 기능성을 나타내었다. 수용성키토산 및 키토산올리고당 첨가 김치는 MTT assay에 의해 *in vitro*에서 높은 항암 효과를 나타내었다. 수용성키토산과 키토산올리고당을 첨가한 군들은 *in vitro*에서 항돌연변이 및 항암 실험에서 거의 유사한 결과를 보였다. 하지만 관능 검사에서 수용성키토산 첨가군은 표준화 김치에 비교 시 전체적인 평가에서 낮은 관능성을 보인 반면 키토산올리고당 첨가군은 종합적인 평가에서 대조군인 표준화김치에 비하여 더 높은 관능성을 나타냈다. 마우스 말초혈의 소핵유발 억제 실험에서 모두 높은 암예방 기능성을 나타내었으며, 키토산올리고당은 암예방 효과가 있었으며, 일반 배추김치에 키토산올리고당을 첨가하면 저장성의 증진뿐만 아니라 김치의 암예방 효과를 증진시키는 효과가 있어 암예방 기능이 증진된 김치로 개발할 수 있으며, 또한 이들의 기능성을 이용한 여러 가지 건강 기능성 김치의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의한 연구결과로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Doll R, Peto R. The cause of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- 2) Lee KY, Lee YC, Park YS, Yoon KH, Kim BS. A study of relation between dietary vitamin A intake and serum vitamin A levels and cancer risk in Korea. *Korean J Nutr* 1985; 18: 301-312.
- 3) Han JS, Kim MS, Kim YJ, Choi YH, Lee SJ. A survey of Japanese preference for kimchi and kimchi use food. *J Soc Food Sci* 1999; 15: 388-395.
- 4) 김중현, 권명자, 이소영, 류재두, 문갑순, 최홍식, 송영옥. 김치가 노화촉진위 간의 유리기 생성 및 항산화효소 활성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 2002; 31: 109-116.
- 5) 박건영, 조은주, 이숙희. 부재료 첨가 배추김치의 항돌연변이 및 항암성 증진효과. *한국식품영양과학회지* 1998; 27: 625-632.
- 6) 최선미, 전영수, 이숙희, 박건영. 암환자를 위한 김치의 개발. *대한암예방학회지* 2001; 6: 14-21.
- 7) 김현주, 권명자, 송영옥. 김치의 용매획분이 코콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼의 항산화효소계 및 인지질 지방산 조성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 2000; 29: 900-907.
- 8) 박건영. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. *한국영양과학회지* 1995; 24: 169-182.
- 9) 홍상필, 황재관. 특집: 생체기능조절 천연소재 및 기능성 식품/키토산/키토산의 기능성과 올리고당의 생산기술. *한국식품과학회* 1997; 30: 44-53.
- 10) 키토산, 키토산의 현황 및 발전방향. *식품저널 특집* 1998; 3: 26-34.
- 11) 전유진, 이응호, 김세권. 키토산, 키토산의 생리기능성(1)-항균작용, 고혈압조절작용 및 콜레스테롤 개선작용. *한국키토산학회*. 1996; 1: 4-14.
- 12) Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A. Hypocholesterolemic action of chitosan and other polysaccharides. *Lipids* 1988; 23: 187-191.
- 13) 김세권, 전유진. 키토산, 키토산의 생리기능성(2)-키토산, 키토산 및 그 올리고당의 면역 작용에 의한 항종양활성. *한국키토산학회* 1997; 2: 3-15.
- 14) Kendra DF, Hadwiger CA. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally anti-fungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp Mycol* 1984; 8: 276.
- 15) Hadwiger LA, Fristensky B, Riggelman RC. In Chitin, chitosan and related enzymes. Academic Press Orlando, 1984; p 291.
- 16) 홍상필, 김동수. 생물 신소재, 키토산/키토산의 이용. *식품기술* 1995; 8: 49-56.
- 17) Shigehiro Hirano. 기능성 천연식품소재로서의 키토산과 키토산. *한국식품과학회 건강보조식품 심포지움 발표논문집* 1997; 75.
- 18) Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr Res* 1986; 151; 403-408.
- 19) Tokoro A, Tatewaki K, Suzuki T, Mikami S, Suzuki M. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetyl chitohexaose and chitohexaose against Meth A solid tumor. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 784-790.
- 20) 김명희, 오세욱, 홍상필, 윤석권. 키토산 및 키토산올리고당의 김치 관련 미생물에 대한 항균 특성. *한국식품과학회지* 1998; 30: 1439-1448.
- 21) 손유미, 김광욱, 전동원, 경규향. Chitosan과 다른 보존제 첨가에 따른 김치의 저장성 향상. *한국식품과학회지* 1996; 28: 888-897.
- 22) 이신호, 조옥기. 김치의 보존성 증진을 위한 자초, 감초추출물의 혼합 첨가와 chitosan의 복합효과에 관한 연구. *한국식품영양과학회지* 1998; 27: 864-869.
- 23) 유은정, 임현수, 김진만, 송상호, 최명락. 김치의 숙성 및 보존 기간 연장을 위한 키토산올리고당의 이용. *한국식품영양과학회지* 1998; 27: 869-875.
- 24) 김광욱, 문형아, 전동원. 저분자 chitosan이 배추김치 모델 시스템의 보존성에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 1995; 27: 420-428.
- 25) 노홍균, 박인경, 김순동. 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과. *한국영양과학회지* 1995; 7: 11-16.
- 26) Quillardet P, Huisman OD, Ari R, Hofnung M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc Acad Sci* 1982; 79: 5971-5975.
- 27) 백창원, 함승시. SOS chromotest에 의한 사과 효소갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지* 1990; 22: 618-624.
- 28) Miller J. Experiments in molecular genetics, cold spring harbor laboratory. Cold spring Harbor, New York, 1972.
- 29) Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volder M, Oleson Jr FB, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res* 1994; 312: 293-304.
- 30) Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate



- Jr M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res* 1990; 245: 245-249.
- 31) Steel RG, Torrie JH. Principles and procedure of statistics, Tokyo McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, 1980; p 96.
- 32) Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, Mutai M. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* 1981; 72: 517-523.
- 33) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2379-2383.
- 34) 박건영, 권미향. 아스코르빈 산에 의한 aflatoxin B<sub>1</sub>의 파괴에 관한 연구. *한국영양식량학회지* 1987; 16: 1-9.
- 35) 류병호. 새우 껍질에서 추출한 키토산의 항암 및 면역활성. *한국식품영양과학회지* 1992; 2: 154-163.
- 36) 남미영, 손윤희, 김세권, 정특래, 남경수. 키토산올리고당의 암예방 효과. *한국키티킨키토산학회지* 2000; 5: 65-70.
- 37) 김보경. 키토산 첨가 김치의 저장성 증진 및 암예방 효과. *부산대학교 석사학위논문* 2002.
-