pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 35. No. 5, 359~368 (2022)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2022.35.5.359

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

순무가루를 첨가한 순무김치의 항산화 활성 및 대장암세포(HT-29) 항암효과

권 국 원[*] · [†]강 순 아[**,***]
호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, [*]호서대학교 보건산업연구소 연구원,
[**]호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, [***]호서대학교 보건산업연구소 소장

Antioxidant Activity and Anticancer Effects of Turnip Kimchi with Turnip Powder on Colorectal Cancer Cells (HT-29)

Kook Won Kwon[*] and [†]Soon Ah Kang[**,***]
Ph.D. Student, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea
[*]Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea
[**]Professor, Dept. of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea
[***]Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

In this study, the quality characteristics of kimchi, such as its salinity, pH, and acidity, were measured and compared, and the HT-29 human colon cancer cells were used to show the anticancer effects of kimchi. The kimchi samples used herein included standard kimchi (SK), turnip kimchi (TK), and turnip-powder-added kimchi (TPK). The measured pH and acidity of TK and TPK showed no significant differences with those of SK. Compared to SK and TK, TPK had higher DPPH scavenging activity and higher total flavonoid content, confirming its antioxidant activity. The cancer cell growth inhibition rates of TK and TPK were significantly higher than that of SK. In HT-29 cells treated with TPK, the mRNA expression of Bcl-xL, an anti-apoptosis-related gene, was lower, and the mRNA expressions of the apoptosis-related genes Bax, Bad, and caspase-9 were higher. TPK showed significantly higher levels of mRNA expressions for the cell-cycle-related genes p53 and p21 than the other samples, in addition to suppression effects on cancer cell proliferation. Compared to SK, TK and TPK suppressed the growth of colon cancer cells and showed higher anticancer effects. Therefore, it is shown that kimchi with added turnip powder had high anticancer effects.

Key words: turnip powder-added kimchi, antioxidant, anti-cancer effects, colon cancer cells

서 론

건강을 추구하는 삶의 형태에서 질병을 예방하고 치유할 수 있는 좋은 소재는 식품이며 기능을 도와줄 수 있는 약용 작물의 역할이 중요하다. 김치는 원재료와 부재료들이 발효 시 유산균이 생성되어 프로바이오틱 기능을 가진 한국의 전통 발효식품이다(Park 등 2014). 김치는 면역증진, 항산화, 항비만, 항당뇨, 항노화 등 건강기능성이 있는 것으로 보고되고 있다(Park & Ju 2017). 이러한 기능성은 풍부한 비타민이나 베타카로틴, 각종 미네랄, 식이섬유, 그 외의 phytochemical 등의 생리활성 물질 뿐만 아니라 유산균 발효에서 유래된 발효대사산물 및 유산균에 기인하는 것으로 알려져 있다(Park KY 1995).

김치의 종류는 주재료, 부재료, 제조과정, 지역, 계절에 따라 약 300여종이 있다(Jeong 등 2015). 최근 김치가 세계인의 음식으로 반응도가 높아지면서 다양한 기능성 김치의 과학적인 연구들이 이루어지고 있는데, 어성초, 야콘, 삼채, 인삼,

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

뽕잎, 매실 등을 첨가한 김치들이 제조되고 있다. 맥문동을 첨가한 김치의 항산화 및 항염효과(Kang KS 2015), 야콘을 첨가한 김치(Lee 등 2012)의 발효과정의 품질학적 특성 연구를 하였고, 개똥쑥 추출물을 첨가한 김치의 항암작용 효과(Lee & Kwon 2015), 뽕잎 추출액 첨가한 김치의 체지방축적 억제 효능연구(Lee & Rho 2014), 양하를 첨가한 김치의 항비만 효과(Kim & Kang 2017), 순무백김치의 위암세포 항암효과(Im & Kang 2022), 열무김치의 위암세포 성장 저해효과(Kong 등 2006) 등의 다양한 식품소재를 첨가한 다양한 김치의 기능성 효능 연구 및 기능성 김치가 개발되고 있다.

순무(*Brassica rapa* L., *Brassica campestris* L.)는 양귀비목(Papaveraceae)십자화과(Brassicaceae)의 두해살이풀로서 뿌리와 잎을 식용으로 할 수 있고, 무의 일종이지만 무보다 순한 맛을 지녔고 섬유질 함량이 적고 쌉쌉한 독특한 맛이다(Kang IH 1991; Kim MR 2000; Bang 등 2009). 우리나라에서는 순무는 강화도와 개성의 특산물로(Kang IH 1991) 동의보감에는 독성이 없고 맛이 달며 황달에 좋으며 눈을 밝게 하며 소변을 잘 통하게 하여 미용에도 좋은 활성이 있다고 전하고 있다(Heo J 1994). 순무에는 안토시아닌 색소가 풍부하며 항발암 효소 유도효과 및 항산화 효과도 확인할 수 있다(Oh 등 2003). 재래 순무는 무보다 칼륨 혹은 칼슘 함량이 높고, 뿌리 윗부분의 자색은 안토시아닌 색소에 의하며(Kim YJ 2000), 순무의 껍질부분이 과육보다 안토시아닌 함량이 약 3.5배 이상 높으며 순무뿌리에는 글루탐산 함량이 높았다(Park 등 1999). 특히 강화 순무는 뿌리는 적자색이며 알싸한 맛인데 매운맛이 적은 것이 일반 무와 다른 특징이다(Hwang 등 2020). 순무의 알싸한 맛의 특성은 isocyanate 성분과 indol에 의하여 다양한 기능성 및 항암효능이 보고되고 있다(Kim 등 2006a). 순무의 주요 활성성분으로는 glucosinolates, iosthiocyanates, phenylpropanoids와 flavonoids로 항산화, 항균, 항암, 항당뇨, 항염증 및 간 보호효과 등 생리활성이 우수하다(Paul 등 2019). 혈관내피세포 염증에 순무를 처리하면 염증인자 감소효과를 보이면서 동맥경화 예방 및 개선효과를 보여주었다(Hwang 등 2020).

순무의 생리활성에 관한 연구는 다수 있으나 순무 김치에 대한 연구로는 품종별로 본 순무 김치의 이화학적 특성 연구(Kim MR 2000), 순무 동치미 숙성 중 이화학적 특성 연구(Oh 등 2003), 열처리순무와 생순무의 아질산염소거작용(Park 등 1999), 키토산 첨가에 의한 순무피클의 이화학적 및 관능적 특성 연구(Son 등 2003)와 천연소재로 아로니아 분말을 첨가한 순무 물김치의 이화학적 특성연구(Kim 등 2018), 순무백김치의 인체위암세포 항암효과(Im & Kang 2022)이며, 순무의 가공처리 소재 즉 순무가루를 첨가한 순무김치에 관한 품질특성 및 기능성 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 순무 및 순무가루가 첨가된 김치와 일반김치간의 비교를 통해 이화학적 특성 및 항산화 활성을 통해 기능성 효과를 확인하였고, 대장암 세포에 대한 항암 및 항염증 기능성 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 김치시료준비

본 연구에 사용한 김치의 재료는 강화도에서 수확한 순무로 표준 김치(Standard Kimchi, SK), 순무 김치(Turnip Kimchi, TK), 순무가루 김치(Turnip Powder Kimchi, TPK)를 제조하고 실험에 사용하였으며 김치의 조성표는 Table 1에 제시하였다. 순무가루는 순무 110 g을 동결건조 후 약 10%의 수율로 계산하여 순무가루 10 g을 첨가하여 TPK를 제조하였다. 김치제조에 사용한 육수는 표고버섯과 다시마를 물을 넣고 끓여서 제조한 육수를 사용하였다.

2. 순무김치 추출물 제조

김치가 최적 숙성도를 유지하는 pH 4.3 근처에 근접하면, 김치를 −20℃에 냉동시킨 후, 시료를 동결건조기(FD5512, Ilshin BioBase Co., Yangju, Korea)를 이용하여 건조시켰다. 건조되어진 김치는 블렌더로 마쇄하여 김치 가루를 준비하였다. 김치 가루에 20배 분량의 에탄올을 첨가하고, 교반기로 48시간 동안 교반시킨 시료 에탄올 추출물을 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축시킨다. 농축된 시료에 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 250 mg/mL의

Table 1. Ingredients of kimchi

Ingredient of kimchi	SK	TK	TPK
Baechu cabbage (g)	1,000	1,000	1,000
Red paper powder (g)	25	25	25
Radish (g)	110		110
Turnip (g)		110	
Turnip powder (g)			10
Garlic (g)	28	28	28
Ginger (g)	6	6	6
Green onion (g)	20	20	20
MD-Yuksu (g)	25	25	25
Anchovy juice (g)	22	22	22
Sugar (g)	10	10	10
Saility (%)	2.2	2.2	2.2

SK: standard kimchi, TK: turnip kimchi, TPK: turnip powder kimchi.

농도로 제조하여 *in vitro* 항암 실험에 사용하였다(Kim 등 2013).

3. 염도 측정

김치를 멸균되어진 비닐팩에 담아서 300 μL 김치 착즙시료액을 염도측정을 위하여 염분농도측정계(NS-3P, Merbabu, Japan)로 염도를 측정하였다.

4. pH와 산도 측정

착즙되어진 김치 시료액의 pH 측정은 실온상에서 pH meter 측정기(M220, Corning, MA, USA)로 측정하였다. 산도는 AOAC 표준시험법(AOAC 1990)의 방법에 따라 시료를 20배 희석한 후 0.1 N NaOH를 넣고 pH 8.4가 되도록 적정하였고, 이 과정에 사용된 0.1 N NaOH mL 양을 측정하여 적정값은 젖산의 함량을 %로 환산하여 계산하였다.

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

(*0.009: conversion factor)

5. 순무김치의 DPPH 라디칼 소거활성 측정

에탄올로 용해하여 희석되어진 150 μm DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 시약 100 μL를 앞서 에탄올로 추출 후 희석하여 농도별로 준비된 김치 시료 100 μL에 혼합하여 96-well plate에서 빛이 차단된 상태에서 30분간 실온에서 반응시킨 뒤, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter 측정기(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 에탄올 100 μL로 흡광도의 차이를 백분율(%)로 계산하였다(Blois MS 1958).

6. 순무김치의 total flavonoid 함량 측정

시료의 총 플라보노이드 함량은 Davis 변법을 이용하여 측정하였다(Chang 등 2002). 시료 추출액 100 μL에 Diethylenglycol 1 mL를 가하여 잘 혼합하고 상온에서 5분간 방치한 후, 1N NaOH 100 μL를 분주하고 37℃에서 30분간 방치시키고 Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter 측정기(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Quercetin 시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 표준 검량선으로 부터 플라보노이드 함량을 산출하여 quercetin equivalent(mg/ QE g)으로 표기하였다.

7. 암세포 배양

HT-29 인체 대장암세포(HT-29 human colon carcinoma cell) 분양은 한국 세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 구입하였고, 세포배양에 필요한 시약인 RPMI 1640용액과 fetal bovine serum(FBS) 시약은 Welgene Inc.(Daegu, Korea)로부터 구입하였고, penicillin-streptomycin 100 units/mL과 0.05% trypsin-0.02% EDTA 구입은 Gibco BRL 기업(Rockville, MD, USA)으로 부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양실험은 RPMI 1640 용액에 10%의 FBS 용액과 100 units/mL 농도 penicillin-streptomycin을 혼합되어진 배지로 5% CO_2 incubator에서 세포배양을 하였다. 배양되어진 암세포는 일주일 동안에 2~3회 refeeding하며, 2~3일 지난 후 PBS로 세척하여, 부착되어진 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액으로 탈착시킨 후 원심분리하였다. 원심분리과정을 하여 축적된 암세포 및 배지를 피펫으로 혼합 후 10 mL씩 분양하여 75T cell culture flask에 주입한 후, 계대배양은 2~3일 간격으로 하였다(Song JL 2012).

8. 암세포성장 및 성장 억제율 측정 (MTT assay 실험)

배양된 HT-29 인체 대장암세포의 세포 수 측정은 cell counter 측정기(Luna automated cell counter; Logos Biosystems, Anyang, Korea)로 측정하였고, 5×10^4 cells/mL 농도가 되도록 well 당 100 μL씩 균등하게 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 김치 추출물 시료가 함유되어진 배지를 대장암세포에 48시간 동안 처리하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 농도를 5 mg/mL로 혼합시켜서 만든 배지를 각각 well당 100 μL 균등하게 분주하고 4시간 반응시켰다. 반응 이후, 형성된 formazan은 DMSO로 용해시켜서 30분 동안 암실에서 반응시켰고, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Skehan 등 1990; Park 등 2009).

9. RT-qPCR을 이용한 HT-29 세포 내 mRNA 발현 측정 실험

배양된 HT-29 인체 대장암세포는 세포 수는 cell counter 측정기(Luna automated cell counter; Logos Biosystems, Anyang, Korea)로 측정한 후 well 각각 1.0×10^5 cells/mL세포를 6-well plate에 각각 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 HT-29 인체 대장암세포는 2 mg/mL 농도의 김치 시료추출물이 함유되어진 배지를 첨가시킨 후 48시간 동안 실험하였다. 처리 후 배지를 제거한 다음 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 세포에서 분리 후, 0.1% diethyl-pyrocarbonate(DEPC) 용액에 용해시켰다. 총 RNA 측정 분석은 NanoDrop ND-1000 측정기(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하며, Superscript II

reverse transcriptase 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 thermal cycler BioRad CFX-96 Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 유전자 발현 실험을 하였다(Hong & Kim 1988; Kim HY 2013; Song 등 2017). 유전자로는 GAPDH, Bcl-xL, Bax, Bad, Caspase-9, p21 및 p53를 사용하였고, 사용한 primer 서열은 Table 2와 같다.

10. 통계 분석

실험결과에서 RT-qPCR 결과는 평균과 표준오차(standard error, SE)로 표시하고, 다른 실험 결과들은 평균과 표준편차(standard deviation, SD)로 결과를 표시하였다. 실험결과 통계분석은 ANOVA(one-way analysis of variance) 처리 후 유의도 검사는 Duncan's multiple range test로 각 군 사이의 유의성을 총계적으로 검증하여 $p<0.05$ 이하일 때 유의성이 있다는 평가를 하였다. 프로그램은 SPSS v18 statistical software package (SPSS Inc., Westlands, Hong Kong)로 모든 실험 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 숙성기간에 따른 김치의 연도, pH, 및 산도 변화

시료 김치를 5℃에서 4주간 발효하는 동안 주별로 염도를 측정한 결과는 Fig. 1에 보여주듯이 김치 제조시 모든 김치의 염도를 최종 농도로 2.2%로 맞추고 시간이 경과됨에 따라 모든 김치의 염도는 서서히 낮아짐을 보였다. 초기 염도 및 1주차까지 진행되는 동안 염도의 변화는 유의적인 차이가 없었으며 2주차 이후로 숙성이 진행됨에 따라 염도가 낮아짐을

Table 2. The primers used in real-time PCR

Primer	Sequence (5'-3')
GAPDH	Forward: CAATGACCCCTTCATTGACC Reserve: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
Bcl-xL	Forward: AGAGCTCTTGCGTCTGGAAG Reserve: CCAAAACACCTGCTCACTCA
Bax	Forward: TGCTTCAGGGTTTCATCCAG Reserve: GGCGGCAATCATCCTCTG
Bad	Forward: CAATGACCCCTTCATTGACC Reserve: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
Caspase-9	Forward: CTAGTTTGCCCACACCCAGT Reserve: CTGCTCAAAGATGTCGTCCA
p21	Forward: ATGTCAGAACCGGCTGGGG Reserve: GCCGGGGCCCCGTGGGA
p53	Forward: ATGGAGGAGCCGCAGTCAGA Reserve: TGCAGGGGCCGCCGGTGTAG

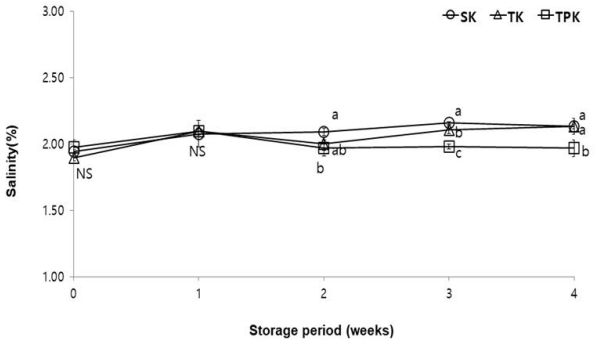

Fig. 1. Change of salinity in various kinds of kimchi fermented at 5℃. SK: standard kimchi. TK: turnip kimchi. TPK: turnip powder kimchi. [a-c]Means with the different letters at the same storage period are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range tests. [NS]not significantly different.

확인하였다. 3가지의 김치 모두 1.9~2.2%의 염도였으며 4주 동안 큰 변화가 없었다. 김치 초기 pH는 pH 5.6으로 나타났으며 그룹 별 유의한 차이는 없었다(Fig. 2A). 김치의 발효과정 중 김치의 발효 정도와 유산균의 생육을 예측할 때 산도에 의하여 볼 수 있으며 본 실험에서 김치의 발효로 인해 시간이 지날수록 pH가 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 3주차에 모든 김치의 pH가 4.4로 선호도가 가장 높은 적숙기(pH 4.2~4.5)인 김치가 되었다. 김치는 발효가 진행됨에 따라 유산균이 우점종으로 작용하여 증식하게 된다. 이러한 유산균들은 발효되면서 유기산을 생성하고, 이러한 유기산으로 인해 김치는 산성화되고, 이에 따라 pH가 감소하게 되며(Chang & Chang 2010), 산도가 증가하게 된다(Jung 등 2014). 김치가 발효되어 숙성되면서 각종 효소와 미생물에 의하여 생성되는 유기산 혹은 젖산은 김치의 특유한 신선한 맛을 내므로, pH 감소 및 산도 증가는 김치가 발효 숙성되어지는 과정을 통해 확인할 수 있다(Ku 등 1988; Shim 등 1990; Lee 등 1999). 임금자의 순무백김치의 산도 변화(Im & Kang 2022)도 비슷한 경향을 보였다.

김치가 발효되는 초기 과정에는 *Weisella* 속 및 *Leuconostoc* 속 등의 유산균에 의하여 이형발효가 일어나고, 적숙기 과정에 들어가면 내산성이 강한 미생물인 *Lactobacillus* 속 등에 의한 동형발효가 진행되어 유산균이 생성이 증가하여(Lee JH 2008) 김치의 산도가 높아진다. 초기 산도의 경우, 약 0.3%로써 모든 군에서 유의한 차이가 없었다. 그러나 김치 제조 1주 후, 유산균의 발효로 인하여 김치의 산도가 급격하게 증가하였다($p<0.05$). 이런 결과는 pH 변화와 비슷한 경향을 나타내었다. 3주차에 SK 김치 1.01±0.02%, TK 김치 1.10±0.02%,

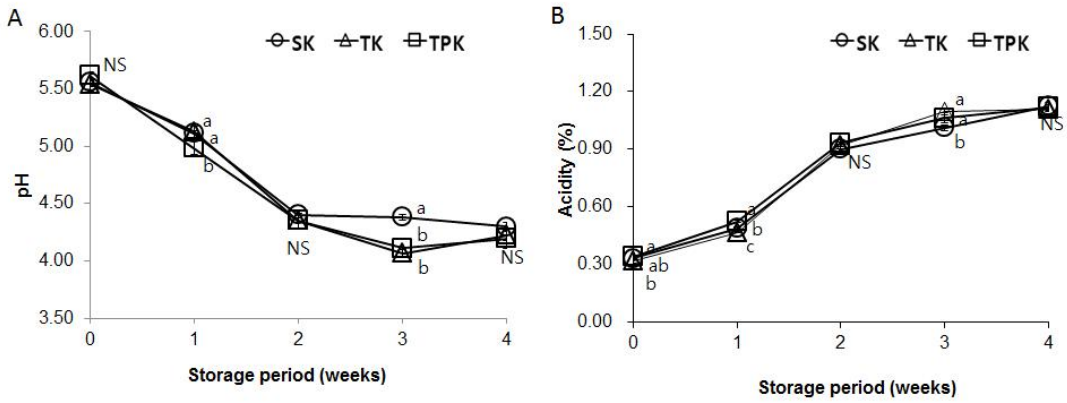

Fig. 2. Change of pH (a) and acidity (b) in various kinds of kimchi during fermentation at 5℃. SK: standard kimchi. TK: turnip kimchi. TPK: turnip powder kimchi. [a-c]Means with the different letters at the same storage period are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests. [NS]not significantly different.

TPK 김치 1.06±0.03%로 나타났다(Fig. 2B). 순무나 순무파우더를 이용하여 김치를 제조해도 표준김치와 큰 차이가 없는 것으로 보아 김치의 숙성이나 저장성에는 순무의 첨가가 일반김치와 큰 차이가 없음을 보여주었다. 강화도 재래 적순무와 청순무 김치의 발효 숙성기간 동안 pH와 산도의 변화는 숙성되어질수록 pH의 감소현상을 보이면서 전형적인 김치의 발효 숙성과정을 보여주면서(Kim MR 2000) 본 연구의 숙성과정 중 pH 변화와 흡사하였다. 또한 순무백김치의 이화학적특성 연구에서도 숙성기간이 지날수록 pH의 감소효과를 보였다(Im & Kang 2022). 순무동치미 발효 숙성 중 pH 변화도 발효숙성 기간이 진행됨에 따라 낮아짐을 보이면서 산도는 완만하게 증가하여 순무를 이용한 김치의 종류에 따라 저장온도 및 저장기간에 따라 변화양상이 다르게 보였다(Oh 등 2003). 순무김치 발효 숙성 중 유산균 수의 변화에서 숙성 15일 이후 상승하면서 숙성 30일에 최고점을 찍고 그 이후 서서히 감소하였고(Kim MR 2000), 순무백김치 연구에서는 4주째 급격하게 상승하면서(Im & Kang 2022) 산도의 변화와도 밀접하게 관련이 됨을 보였다.

2. 순무김치의 DPPH 라디칼 소거능 변화

DPPH radical 소거능 측정은 시료의 항산화물질의 활성을 측정하는 방법 중 하나이므로, 각각 김치 추출물의 DPPH radical 소거효과는 1 mg/mL, 2 mg/mL 농도에서 시료 모두 농도에 비례적으로 증가하였다(Fig. 3). 2 mg/mL 농도에서 SK와 TK군에서 47.6±1.18%, 49.6±3.17%로 비슷한 소거능을 보였지만 TPK 군에서는 56.1±3.26%로 유의적으로 높은 항산화 활성을 보였다(p<0.05). 순무물김치에 비트보다 아로니아를 첨가 시 DPPH 항산화능이 증가하는 것을 보였다(Kim 등 2018). 본 연구에서는 순무가루를 2 mg/mL 농도로 첨가한 순무김치에서 순무만 넣은 김치보다 DPPH 활성이 더 높게 나옴으로써 순무가루를 이용한 김치 혹은 다른 식품으로의 활용가치 범위가 넓어지리라 본다.

3. 순무김치의 총 플라보노이드 함량 측정

김치 추출물의 항산화지표로 total flavonoid 함량을 본 결과 1, 2 mg/mL 농도로 측정할 경우 모든 농도에서 농도에 구배적으로 증가하였다. 일반김치 SK군(1 mg/mL: 66.0±6.1 μg/mL, 2 mg/mL: 66.0±3.4 μg/mL)에 비해 순무를 첨가한 TK(1 mg/mL: 69.9±2.9 μg/mL, 2 mg/mL: 84.4±8.8 μg/mL), 순무가루를 첨가

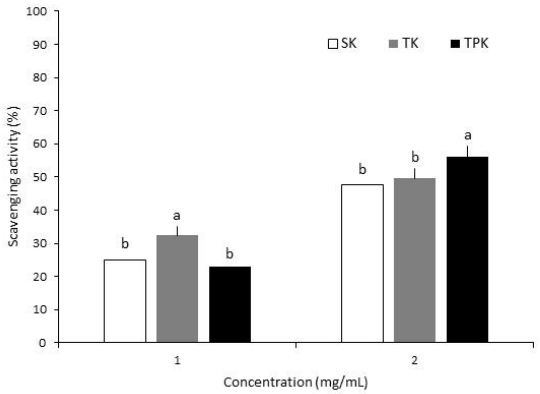

Fig. 3. DPPH radical scavenging effect of various kinds of kimchi. SK: standard kimchi. TK: turnip kimchi. TPK: turnip powder kimchi. [a,b]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

한 TPK군(1 mg/mL: 71.8±4.85 μg/mL, 2 mg/mL: 101.0±21.1 μg/mL)에서 높은 농도의 플라보노이드 함량을 보여주었다 (p<0.05). 특히, TPK 군이 가장 높은 총 플라보노이드 함량을 나타냈다. 순무가 가지는 안토시아닌 성분(Park 등 1999)으로 인해 일반 김치보다 순무를 첨가하여 제조한 김치에서 높은 플라보노이드 함량이 나온 것으로 생각된다(Fig. 4).

4. 순무김치 추출물의 농도별 HT-29 세포 성장 억제능

MTT 실험법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험 방법 중 하나로(van Meerloo 등 2011) 순무를 첨가하여 제조한 김치와 일반 김치시료의 암세포 성장저해 효과를 비교하기 위하여 HT-29 인체 대장암세포로 세 종류의 김치(SK 김치, TK 김치, TPK 김치)의 *in vitro* 항암 효과 실험에서 세포 성장 억제능을 확인한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 실험결과 1 mg/mL, 2 mg/mL 두 농도에서 모든 샘플이 농도 의존적으로 성장 억제율이 증가하였다. 특히, 순무를 첨가한 TK (1 mg/mL: 31.3±5.33, 2 mg/mL: 51.3±5.91)와 TPK군(1 mg/mL: 30.5±5.55, 2 mg/mL: 49.9±3.61)의 암세포 성장 억제율이 SK(1 mg/mL: 2.1±1.45, 2 mg/mL: 31.7±6.33)에 비해 유의적으로 높은 암세포 성장 억제율을 보였다(p<0.05). 또한, 세포에 처리하는 시료의 농도가 증가할수록 암세포 성장 억제 효과가 증가함을 보였다. 순무는 십자화과 채소 중 하나로, glucosinolate 함량이 높은 것으로 알려져 있다(Dangles & Fenger 2018). Glucosinolate는 백혈구와 cytokine을 조절하고, isothiocyanate와 같은 기능성 물질들의 활성을 촉진시켜 암 예방 효과를 나타낸다(Ehlenfeldt & Prior 2001). 다양한 종류의 채소 추출물들의 isothiocyanates 함량 분석을 GC/MS로 분석한 결과, 순무는 배추보다 높았으며, 순무의 sulfides 함량도 배추보다 20배 이상 높았으며 indole 함량은 비슷한 결과를 보였다(Kim 등 1998). 순무김치의 sulforaphane 및 dimethyl trisulfide 함량은 일반 김치보다 높은 결과를 보였다(Kim 등 1998). 특히, 지역 특산무인 강화순무는 일반 무와는 달리 적자색뿌리이며 매운맛은 적으나 알싸한 맛의 특징을 보이는데 이유는 isothiocyanate 성분에 의하여 항암효과가 있음을 보여주며 안토시아닌 함량이 다량이어서 생리활성 증진효과 및 항암기능을 가지고 있다(Kim 등 2006b). 또한, 순무에는 β-페닐에틸 이소티오시아네이트 함량이 높다고 알려져 있는데, 이는 HepG2 간암 세포와 인체 유래 전립선암 세포 DUI45에서 항암효과가 있는 것으로 보고되었다(Bellido & Beta 2009; Dangles & Fenger 2018). 순무는 sulforaphane 및 disulfide 성분을 다량 함유하고 있어 위암 및 위궤양 등 위장 관련 질환을 일으키는 원인균인 헬리코박터균을 파괴함에 따라 효과를 보였다(Haristoy 등 2003). 따라서, 이러한 dimethyl disulfide, sulforaphane 등 항암 물질이 풍부한 순무의 기능성에 의해 HT-29 대장암세포 성장이 억제되었다고 본다. HT-29 인체 대장암 세포에서 순무와 배추를 1:1로 혼합한 순무백김치 시료를 투여 시 순무로만 제조한 순무김치에 비하여 성장 억제 효과를 보였다(Im & Kang 2022). 본 연구에서는 순무가루김치와 순무김치에서 성장 억제효과가 일반김치에 비하여 높게 나타남에 비슷한 결과를 보였다.

5. RT-qPCR을 이용한 HT-29 세포 내 mRNA 발현 측정 (Apoptosis 유전자 발현분석)

HT-29 인체 대장암세포에 김치 시료추출물 농도 2 mg/mL로 처리하여 Bcl-xL 유전자의 mRNA 발현을 확인하였다(Fig.

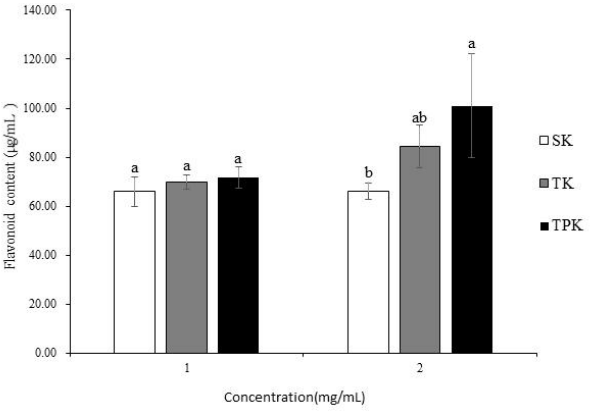

Fig. 4. Total Flavonoid contents of various kinds of kimchi. SK: standard kimchi. TK: turnip kimchi. TPK: turnip powder kimchi. [a,b]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

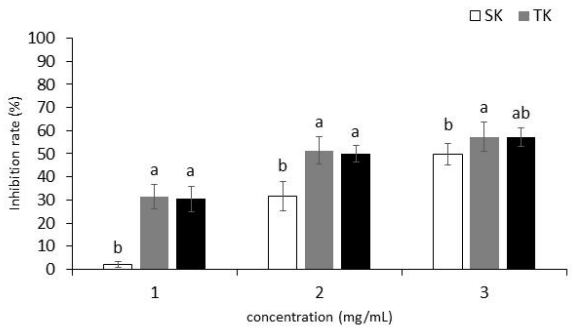

Fig. 5. MTT assay of kimchi in the HT-29 human colon cancer cells. SK: standard kimchi. TK: turnip kimchi. TPK: turnip powder kimchi. [a,b]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

6). Bcl-xL의 mRNA 발현에서는 Con군(1.00±0.19)이 가장 높게 나타났다. 모든 김치 처리군(SK: 0.56±0.19, TK: 0.45±0.11, TPK: 0.35±0.21)에서는 Con군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으며, 특히 순무 김치 파우더를 첨가한 TPK군에서 0.65배 낮게 나타났다. Bax 및 Bad 유전자 mRNA 발현의 경우, Bax의 mRNA 발현은 모든 김치(SK: 4.06±0.95, TK: 4.94±1.36, TPK: 8.54±1.76) 처리군에서 Con군에 대비하여 유의적으로 높은 발현 값을 보였고(p<0.05), 특히, TPK에서 다른 샘플에 비해 2~8배 높은 발현 수준을 나타내었다. Bad의 발현 역시 Con군에 비해 모든 김치(SK: 1.60±0.17, TK: 1.54±0.20, TPK: 1.97±0.30)처리군에서 유의적으로 높게 발현하였으며(p<0.05), TPK군에서 가장 높게 발현한 것을 확인할 수 있었다. Caspase 9 mRNA 발현 또한 Con군에 비해 모든 김치(SK: 1.19±0.23, TK: 1.36±0.09, TPK: 1.36±0.08) 처리군에서 유의적으로 높은 값을 보였다(p<0.05). 이를 통해 HT-29 대장암 세포에 TPK를 처리에 의하여 anti-apoptosis관련 유전자인 Bcl-xL의 mRNA 발현이 감소하였으며 apoptosis관련 유전자인 Bax, Bad, caspase-9의 mRNA 발현이 증가하면서 암 발생 억제효과가 있음을 확인하였다.

세포 사멸(apoptosis)에는 여러 가지 요인들이 작용하는데, 그 중 Bcl-2 family들이 중요한 역할을 하므로(Chauhan 등 2001; Thomadaki & Scorilas 2006), Bcl-2 유전자 mRNA 발현이 증가한다는 것은 apoptosis가 억제됨을 보여주며, Bax 유전자 mRNA 발현이 증가한다는 것은 apoptosis 반응이 촉진된다는 것을 보여준다. HT-29 인체 대장암 세포에서 apoptosis 관련 유전자인 Bax, caspase 9 및 caspase 3의 mRNA 발현 수준은 순무로만 제조한 순무김치는 일반김치와 순무백김치보다 현저히 높은 mRNA 유전자 발현을 보였다(Im & Kang 2022).

6. RT-qPCR을 이용한 HT-29 세포 내 mRNA 발현 측정 (cell cycle 관련 유전자 분석)

HT-29 대장암세포에 김치 시료를 2 mg/mL 농도로 처리 후 p53과 p21 mRNA 발현의 본 결과는 Fig. 7에 나타내었다. p53의 mRNA 발현에서는 Con군에 비하여 모든 김치 처리군(SK: 1.74±0.17, TK: 1.87±0.10, TPK: 3.01±0.17)에서 통계학적으로 유의한 높은 수치를 보였고(p<0.05), 시료 중 순무 파우더를 첨가한 TPK는 다른 샘플에 비해 3배 유의적으로 높은 발현 양을 보였다(p<0.05). p21의 mRNA 발현에서도 Con군에 비해 김치를 처리한 모든 군에서 유의적은 높은 발현 양을 나타냈다(p<0.05). 특히, 이 중에서도 TPK의 경우 3~6배 높은 발현 양을 보였다(Fig. 7). 순무파우더가 함유된 TPK가 cell cycle 관련 유전자(p21, p53)의 mRNA 발현을 증가시켜 암세포 증식을 억제하는 효과를 보였다. 암의 증식을 억제하고자

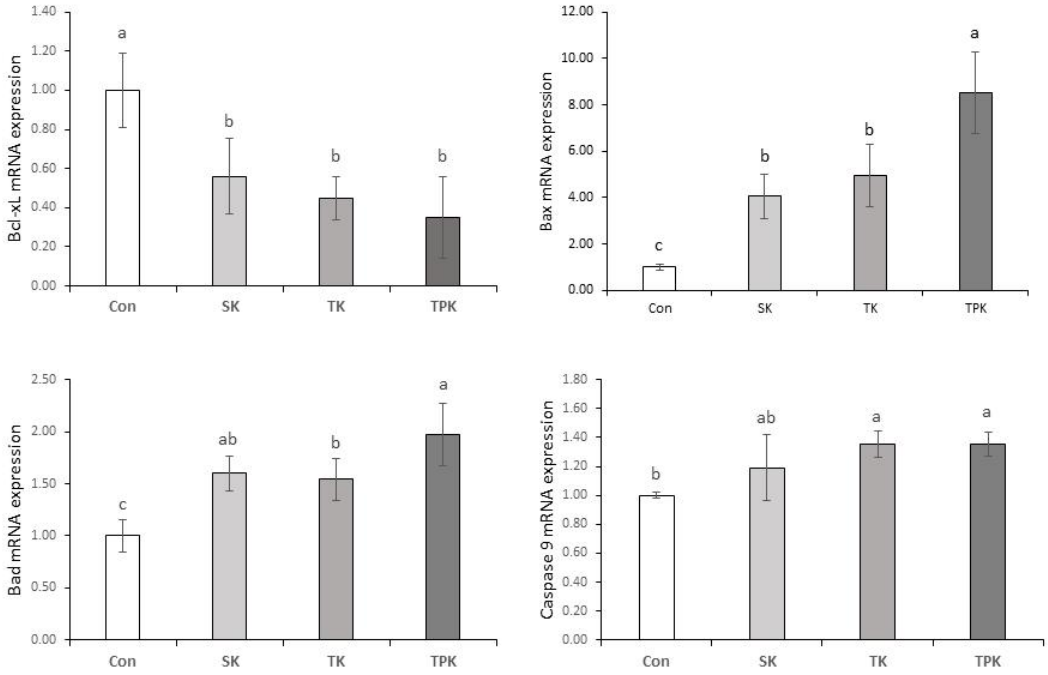

Fig. 6. mRNA expression levels of apoptosis related genes (Bcl-xL, Bax, Bad, caspase-9) in the HT-29 human colon cancer cells. Con: control group, SK: standard kimchi, TK: turnip kimchi, TPK: turnip powder kimchi. [a-c]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

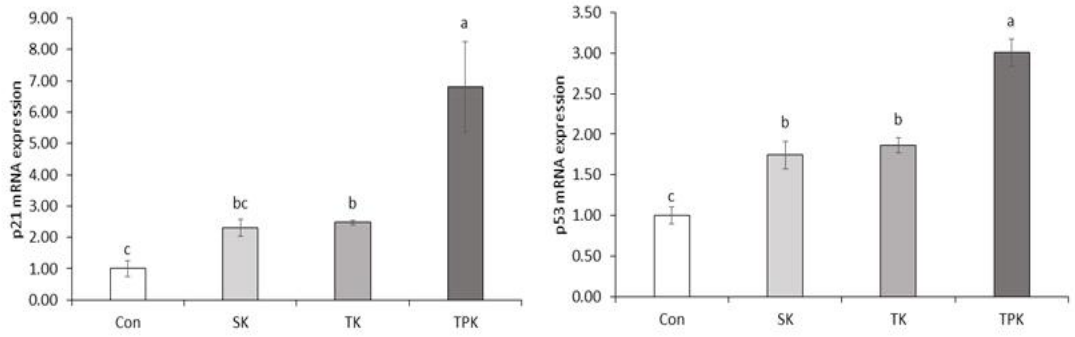

Fig. 7. mRNA expression levels of cell cycle arrest related genes (p21, p53) in the HT-29 human colon cancer cells. Con: control group, SK: standard kimchi, TK: turnip kimchi, TPK: turnip powder kimchi. [a-c]Means with the different letters at the same concentration are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

tumor suppressor gene 인자인 p53(Lu 등 1999)와 p21을 활성화시킴으로써 세포증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Gibson 등 1996).

순무 속 sulforaphane, glucosinolate, phenolics, flavonoids, indoles 등과 같은 기능성 물질에 의한 항암효과 관련이 있는 것으로 보인다(Haristoy 등 2003; Paul 등 2019). 항암효과를 보이는 것은 순무의 phenylpropionitrile, 2-phenylethyl isothiocyanate, trans-6-shogaol, 6-paradol, 및 brassicaphenanthrene A가 중요한 생리활성을 나타내는 것으로 본다(Paul 등 2019). Im & Kang (2022)에서 AGS 인체 위암 세포 및 HT-29 대장암세포의 항암효과 결과 순무김치, 순무배추 혼합백김치, 일반김치 순으로 높은 항암효과를 보였다. 또한 순무로만 만든 김치 시료를 처리한 AGS 위암 세포에서 caspase 9과 caspase 3의 mRNA 발현과 단백질 발현이 증가하면서 암 발생억제 효과를 보였다. 이상과 같은 결과를 바탕으로 항암김치를 제조하기 위해서는 첨가되는 순무의 효과가 중요함을 보여주었고, 순무와 배추의 혼합에 의하여 맛을 향상시키며 항암효과 있는 김치를 제조하는 것도 중요하지만 순무의 질감에 의한 점을 고려하여 본 연구에서는 순무를 가루로 제조하여 첨가한 김치의 대장암세포에서의 항암효과가 뛰어났으므로 순무가루를 이용한 다양한 식품의 첨가물에 활용가치가 높다고 하겠다.

요약 및 결론

연구에서는 김치의 품질학적 특성을 비교하고저 재료를 다르게 첨가한 김치를 제조 후 5℃ 조건에서 4주간 저장하면서 주별로 염도, pH 및 산도를 측정하였고 HT-29 인체 대장암 세포를 이용하여 항암효과를 보았다. 세 가지 김치 시료는 표준일반김치(SK), 순무김치(TK), 순무가루김치(TPK)로 하였다. 표준일반김치, 순무김치, 순무가루 첨가 김치의 pH와 산도 결과, 순무 및 순무가루를 이용하여 김치를 제조해도 표준일반김치와 큰 차이가 없는 것으로 보아 김치의 숙성이나 저장성에서도 큰 영향을 주지 않은 것으로 나타났다. 표준일반김치, 순무김치보다 순무가루를 첨가한 김치가 DPPH 소거능 활성이 높고 총 플라보노이드 함량도 높게 나타나면서 항산화 활성이 있음을 확인하였다. 순무 혹은 순무가루를 첨가하여 제조한 김치와 일반 김치의 암세포 성장저해 효과 결과 모든 시료가 농도 의존적으로 성장 억제율이 증가하였다. 순무를 첨가한 TK와 순무가루를 첨가한 TPK군의 암세포 성장 억제율이 표준김치에 비해 유의적으로 높은 암세포 성장 억제율을 보였다. HT-29 인체 대장암 세포에서 순무가루를 첨가한 TPK를 처리하였을 때 anti-apoptosis관련 유전자인 Bcl-xL의 mRNA 발현이 감소하였으며 apoptosis관련 유전자인 Bax, Bad, caspase-9의 mRNA 발현이 증가하면서 암 발생 억제효과가 있음을 확인하였다. p53과 p21 mRNA 발현 순무 가루를 첨가한 TPK는 다른 시료에 비해 유의적으로 높은 발현양을 보였다. 순무가루가 함유된 TPK가 cell cycle 관련 유전자(p21, p53)의 mRNA 발현을 증가시켜 암세포 증식을 억제하는 효과를 보였다. 표준일반김치에 비해 순무 및 순무가루를 첨가한 김치가 대장암세포의 성장을 억제하여 항암효과가 높게 나타난 것으로 보아 순무가루를 첨가한 김치의 기능성이 우수함을 볼 있었으며 이는 순무가루의 활용도 범위를 넓혀서 다양한 식품개발에 생리활성이 높은 소재의 첨가로 기능성 향상에 도움을 줄 수 있으리라 기대해본다.

References

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. p.79. Association of Official Analytical Chemistry

Bang MH, Lee DY, Han MW, Chung HG, Jeong TS, Choi MS,

Lee KT, Baek NI. 2009. Isolation and identification of secondary metabolites from the roots of *Brassica rapa*. *J Plant Biotechnol* 36:64-67

Bellido GG, Beta T. 2009. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley. *J Agric Food Chem* 57:1022-1028

Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal* 10:3

Chang JY, Chang HC. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *J Food Sci* 75:M103-M110

Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. 2001. Apaf-1/cytochrome *c*-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 276:24453-24456

Dangles O, Fenger JA. 2018. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules* 23:1970

Ehlenfeldt MK, Prior RL. 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J Agric Food Chem* 49:2222-2227

Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S. 1996. Bcl-w, a novel member of the Bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13:665-675

Haristoy X, Angioi-Duprez K, Duprez A, Lozniewski A. 2003. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3982-3984

Heo J. 1994. Donguibogam (Donguihakyeonguso Ed.). pp. 2697-2698. Yeogang (Original work published 1610)

Hong JS, Kim TY. 1988. Contents of free-sugars & free-sugaralcohols in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edods* & *Agaricus bisporus*. *Korean J Food Sci Technol* 20:459-462

Hwang KA, Hwang YJ, Hwang HJ, Kim YJ, Choe JS, Lee SH, Jang HH. 2020. Improvement effects of turnip extracts (*Brassica rapa* L.) on TNF-α induced vascular inflammation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49:134-140

Im GJ, Kang SA. 2022. Physicochemical of turnip baek-kimchi and anti-cancer effects of human gastric cancer cells (AGS). *Korean J Food Nutr* 35:127-136

Jeong M, Park JM, Han YM, Park KY, Lee DH, Yoo JH, Cho JY, Hahm KB. 2015. Dietary prevention of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer with kimchi. *Oncotarget* 6:29513-29526

Jung JY, Lee SH, Jeon CO. 2014. Kimchi microflora: History, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2385-2393

Kang IH. 1991. History of Dietary in Korea(Ⅱ). p 197. Samyoungsa

Kang KS. 2015. The quality characteristics of baechukimchi added with broadleaf liriope (*Liriope platyphylla*). *J Digital Convergence* 13:391-398

Kim DH, Kim JH, Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Chung HG, Kang HY, Lee HJ, Lee HY. 2006a. Effects of alcohol oxidation of *Brassica rapa* L. extraction process in Kang-Hwa. *Korean J Med Crop Sci* 14:45-48

Kim HS, Kang SA. 2017. Study of quality characteristics of kimchi added with yangha (*Zingiber mioga* Rosc). *J Korea Acad Ind Coop Soc* 18:400-407

Kim HY. 2013. Fermentation properties and inhibitory effects of anticancer functional baechu kimchi on AOM/DSS induced colitis-associated colon cancer in Balb/c mice. Master's Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea

Kim HY, Kil JH, Park KY. 2013. Comparing the properties and functionality of kimchi made with Korean or Japanese baechu cabbage and recipes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:520-526

Kim KH, Kim YW, Kim HB, Lee BJ, Lee DS. 2006b. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol Lett* 28:439-446

Kim MR. 2000. Physicochemical and sensory properties of turnip kimchi during fermentation. *Korean J Soc Food Sci* 16:568-576

Kim MR, Lee KJ, Kim HY, Kim JH, Kim YB, Sok DE. 1998. Effect of various kimchi extracts on the hepatic glutathione S-transferase activity of mice. *Food Res Int* 31:389-394

Kim SH, Kim JH, Eom SA, Han YS, Heo MJ. 2018. Effect of aronia, beet and prickly pear powder on the quality characteristics and antioxidant activities of turnip mul-kimchi. *Korean J Food Cookery Sci* 34:287-294

Kim YJ. 2000. Physiological function of turnip and turnip kimchi. pp.42-49. *Korea Food Research Institute* Registration No. TRKO200200052102

Kong CS, Bak SS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2006. Fermentation properties of young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil containing sulfur and it's inhibitory effect on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:158-163

Ku KH, Kang KO, Kim WJ. 1988. Some quality changes during fermentation of kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 20:476-482

Lee DH, Ji SH, Han WC, Lee JC, Kang SA, Jang KH. 2012. Evaluation of physiochemical properties and fermentation qualities of kimchi supplemented with yacon. *J East Asian Soc Diet Life* 22:408-413

Lee DS, Cheigh HS, Park WS. 1999. Analysis of variables influencing the pressure build-up and volume expansion kimchi package. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:429-437

Lee JH. 2008. Kimchi from Korean traditional food to global food. *Food Sci Ind* 41:23-27

Lee SS, Kwon DJ. 2015. Quality characteristics of kimchi with *Artemisia annua* extracts. *Korean J Food Preserv* 22: 666-673

Lee YS, Rho JO. 2014. A study on quality characteristics of kimchi with added mulberry leaves extracts. *J East Asian Soc Diet Life* 24:827-836

Lu S, Tiekso J, Hietanen S, Syrjänen K, Havu VK, Syrjänen S. 1999. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. *Acta Derm Venereol* 79:268-273

Oh SH, Yoon YM, Lee SK, Sung JH, Kim MR. 2003. Physicochemical and sensory properties of turnip dongchimi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 167-174

Park KT, Kim MY, Chun SS. 2009. Quality characteristics of Korean wheat wet noodles with pomegranate cortex powder. *Korean J Culin Res* 15:128-136

Park KY. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. *Korean J Food Nutr* 24:169-182

Park KY, Jeong JK, Lee YE, Daily JW III. 2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* 17:6-20

Park KY, Ju J. 2017. Kimchi and its health benefits. In Park KY, Kwon DY, Lee KW, Park S (Eds.), Korean Functional Foods: Composition, Processing and Health Benefits. pp.63-98. CRC Press

Park YK, Kim HM, Park MW, Kim SR, Choi IW. 1999. Physicochemical and functional properties of turnip. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28:333-341

Paul S, Geng CA, Yang TH, Yang YP, Chen JJ. 2019. Phytochemical and health-beneficial progress of turnip (*Brassica rapa*). *J Food Sci* 84:19-30

Shim ST, Kyung KH, Yoo YJ. 1990. Lactic acid bacteria isolated from fermenting kimchi and their fermentation of Chinese cabbage juice. *Korean J Food Sci Technol* 22: 373-379

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112

Son EJ, Oh SH, Heo OS, Kim MR. 2003. Physicochemical and sensory characteristics of turnip pickle added with chitosan during storage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:1302-1309

Song GH, Park ES, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2017. An atopic preventive drink (APD) reduces Th2 cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells. *CELLMED* 7:e15

Song JL. 2012. Anticancer effects of fermented sesame sauce. Ph.D. Thesis, Pusan National Univ. Busan. Korea

Thomadaki H, Scorilas A. 2006. BCL2 family of apoptosis-related genes: Functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43:1-67

van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In Cree I (Ed.), Cancer Cell Culture. pp.237-245. Humana Press

Received 13 September, 2022
Revised 23 September, 2022
Accepted 11 October, 2022