ISSN(Print) : 1738-7248, ISSN(Online) : 2287-7428
Korean J. Food Preserv.
21(6), 878-884 (2014)
http://dx.doi.org/10.11002/kjfp.2014.21.6.878

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Fermentation process increased antimutagenic and *in vitro* anticancer effects during *Kochujang* manufacturing

Ji-Young Kim[1], Fang-Fang Liu[1], Yaung-Iee Lim[2], Kun-Young Park[1]*
[1]*Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 142-732, Korea*

고추장 제조시 발효가 항돌연변이 및 *in vitro* 항암효과에 미치는 영향

김지영[1] · 류팡팡[1] · 임양이[2] · 박건영[1]*
[1]부산대학교 식품영양학과, [2]성신여자대학교 식품영양학과

Abstract

Increased antimutagenic and *in vitro* anticancer effects were observed by the fermentation process during *Kochujang* manufacturing. In order to confirm the increased functionality, wheat grain, first fermented wheat grains (FFWG), second fermented wheat grains (SFWG), final fermented wheat grains (FiFWG), red pepper powder (RPP), and commercial *Kochujang* (CK) were prepared. *Kochujang* manufactured with final fermented wheat grains and red pepper powder were further fermented for 15 days and 30 days. The antimutagenic effects were determined by counting the number of revertants in *Salmonella* Typhimurium TA100 against N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG, 1.0mg/mL). The final fermented wheat grains (52% inhibition) showed higher antimutagenic effects than the wheat grain (34%), and the commercial *Kochujang* showed the highest antimutagenic effects (55%). We tested the inhibitory effect on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells and AGS human gastric adenocarcinoma cells by using MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The results showed that increased fermentation process continually increased the growth inhibitory effect on both cancer cells. The further fermentation for 15 days of the *Kochujang* product also increased inhibitory growth of the AGS cancer cells. In conclusion, the methanol extract from fermented wheat grains and commercial *Kochujang* showed sequentially increased antimutagenic and *in vitro* anticancer activity, and thus the final commercial *Kochujang* revealed the highest effect.

Key words : *Kochujang*, antimutagenic, anticancer, HT-29 cells, AGS cells

서 론

우리 조상들은 발효기술을 통해 음식의 맛과 저장성을 증진하여 김치와 된장, 간장, 고추장 등을 개발하여 전통식품을 후손들에게 남겼다. 콩 발효식품의 하나인 고추장은 영양이 풍부하고 매운맛, 단맛, 짠맛이 조화를 이룬 우리나라의 독특한 전통식품이다(1,2). 고추장은 제조방법에 따라 크게 전통식 고추장과 개량식 고추장으로 분류할 수 있는데 일반적으로 전통식 고추장의 제조방법은 찹쌀과 엿기름에 메줏가루, 소금, 고춧가루 등을 첨가하여 숙성시켜 만들며 공장식 고추장은 메줏가루 대신에 코오지를 사용하여 밀 등을 이용하며 발효하기 전에 고춧가루를 가하는 방법과 발효가 끝나고 고춧가루를 넣는 방법으로 나눌 수 있으며 코오지 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*와 효모 *Zygosaccharomyces rouxii* 등의 종균을 순수 배양종균으로 이용한다(3).

암은 유전 장애, 대사 장애 및 발암물질 등과 같은 매우 다양한 요인에 의해 발생된다. 최근까지 암에 관한 연구가 계속 이어져 왔음에도 불구하고 그 발생기전이 정확하게 규명되지 못하고 있으며 발생빈도나 사망률 역시 증가 추세를 나타내고 있다(4). 콩과 콩 발효식품인 된장, 청국장, 고추장 등은 항돌연변이 및 항암효과가 있다고 알려져 있으

*Corresponding author. E-mail : kunypark@pusan.ac.kr
Phone : 82-51-510-2839, Fax : 82-51-510-3138
Copyright Ⓒ Korean Journal of Food Preservation. All rights reserved.

며(5-10), 이런 효과는 원료로 사용하는 콩에서 유래하는 물질 또는 발효에 관여하는 미생물의 작용으로 생성되는 물질에 의한 것으로 추측되고 있다(11). 그러나 고추장의 경우 된장이나 청국장과는 달리 콩을 원료로 한 메주 외에 여러 전분물질과 고춧가루가 첨가되어서 고추장의 암예방 및 항암효과를 나타낼 수 있다(12). 고추장의 재료도 중요하지만 항암효과를 증진시키는 데는 발효과정이 중요하며 발효가 잘 된 고추장은 발효가 되지 않은 고추장에 비해 항암 활성이 증가된다(13). 고추장의 메탄올추출물은 C3H/10T1/2 cell에서 MCA(methylcholanthrene)에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있었으며, transformation test에서 생체 발암의 지표인 Type Ⅱ 및 Ⅲ foci의 형성비율을 감소시켜 진핵 세포를 이용한 실험계에서 발암과정을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다(14). 따라서 고추장의 항암효과는 콩 외에도 찹쌀, 밀 등의 전분물질의 발효산물에 의한 것으로 추정되어 발효를 어떤 방법으로 하는지 또는 발효기간 등이 매우 중요하다. 고추장의 항암효과에 대한 연구가 많이 알려져 있지만(6,7,12,14), 단계별로 발효된 고추장에 대한 연구는 미흡하다. 특히 고추장의 원료로부터 고추장 제조에 사용하는 2차발효밀의 항암 기능성 연구는 거의 없다. 본 연구에서 사용된 개량식 고추장은 밀가루에 *A. oryzae*를 접종시켜 35℃에서 3일간 발효하여(1차발효밀) 밀가루 곡자를 만들었다. 증자한 밀에 이를 첨가하고 물과 식염을 첨가하여 2차발효밀을 만들어 다시 이 발효밀에 효모 *Z. rouxii*를 접종하고 단계별로 더 발효시켜 최종발효밀로 만들었다. 그리고 고춧가루를 첨가하여 고추장을 제조하였다(Fig. 1). 고추장 제조시 발효가 *in vitro* 상에서 항돌연변이 및 항암효과에 미치는 효과를 확인하기 위해

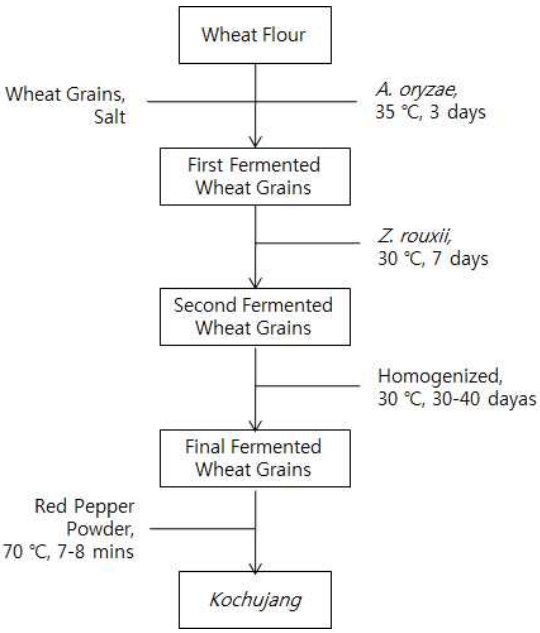

Fig. 1. The preparation of fermented wheat grains and *Kochujang*.

Salmonella Typhimurium TA100을 이용한 Ames test 및 HT-29 인체대장암세포 및 AGS 인체 위암세포를 이용한 MTT assay를 통해 *in vitro* 항암효과를 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 고추장 재료와 개량식 고추장은 모두 H사(충남, 논산)에서 직접 제공받아 사용하였다. 고추장 재료 중, 밀은 80% 도정된 것(호주산)을 사용하였고 고춧가루는 국내산을 사용하였으며, 소금은 정제염(한주소금, 울산)을 사용하였다.

발효 단계별로 고추장의 기능성을 확인하기 위해, 밀, 1차발효밀, 2차발효밀, 최종발효밀, 고춧가루와 이렇게 제조된 개량식고추장을 이용하여 실험을 하였다. 1차발효밀(first fermented wheat grains, FFWG)은 *A. oryzae*를 접종한 밀가루 곡자에 증자한 밀과 식염, 종수를 첨가하여 35℃에서 3일간 발효시킨 것이고, 2차발효밀(second fermented wheat grains, SFWG)은 1차발효밀에 *Z. rouxii*를 접종하고 혼합발효(in tank Ⅰ, 30℃, 7일)한 것이며 최종발효밀(final fermented wheat grains, FiFWG)은 2차발효밀을 이송한 후 균질화(in tank Ⅱ, 30~40일) 하여 발효시킨 것이다. 개량식 고추장은 최종발효밀에 고춧가루를 4:1의 비율로 첨가하여 상품용고추장으로 제조하였다(Fig. 1). 또한 제조된 고추장은 30℃에서 15일 및 30일간 후발효를 시켜 발효기간에 따른 *in vitro* 항암기능성의 변화를 측정하였다.

시료 추출물 제조

항돌연변이 및 항암 기능성 실험을 위해서 모든 시료를 동결건조 시킨 후 마쇄하였다. 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과하여 회전식 진공 농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 메탄올추출물(methanol extract)을 얻었다(9). 이들 추출물들은 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Chemical Co., USA)에 희석하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

직접돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(USA)에서 구입하여 증류수에 녹여서 사용하였다. D-Biotin, L-histidine·HCl(monohydrate), D-glucose-6-phosphate(mono sodium salt), NADP(sodium salt)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며, Bacto nutrient broth(dehydrated)와 Bitek agar는 Difco Laboratories(Detroit, MI, USA)로부터 구입하였다. *Sal.* Typhimurium LT-2 histidine 영양요구성인 *Sal.* Typhimurium TA100은 미국 캘리포니아 대학의 Ames B.N. 박사로부터

제공받아 실험에 사용하였다. 그리고 이 균주는 새로운 frozen permanent가 준비되었을 때나 매 실험 직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB돌연변이, R factor 등의 유전형질을 Maron과 Ames 등(15)의 방법으로 확인하여 사용하였다.

세포배양을 위해 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100units/mL penicillin-streptomycin을 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양은 37℃에서 CO_2 incubator (311, Forma Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하였다(13).

항돌연변이 효과

본 실험에서 주로 이용하였던 preincubation test는 phosphate buffer saline 0.5 mL, 하룻밤 배양된 균주($1\sim2\times10^9$ cells/mL) 0.1 mL, 희석된 시료(50 μL)와 돌연변이 유발물질(50 μL)을 cap tube에 넣고 가볍게 vortex하였다. 45℃의 top agar 2 mL씩을 각 tube에 붓고 3초 간 vortex하여 미리 준비한 minimal glucose agar plate에 도말하고 37℃에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. 한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다. 돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 (a-b)/(a−c)×100에 의해 계산하였다. 여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다(15).

암세포 배양

HT-29 인체 대장암세포와 AGS 인체 위암세포는 한국세포주 은행(서울대학교 의과대학)으로부터 분양받았다. HT-29 인체 대장암세포와 AGS 인체 위암세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mL cell culture flask에 7 mL 씩 일정 수 분할하여 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다(13).

MTT assay

배양된 암세포는 96well plate에 well당 1×10^4 cells/mL가 되게 180 μL씩 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 μL 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μL를 첨가하여 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550×g에서 10분간 원심 분리하여 상징액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150 μL를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(16,17)

통계 분석

각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan' multiple range test를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

항돌연변이 효과

전통 장류에 대한 생리활성 효과에 관한 연구에서 Jung 등(18)은 전통 장류가 항돌연변이 및 항암효과가 있음을 보고하였고, Yoon 등(19)은 발효식품인 된장, 고추장, 간장 및 청국장의 메탄올추출물이 높은 항돌연변이원성이 있었으며 돌연변이원의 종류에 따라 서로 다른 항돌연변이 효과를 나타낸다고 보고하였다. 본 실험에서는 고추장 및 발효밀의 항돌연변이 효과를 *Sal.* Typhimurium TA100을 이용한 Ames test를 실시하여 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 살펴보았다(Table 1). 2.5 mg/plate로 처리하였을 때 원료밀의 항돌연변이 효과가 34%로 나타났으며 FFWG, FiFWG의 발효과정이 증가함에 따라 항돌연변이 효과가 증진되었으며 각각 49%, 52%로 나타났다. 최종발효밀과 고춧가루로 제조된 고추장은 55%로 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다($p<0.05$). 고춧가루의 경우에는 46%로 원료 밀의 다음 순으로 나타났다. 시료 처리농도가 5 mg/plate일 때도 거의 비슷한 경향을 나타내었으며 원료 밀은 38%로 나타났는데 발효가 가장 길었던 FiFWG는 59%로 원료밀보다 21%의 항돌연변이 효과가 증진되었다. 고춧가루의 항돌연변이 효과는 56%로 발효밀과 유사하였으며, 고추장의 경우에는 저해율이 63%로 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타났다. 본 연구에 나타난 결과는 Lee(13)가 연구한 전통고추장인 식혜 고추장, 밥 고추장과 떡 고추장이 0개월째에 각각 32%, 22%, 25%였지만, 발효 4개월째에는 52%, 28%, 37%로 각각 증가되었으며, 발효 8개월째에는 각 51%, 38%, 42%로 발효가 진행됨에 따라 항돌연변이 효과가 점차 증가하는 결과와 비슷하였다. 따라서 본 연구에서 밀이 오래 발효될 수록 항돌연변이효과가 높아지므로 밀의 발효정도는 항돌연변이 효과에 상당한 영향을 미친다고 할 수 있으며 고추장에 첨가된 재료들과 이 과정 중에 생성된 발효산물 등의 활성물질이 작용한 것으로 생각되어 진다(22,32). 본 실험에서 밀의 발효과정이 길어지면서 항돌연변이효과가 높아 진 이유는 발효하는 과정 중에 생성되는 발효산물들외에 발효에 의해 많이 증식된 미생물자체의 작용에

Table 1. Antimutagenic effect of methanol extract from wheat grain, other fermented products and *Kochujang* against N-methyl-N'- nitro-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 μg/assay) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Concentration (mg/plate)	
	2.5	5
Spontaneous Control (MNNG)	122±24[6)] 933±76[a]	
Wheat grain	655±74[b](34)[7)]	624±76[b](38)
FFWG[1)]	539±34[d](49)	503±18[c](53)
SFWG[2)]	501±18[ef](53)	472± 9[d](57)
FiFWG[3)]	511±27[e](52)	457±28[e](59)
RPP[4)]	558±31[c](46)	482±41[d](56)
CK[5)]	490± 5[f](55)	405±29[f](63)

[1)]First fermented wheat grains (with *A. oryzae*).
[2)]Second fermented wheat grains (with *Z. rouxii* for 7 days).
[3)]Final fermented wheat grain (more fermented for 30~40 days).
[4)]Red pepper powder.
[5)]Commercial *Kochujang*: H. Co.
[6)]The values are mean of 3 replicates±SD.
[7)]The values in parentheses are the inhibition rates (%).
[a-f]Means with the different letters in the same column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

의해 나타난 것으로도 생각되어 진다(23). Choi (20)의 연구에서 고춧가루의 품종에 따른 MNNG에 대한 항돌연변이 효과는 명품과 청양품종이 57%, 52%로 높았고, 산지별로는 영양, 안동, 이천이 항돌연변이 효과가 각각 61%, 55%, 53%로 높았다고, Kim 등(21)은 고춧가루 추출획분들은 아플라톡신B_1 에 의해 발생되는 mutagenicity를 저해하는 효과를 나타내었으며 3분획 모두 저해 효과를 보였는데 첫 번째 분획은 돌연변이 유발성을 약 70%정도 저해하였다고 하였다. 이와 같이 본 연구에서도 밀의 발효산물과 함께 고춧가루가 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 고춧가루의 항돌연변이효과에 영향을 끼칠 수 있는 인자는 고추내의 매운 성분인 capsaicin이라 추정되며(20,21), 또한 고춧가루에 많이 함유되어 있는 비타민C와 β-carotene도 돌연변이를 억제함에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정된다(21).

In vitro 항암효과

개량식 고추장의 재료 및 발효밀과 고추장 시료들의 *in vitro* 항암효과를 인체암세포를 이용한 MTT assay로 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 HT-29 인체 결장암세포의 MTT assay결과는 처리 농도 0.5 mg/mL 와 1.0 mg/mL에서 원료 밀(45%, 55%)은 고춧가루(68%, 83%)보다 항암효과가 낮았으나 발효가 진행되는 과정동안 계속 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 0.5 mg/mL로 처리하였을 때 1차발효밀(FFWG)은 발효되지 않은 밀보다 각 10%씩 항암효과가 증진되었는데 발효가 더 많이 된 2차발효밀(SFWG)과 최종발효밀(FiFWG)은 항암 효과가 각각 65%, 71%로 항암 효과가 더 증진되었으며 고춧가루와 FiFWG로 제조된 고추장은 71%의 항암효과를 나타내었다($p<0.05$). 1 mg/mL 농도로 처리했을 때도 비슷한 경향이 나타났다. Lee(13)와 Kong(14)의 연구에서 숙성(발효)된 고추장과 숙성되지 않은 고추장을 비교한 결과 숙성된 고추장이 인체대장암세포, 인체위암세포와 마우스의 서혜부 피하 종양세포에서 더 높은 성장 저해율을 나타내어 발효과정이 중요한 항암효과 증가요인으로 보고하였다. Seo 등(23)은 고추장에서 분리한 균주의 대장암 억제효과를 관찰하였으며 65~78% 이상의 높은 암세포 저해활성을 보였다. 따라서 본 연구에서도 밀이 발효되면서 생성된 발효산물들이 중요한 활성물질로서 항암효과를 나타낸 것으로 사료되어 지며 발효과정을 거치면서 발효산물 뿐만 아니라 고추장발효에 관여한 미생물이 많이 생성되어서 고추장의 항암기능성을 증진시켰다고 생각되어 진다.

Table 2. Inhibitory effect of methanol extract from *Kochujang* and its raw materials and the fermented products on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells in MTT [3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] assay

Treatment (mg/mL)	OD_{540}	
	0.5	1
Control	0.486±0.009[a,6)]	0.485±0.009[a]
Wheat grain	0.266±0.006[b](45)[7)]	0.220±0.002[b](55)
FFWG[1)]	0.225±0.009[c](54)	0.167±0.009[c](65)
SFWG[2)]	0.172±0.010[d](65)	0.135±0.006[d](72)
FiFWG[3)]	0.141±0.006[f](71)	0.108±0.003[e](78)
RPP[4)]	0.154±0.006[e](68)	0.084±0.009[f](83)
CK[5)]	0.142±0.008[f](71)	0.086±0.005[f](82)

[1)]First fermented wheat grains (with *A. oryzae*).
[2)]Second fermented wheat grains (with *Z. rouxii* for 7 days).
[3)]Final fermented wheat grain (more fermented for 30~40 days).
[4)]Red pepper powder.
[5)]Commercial *Kochujang* : H. Co.
[6)]The values are mean of 3 replicates±SD.
[7)]The values in parentheses are the inhibition rates (%).
[a-f]Means with the different letters in the same column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3에서는 AGS 인체 위암세포를 이용하여 시료들의 MTT assay를 실시한 결과를 보여주고 있다. 결장암 세포에서의 결과와 비슷했지만 원료 밀은 0.5%와 1.0% 처리농도에서 각각 48%, 62% 정도의 항암효과를 나타났는데 밀을 발효한 최종 발효밀은 76%, 91%의 억제율로 앞의 결과에서 보다 더 높은 항암 활성을 나타내었다($p<0.05$). Lee(13)는 sarcoma-180 cells을 이용한 전통고추장의 마우스종양억제실험에서 저해율이 발효가 빠르게 진행된 식혜 고추장이 33%의 항종양효과로 밥 고추장(27%)과 떡 고추장(7%)보다 더 높았다고 하였다. 또한, Kong(14)은 잘 숙성된 고추장

은 발효되지 않은 고추장(17%)보다 마우스의 서혜부 피하에 이식된 종양세포로부터 종양생성을 45%나 억제하였다고 하였다. 마우스에 Colon 26-M3.1 cell을 이용하여 폐로 전이되는 종양의 개수를 측정한 결과 대조군의 318개의 종양개수에 비해 전통고추장의 경우 각각의 농도에서 종양개수 52, 66개로 79%, 84%에 이르는 높은 전이억제율이 관찰되었다고 하였는데 발효에 의해 구성성분의 구조가 변형됨으로서 생리활성이 더욱 높은 물질이 만들어 진다고 하였다. 이 등(31)은 메밀가루 첨가 고추장에서 발효과정 중 rutin의 aglycone인 quercetin의 함량이 증가하였음을 관찰하였다. 또한, 밀의 주요 활성성분인 ferulic acid가 효모의 작용에 의해 생리활성이 향상된 4-vinylguaiacol로 분해되는 등 더 많은 양의 phenolic flavor compounds를 생산하는데 폴리페놀의 높은 항암작용이 알려져 있음에 따라 본 연구에서 잘 발효된 밀이 항암효과가 높은 이유가 phenolic compounds가 많이 생성되어 암세포의 성장을 억제하는 효과가 나타난 것으로 생각되어 진다(22,26,27).

고춧가루도 항암 활성이 높았고 최종발효밀에 고춧가루를 첨가한 개량식 고추장이 74%, 92%로 역시 항암 활성이 가장 높았다. 고추에서 매운 맛을 나타내는 물질인 capsaicin은 HT-29 인체 대장암세포에서 AMPK 활성화하여 apoptosis를 유도한다고 보고되어 있다(24). Park 등(25)은 마우스를 이용한 실험에서 capsaicin이 전암성 병변인 papiloma의 형성을 억제하는 것을 관찰하였다. Capsaicin은 위장보호효과 및 암세포 사멸 유도 효과에 대한 연구결과와 leukemia와 같은 암세포에서 apoptosis 유도효과를 나타냄이 보고되어 있다(28-30). 따라서 본 연구에서 capsaicin 및 고춧가루에 있는 식물화합물 등의 작용으로 인해 최종발효

Table 3. Inhibitory effect of methanol extract from *Kochujang* and its raw materials and the fermented products on the growth of AGS human gastric cancer cells in MTT assay

Treatment (mg/mL)	OD_{540}	
	0.5	1
Control	0.482±0.005[a,6)]	
Wheat grain	0.253±0.009[b](48)[7)]	0.185±0.005[b](62)
FFWG[1)]	0.224±0.006[c](54)	0.114±0.004[c](77)
SFWG[2)]	0.170±0.007[d](65)	0.075±0.005[d](85)
FiFWG[3)]	0.118±0.003[f](76)	0.044±0.003[f](91)
RPP[4)]	0.131±0.003[e](73)	0.063±0.006[e](87)
CK[5)]	0.127±0.002[ef](74)	0.041±0.002[f](92)

[1)]First fermented wheat grains (with *A. oryzae*).
[2)]Second fermented wheat grains (with *Z. rouxii* for 7 days).
[3)]Final fermented wheat grain (more fermented for 30~40 days).
[4)]Red pepper powder.
[5)]Commercial *Kochujang* : H. Co.
[6)]The values are mean of 3 replicates±SD.
[7)]The values in parentheses are the inhibition rates (%).
[a-f]Means with the different letters in the same column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

밀에 고춧가루를 첨가하여 제조된 개량식 고추장이 항암효과를 더 증가시킨 것으로 사료되어 진다.

항암 효과가 가장 좋았던 최종발효밀에 고춧가루를 첨가하여 제조된 고추장의 30℃에서 발효기간(15 days, 30 days)에 따른 AGS 인체 위암세포에 대한 암세포 성장억제효과를 살펴보았다(Fig. 2). 발효되지 않은 고추장보다 15일 동안 발효된 고추장이 암세포 성장을 유의적으로 감소시켰고($p<0.05$), 15일발효시킨 고추장과 30일발효시킨 고추장은 유의성이 없는 것으로 나타났다. 따라서, 발효기간을 더 연장시켜 추후실험을 진행할 필요성이 있으며 발효기간이 길어지면 고추장은 더 높은 항암효과를 나타낼 것이라고 추정된다. 이는 앞에서 언급한 것과 같이 밀의 발효가 오래 진행될 수록 생리활성물질이나 발효에 의해 미생물이 많이 증식되어 나타난 것으로 사료되며 고춧가루를 첨가하여 고춧가루에 있는 매운 성분인 capsaicin, 비타민C와 β-carotene등에 의해 더욱 높은 항암효과가 나타난다고 생각되어진다(21,22). 따라서 고추장 자체를 더욱 오래 발효시킨다면 더 높은 항암효과가 나타날 것이라고 생각되며 이에 대한 후속 연구가 필요하다.

이상으로 고추장제조 재료인 밀이 발효되면서 항돌연변이 효과와 항암 효과가 높아지며 최종발효밀에 고춧가루를 첨가하여 제조된 고추장이 가장 높은 항돌연변이 효과와 항암 효과를 보였다. 따라서 발효가 고추장의 기능성에 높은 영향을 끼치며 발효된 고추장 속에는 고춧가루나 capsaicin보다는 발효를 통한 1,2,3,-propanetriol-1-acetate, 1,2,3,-propanetriol과 같은 활성물질(22)과 폴리페놀성분(27)등이 존재하는 것으로 보이며 전분질 발효에 대한 계속된 항암 효과 연구가 필요하다고 하겠다.

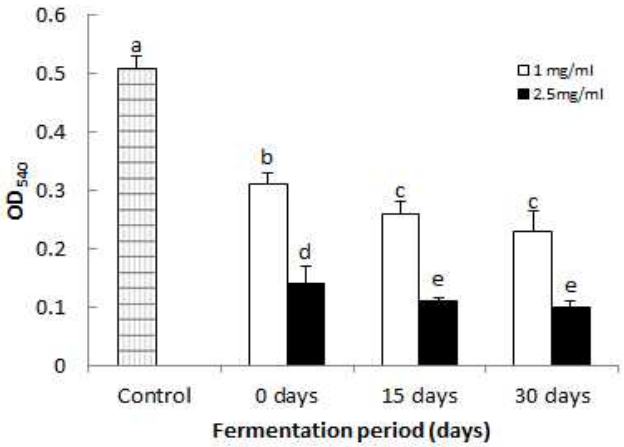

Fig. 2. Inhibitory effect of methanol extract from *Kochujang* prepared and fermented more for 15 and 30 days at 30℃ on the growth of AGS human gastric cancer cells in MTT assay.

[a-c]Means with the different letters on the bars are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

요 약

본 연구에서 고추장 제조시 발효가 항돌연변이 효과와 *in vitro* 항암효과에 미치는 영향을 확인하기 위하여 고추장 제조 재료인 원료 밀, 1차발효밀, 2차발효밀, 최종발효밀, 고춧가루와 최종발효밀로 제조된 고추장의 *Sal.* Typhimurium TA100을 이용한 Ames test를 실시하여 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 살펴보았으며, HT-29 인체 대장암세포와 AGS 인체 위암세포의 성장 억제효과를 살펴보았다. 실험한 결과 원료 밀보다 1차발효밀, 2차발효밀보다 최종발효밀이 발효진행에 따라 점차 증진된 항돌연변이 효과와 *in vitro* 항암효과가 나타났으며 최종발효밀과 고춧가루로 제조된 고추장이 가장 높았다. 15, 30일 발효시킨 고추장이 발효되지 않은 고추장보다 더 높은 항암효과가 나타났다. 따라서 발효과정(기간)이 고추장의 항돌연변이 효과와 항암효과에 중요하게 관련되어 있다고 할 수 있으며 고추장의 주재료인 고춧가루의 capsaicin, 비타민C와 β-carotene 등의 작용만이 아닌 밀에서 온 발효 숙성 중에 많이 증식된 미생물 그리고 발효에 의한 생성된 다른 활성물질이 항돌연변이와 항암 효과에 관련되어 있다고 하겠다.

References

1. Park KY (2012) Increased health functionality of fermented foods. J Food Ind Nutr, 17, 1-8
2. Rhee SH, Kong KR, Jong KO, Park KY (2003) Decreasing effect of kochujang on body weight and lipid levels of adipose tissues and serum in rats fed a high-fat diet. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 882-886
3. Park KY (2009) *Kochujang*. In: Sciences and health functionalties of Korean traditional soybean foods, Korean Jang Cooperative, Dongseonambuk Publishing Co, Seoul, South Korea, p 131-177
4. Park SH, Cho YS, Kwack MJ, Lee HS, Kang CB (2013) Effect of kegel exercise on urinary incontinence after radical prostatectomy : Systematic review of randomized controlled trials. Korean J Adult Nurs, 25, 219-230
5. Song HS, Kim JM, Lee GT (2008) Antioxidant and activities of traditional *kochujang* added with garlic porridge. J Life Sci, 18, 1140-1146
6. Kim JY, Park KW, Yang HS, Cho YS (2005) Anticancer and immuno-activity of methanol extract from onion *kochujang*. Korean J Food Preserv, 12, 173-178
7. Kong CS, Jung HK, Kim SO, Rhee SH, Han MS, Park KY (2005) *In vitro* anticancer effect of fucoidan and fucoidan added *kochujang* (Korean red pepper soybean paste). Cancer Prev Res, 10, 264-269
8. Park KY, Moon SH, Cheigh HS, Baik HS (1996) Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean soy paste). J Food Sci Nutr, 1, 151-158
9. Kim SJ, Jung KO, Park KY (1999) Inhibitory effect of *kochujang* extracts on chemically induced mutagenesis. J Food Sci Nutr, 4, 38-42
10. Kennedy AR (1995) The evidence for soybean products as cancer preventive agents. J Nutr, 125, 733-743
11. Jung KO, Kim SJ, Yoon SK, Park KY (2000) Antimutagenic effect of *kochujang* (Korean red pepper soybean paste) and *kochujang* ingredients in the Ames test. J Korean Assoc Cancer Prev, 5, 209-216
12. Kim SJ, Jung KO (2004) *In vitro* anticancer effect of *kochujang* (Korean red pepper soybean paste) and its ingredients in AGS human gastric cancer cells. J Korean Assoc Cancer Prev, 9, 42-48
13. Lee HY (2002) Preparation and fermentation characteristics of traditional *kochujang* and their cancer preventive and antiobesity effects. MS Thesis, Pusan National University, Busan, Korea, p 13-52
14. Kong KR (2001) Standardization of *kochujang* preparation and its effects of cancer preventive and lipid metabolism in rat. MS Thesis, Pusan National University, Busan, Korea, p 40-53
15. Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res, 113, 173-215
16. Park JG, Kramer BS, Steinber CJ, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer Res, 47, 5875-5879
17. Skehan P, Storeng R, Monks SA, 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
18. Chung KS, Yoon DJ, Hong SS, Choi SY (1997) Cytotoxicity of fermented soybean products with various tumor cell using MTT assay. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 25, 477-482
19. Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Kim HS, Chung KS (1996) Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. Korean J Appl Microbiol Biotechnol, 24, 525-528
20. Choi SM (2001) Antiobesity and anticancer effects of red pepper powder and *kimchi*. Ph D Thesis, Pusan National University, Busan, Korea, p 138-166
21. Kim SH, Park KY, Suh MJ (1991) Inhibitory effect of

aflatoxin B_1 mediated mutagenicity by red pepper powder in the *Salmonella* assay system. J Korean Soc Food Nutr, 20, 156-161
22. Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Kim HJ, Park KY (2006) Antiobesity effect of *kochujang* (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. J Med Food, 9, 15-21
23. Seo MY, Kim SH, Lee CH, Cha SK (2007) Fibrinolytic, immunostimulating, and cytotoxic activities of microbial strains isolated from *kochujang*. Korean J Food Sci Technol, 39, 315-322
24. Kim YM, Hwang JT, Kwak DW, Lee YK, Park OJ (2007) Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. Ann N Y Acad Sci, 1095, 496-503
25. Park KK, Surh YJ (1997) Effects of capsaicin on chemically induced two-stage mouse skin carcinogenesis. Cancer Lett, 114, 183-184
26. Coge S, Benoot K, Delvaux F, Vanderhaegen B, Delvaux FR (2004) Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. J Agric Food Chem, 52, 602-608
27. Lee DS (2010) Investigation on the chemical interaction and mechanism of proteasome inhibitor PS-341 and polyphenols in multiple myeloma. Ph D Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea, p 3-16
28. Szolcsanyi J, Bartho L (2001) Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection : an update. J Physiol Paris, 95, 181-188
29. Surh YJ, Lee E, Lee JM (1998) Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. Mutat Res, 402, 259-267
30. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M (2004) Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphoryla-tion of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. Cancer Res, 64, 1071-1078
31. Lee SJ, Kim SJ, Han MS, Chang KS (2005) Changes of rutin and quercetin commercial *kochujang* prepared with buckwheat flour during fermentation. J Korean Soc Food Sci Nutr, 34, 509-512
32. Shin HC (2009) Investigation on diterpene glycosides in gochujang and chemical profile of flavonoid glycosides during fermentation of gochujang. MS Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea, p 24-59

(Received October 4. 2014; Revised November 1. 2014; Accepted November 3. 2014)