

## 고추발효식품에서 분리한 *Bacillus subtilis*의 액체배양 고추발효물의 생리활성

유 광 원\*

충청북도 증평군 대학로 61 한국교통대학교 보건생명대학 식품생명학부 식품영양학전공 27909

### Physiological Activity of Submerged Culture-Hot Pepper Ferments with *Bacillus subtilis* Isolated from Pepper Fermented Food

Kwang-Won Yu\*

Division of Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

#### ABSTRACT

To enhance the usability of hot pepper as food materials, unpungent liquid ferments were prepared using *Bacillus subtilis* isolated from pepper fermented foods and evaluated antioxidant and cancer cell anti-proliferating activities on culture time to investigate effects on physiological activities of hot pepper during fermentation. Polyphenol increased from 48 hrs of fermentation and reached 0.83 mg GAE/mL, 1.2-times the non-fermented control at 96 hrs, and flavonoid was 0.097 mg CE/mL up to 96 hrs, 1.7-times higher than the control. ABTS radical scavenging activity also increased by 3.4 times (2.1 mg AEAC/mL) at 96 hrs compared to the control. Since the submerged culture of hot pepper by *B. subtilis* reduced a spicy capsaicin and capsaicin is known to be an anticancer ingredient, anti-proliferation against gastric, breast, lung and colon cancer cell lines (MKN45, MCF7, NCH-H460 and HCT116, respectively) were investigated on culture time. Hot pepper ferments showed higher anti-proliferating activity than the non-fermented control with 75% inhibition after 96 hrs in MKN45, the other cancer cell lines showed similar inhibitory activity as the control. In conclusion, *B. subtilis*-liquid pepper ferments showed unpungent, but their physiological activities were maintained, suggesting the possibility of being utilized as materials for functional foods.

Key words : pepper fermented food, submerged culture-hot pepper ferments, *Bacillus subtilis*, physiological activity

#### 1. 서 론

식품의 생체조절성 3차 기능은 질병의 발병 전 단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요는 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있다(1). 또한, 식생활이 다양화, 서구화되고 고칼로리 음식, 동물성 식품 섭취가 증가함에 따라 비만, 뇌졸중, 동맥경화, 고혈압, 당뇨병 등의 각종 생활습관병이 늘어나고, 심장순환계 질환의 발병율이 지난 수년간 계속 증가하면서 건강기능식품에 대한 관심은 매년 증가 추세에 있다(2). 특히, 우리나라는 의학의 발달과 건강보험 체계의 구축 등으로 기대수명이 83세(2020년)로 OECD 국가(평균 81년) 중 상위권에 속하면서 65세 고령 인구 비율이 전 인구의

16.5%인 853만 명(2021년)의 고령사회에 이르러 대표적인 생활습관병인 순환기계 질환과 암에 의한 사망 비율이 전체의 절반에 가까워지고 있는 실정이다(3). 한편, 식품 기원의 특정 성분들은 인체의 신경계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직·간접으로 생체 조절 기능을 나타낸다는 사실들이 과학적으로 밝혀지고 있다(4). 특히, 오랫동안 먹어온 식품 중에 함유된 물질은 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성 확보가 쉬워 지금까지 식품으로서 섭취하였던 1차 농산물을 원료로 이용하여 급증하고 있는 만성대사 질환의 예방효과를 통한 고령자용 기능성식품으로서의 개발은 앞으로도 절실할 것으로 예상된다. 이러한 관점에서 고추는 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있으나(5, 6), 매운맛 성분으로 인해 사용에 제약 받고 있으므로(7) 고추의 매운맛을 감소시키면서 생리활성을 보유하면 다양한 기능성 소재로의 활용이 가능하

\* kwyu@ut.ac.kr

로 본 연구에서는 발효 과정을 통해 고추의 매운맛을 감소시켜 고추의 이용성을 증대하고자 한다. 따라서 본 연구는 안전성을 확보하기 위하여 고추장 등의 고추발효식품으로부터 *Bacillus subtilis*를 분리한 후 액체발효시켜 얻은 매운맛 성분이 저감화된 고추발효물의 경시적인 생리활성을 탐색하여 식품용 중간원료로 소재화하고, 건강기능식품으로 개발하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 진행하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료와 균주 배양

본 실험에서 사용된 *Bacillus subtilis*는 10종의 고추발효제품 시료 10 g과 생리 멸균수 90 mL를 취하여 skim milk agar (2%, BD Difco, Sparks, MD, USA) 배지에 도말하고, 37°C에서 48시간 배양한 후 배지에 나타난 colony 크기와 모양 및 환의 형성에 따라 분리된 후 basal medium (glucose 2%, peptone 1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, not adjusted - pH 6.75, 30°C) 300 mL에 capsaicinoid 대표적 화합물인 capsaicin과 dihydrocapsaicin 표준물질(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 혼합한 후 30°C에서 배양하여(진탕 속도 200 rpm, Vision Scientific Co. Ltd., Seoul, Korea), capsaicinoid 양을 HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)로 분석함으로써 capsaicinoid 분해능이 우수한 균주로 선정된 후, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 서울대 Genome Research Center (Seoul, Korea)에 의뢰하여 최종 동정하였다.

### 2. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물 제조

청양고추를 이용한 매운맛이 저감화된 고추발효물의 생리활성을 측정하기 위하여 청양고추는 청주 지역의 식품 판매점에서 구입한 후 가식부만을 균질화하여 거즈로 착즙하고, 착즙액은 무균처리를 위하여 멸균(121°C, 15분)한 후 실험에 사용하였다. 한편, 발효물은 접종 전 *B. subtilis* 균주를 LB 배지(yeast extract 5 g, tryptone 10 g, NaCl 5 g, water 1 L)로 활성화한 후(30°C, 16시간) 고추 착즙액에 영양물질로 5% 미네랄 배지[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.05 g/L]와 1% 미량원소 용액[H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.3 g, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.2 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.03 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.03 g, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.02 g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01 g/L]를 첨가하고, 활성화한 균주 2%를 접종하여 30°C에서 96시간 발효하면서 24시간마다 시료를 수집하여 고추발효물의 생리활성을 검토하였다.

### 3. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 항산화 성분 분석

*B. subtilis*의 액체배양을 이용한 고추발효물에 대한 발효 중 경시적인 항산화 성분을 측정하기 위하여 대표적인 총 polyphenol 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich Co.)가 알칼리 조건에서 고추 발효액의 polyphenol 성 화합물에 의해 환원된 결과, 노란색에서 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리를 적용하여 분석하였다(8). 즉, 0~96시간까지 발효를 진행하면서 24시간마다 경시적으로 회수한 각 발효물 100 µL에 알칼리 조건을 유지하기 위한 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 가한 후 3분 방치하고, 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가하여 30분 후 반응액 흡광도 값을 720 nm에서 측정하였고, 표준물질로 0.1% gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)의 검량선을 작성하여 고추발효물의 총 polyphenol 함량은 mg gallic acid equivalent(GAE)/시료 mL로 나타내었다. 또한, 고추발효물의 또 다른 대표적인 항산화 성분인 총 플라보노이드 함량은 Stankovic의 방법에 따라 실시하였다(9). 발효물 250 µL 또는 0.02% (+)-catechin(Sigma Chemical Co., USA) 표준용액에 증류수 1.25 mL와 5% sodium nitrate(NaNO<sub>2</sub>) 75 µL 및 10% aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O) 150 µL를 각각 첨가하여 5분간 반응을 진행하고, 혼합액에 1 M sodium hydroxide(NaOH) 500 µL를 가한 후 510 nm에서 반응액의 흡광도 값을 측정하였으며 catechin 표준물질에 대한 검량선을 작성 후 고추발효물의 총 플라보노이드 함량을 결정하였다[mg catechin equivalent(CE)/시료 mL].

### 4. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 항산화 활성

청양고추의 *B. subtilis* 액체 발효물에 대한 발효 중 경시적인 발효물의 항산화 활성은 Re 등(10)의 ABTS[2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), Sigma-Aldrich Co.] cation decolorization assay 방법을 다소 변형하여 시행하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 12시간 이상 암소에 방치하여 청록색의 ABTS<sup>+</sup> radical을 형성시켰으며, 이러한 radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 물 흡광계수( $\epsilon = 1.6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 이용하여 증류수로 희석한 후 발효물 50 µL를 가한 후 상온에서 60분 방치하여 반응액의 흡광도 변화를 측정하였다. 표준물질로는 5 mM ascorbic acid를 이용하여 표준곡선을 작성 후 적정 농도를 찾아 동량 첨가하였다. 또한, 고추

발효물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co.) radical을 이용한 소거능의 항산화 활성은 Leong 등(11)의 방법을 변형하여 시행하였다. 즉, DPPH radical 용액(0.2 mM)에 발효액 50  $\mu$ L를 가한 후 상온에서 60분 방치하여 반응액의 흡광도 변화를 측정하였다. 표준물질로는 ABTS 라디칼 소거능과 마찬가지로 5 mM ascorbic acid를 이용하여 표준곡선을 작성 후 적정 농도를 찾아 동량 첨가하였고, ABTS와 DPPH 라디칼 소거능은 모두 3회 반복하여 실행하였으며, 이러한 라디칼 소거에 의한 항산화 활성은 아래의 식에 의해 계산되었다. 한편, ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)는 고추발효물의 항산화력을 표준물질인 ascorbic acid와 비교·산출한 값으로 mg AEAC/시료 mL로 나타내었다.

$$AEAC = (\Delta A / \Delta A_{aa}) \times C_{aa}$$

$\Delta A$ : 고추발효물을 넣었을 때의 734 nm에서의 흡광도 값의 변화

$\Delta A_{aa}$ : 고추발효물 대신 ascorbic acid가 동량 첨가 시 734 nm에서의 흡광도 값의 변화

$C_{aa}$ : L-ascorbic acid 표준용액의 농도(mg/mL)

### 5. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 암세포 증식 억제 활성

암 세포주[MCF7(유방암), NCI-H460(폐암), MKN45(위암), HCT116(대장암)]에 대한 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 암세포 증식 억제 활성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) assay 방법으로 측정하였다(12). 각각의 암세포는 10% FBS, penicillin(100 units/mL)과 streptomycin(50  $\mu$ g/mL)을 첨가한 RPMI medium 1640 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였으며, 배양된 암세포는 trypsin/EDTA(1 mM) 용액을 첨가하여 T-flask 바닥으로부터 cell을 완전히 분리하여 RPMI 배지에 재용해하였다. 세포 수가  $1.5 \times 10^4$ /mL(NCI-H460),  $2 \times 10^4$ /mL(MCF7, HCT116) 및  $5 \times 10^4$ /mL(MKN45)가 되도록 암 세포주 현탁액을 조정하였고, 0~96시간 발효 중 24시간마다 경시적으로 회수된 고추발효물은 곧바로 0.22  $\mu$ m membrane filter로 여과멸균한 뒤 MTT assay를 통하여 생존 세포 수를 측정하였다. 대조군으로는 청양고추 착즙액에 균주를 접종하지 않는 비발효물을 동일 조건에서 발효 시간과 동일하게 방치한 후 사용하였으며, 고추발효물의 암세포 증식 억제 효과는 아래의 식에 의해 계산되었다.

Cytotoxic activity(%)

$$= [1 - (\text{고추발효물의 } 550 \text{ nm 흡광도} / \text{식염수의 } 550 \text{ nm 흡광도})] \times 100$$

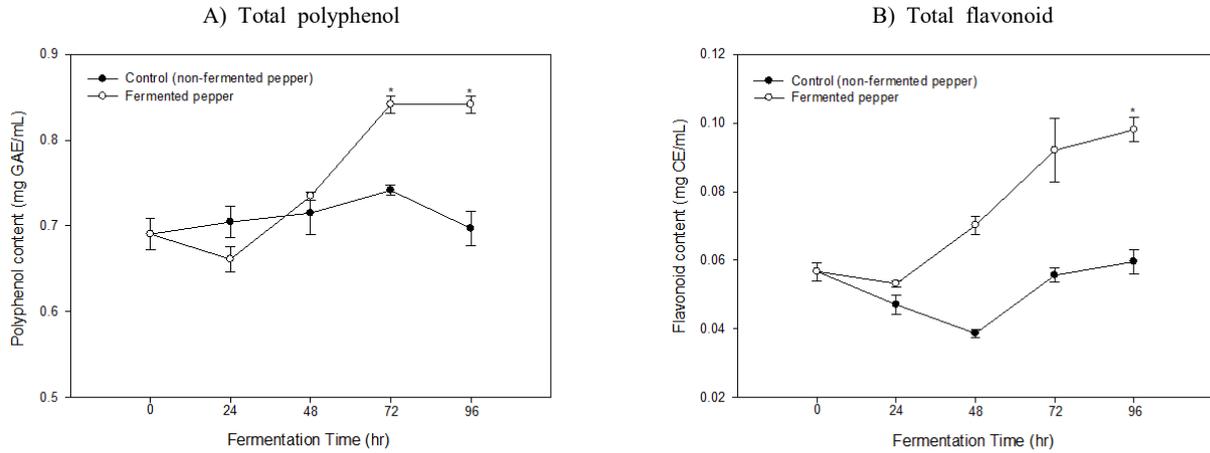
### 6. 통계처리

모든 실험 결과는 평균치 $\pm$ SD(standard deviation)로 나타내었고, Statistical Package for the Social Science(SPSS V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Student *t*-test를 이용하여 경시적으로 회수한 비발효물 대조군과 고추발효물 시료 간의 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## III. 실험 결과 및 고찰

### 1. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 항산화 활성

대표적인 capsaicinoid 화합물로서 알려진 capsaicin과 dihydrocapsaicin 표준물질 혼합물과의 배양을 통해 매운맛 성분을 감소시키는 균주로 고추발효식품으로부터 분리한 *B. subtilis*를 이용하여 청양고추 착즙액의 액체배양으로부터 제조된 고추발효물에 대한 생리활성을 검토하기 위하여 항산화 활성을 검토하였다. 먼저, 식물체에 대표적으로 함유된 항산화 성분인 폴리페놀 화합물(13)의 발효 중 경시적인 함량 변화는 Figure 1A에 나타내었다. 먼저, 동일 청양고추 착즙액 배지에 균주를 접종하지 않는 비발효 대조구의 폴리페놀 함량은 발효 초기 0.68 mg GAE/mL로 시작되어 72시간에 0.72 mg GAE/mL로 다소 증가하다가 96시간에 다시 초기 수준으로 감소하는 경향을 보였으나, 통계학적으로 발효가 진행되는 동안에 유의적인 차이를 보이지는 않았다(Figure 1A-control). 그러나 청양고추의 *B. subtilis* 액체배양 발효물은 24시간에는 0.65 mg GAE/mL로 다소 저하되었으나, 이후 발효가 진행됨에 따라 72시간까지 급속도로 증가하여 고추 발효 96시간에 이르러 그 함량이 0.83 mg/mL까지 유의적으로 대조군보다 1.2배 증가하는 결과를 나타내었다(Figure 1A-fermented pepper). 또한, 식물의 꽃, 열매와 줄기 등에 항산화 효과를 나타내는 화합물로 보고된 플라보노이드 화합물(14)의 고추발효물의 경시적인 함량 변화는 Figure 1B에 나타내었다. 폴리페놀 화합물과는 달리 플라보노이드는 1/10의 낮은 함량을 보였으며 특히, 비발효 대조군에서는 폴리페놀 화합물과 달리 발효 시작과 함께 48시간까지 감소하여 0.058 mg CE/mL에서 0.038 mg CE/mL의 플라보노이드 함량을 보이다가 72시간 후에 발효 초기의 수준으로

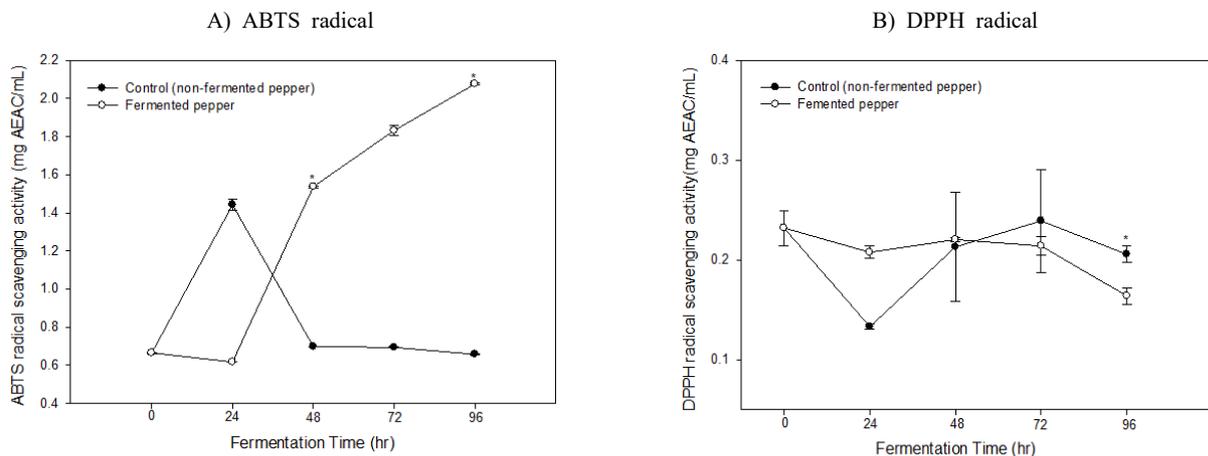


**Figure 1. Comparison of anti-oxidant component content on fermentation time in submerged culture of pepper by *B. subtilis*.** GAE; gallic acid equivalent, CE; catechin equivalent. \*  $p < 0.05$ ; significant difference between control (non-fermented pepper) and fermented pepper.

로 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 1B-control). 고추발효물도 폴리페놀과 마찬가지로 24시간까지는 다소 감소하였으나(0.056 mg CE/mL), 이후 96시간까지 증가하여 비발효 대조군보다 1.7배(0.097 mg CE/mL)의 높은 수준을 보여 폴리페놀과 마찬가지로 매운맛이 저감화된 고추발효물에서 항산화 성분이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 1B-fermented pepper). 일반적으로 식물의 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물은 식물체 내에서 세포벽 성분인 cellulose 또는 올리고당 및 소당류와 배당체 형태로 존재하기 때문에(15), 발효와 함께 *B. subtilis*로부터 생산되는 다양한 가수분해효소가 이들로부터 폴리페놀과 플라보노이드 화합물을 유리시켜 액체 발효물의 항산화 성분을 증가시킨

것으로 추정된다.

한편, 고추발효물 제조에서 경시적으로 항산화 성분의 변화를 관찰하였기 때문에 직접적으로 항산화 활성에는 어떤 변화가 일어나는지를 확인하기 위하여 다양한 항산화 활성 검색법 중에서도 전자공여체를 가진 항산화 성분에 의해 환원되면서 흡광도가 변하는 성질을 이용하는 라디칼 소거능을 측정하였다. 먼저, ABTS 화합물을  $K_2S_2O_8$ 에서 청록색의 ABTS 양이온 라디칼로 형성시킨 후 발효물에 의해 라디칼이 소거되면서 변색하는 정도를 측정한 결과는 Figure 2A에 나타내었다. 비발효 대조군의 경우에는 발효 시점(0시간)에 0.62 mg AEAC/mL의 라디칼 소거능이 발효 24시간에 1.41 mg AEAC/mL로 크게 증가하였으나, 48시간까지 다시 발효



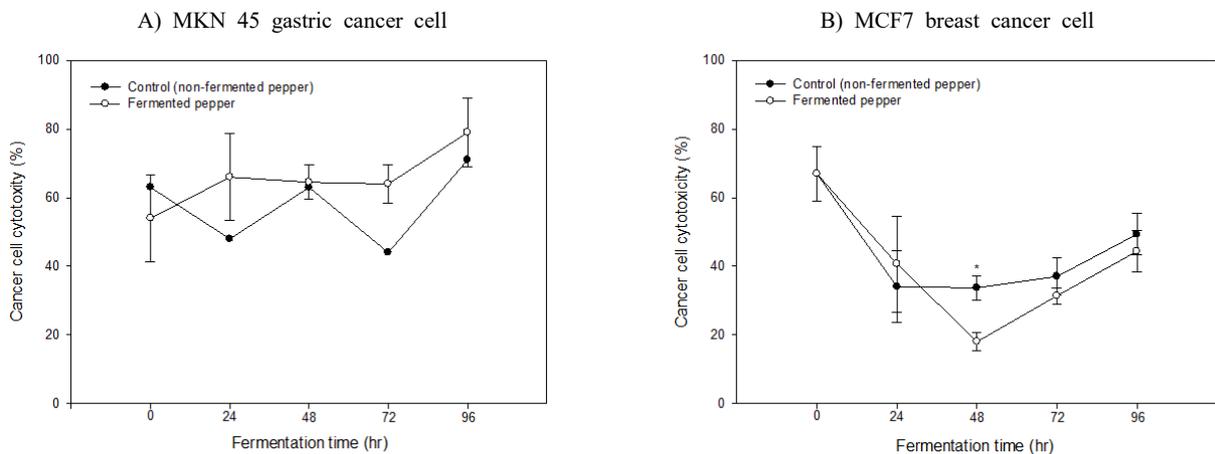
**Figure 2. Comparison of radical scavenging activity on fermentation time in submerged culture of pepper by *B. subtilis*.** AEAC; ascorbic acid equivalent antioxidant capacity. \*  $p < 0.05$ ; significant difference between control (non-fermented pepper) and fermented pepper.

초기 수준으로 감소한 이후 큰 변화를 보이지 않아 24시간의 결과가 실험적인 오차인 것으로 추정되었다(Figure 2A-control). 대조군과 달리 고추발효물의 경우에는 24시간까지는 크게 변화를 보이지 않다가 이후 급속히 증가하여 발효 96시간에는 2.1 mg AEAC/mL의 항산화 활성으로 대조군보다 3.4배의 항산화 활성 증가의 결과를 나타내었다(Figure 2A-fermented pepper). 그러나 또 다른 라디칼인 DPPH 소거능의 결과(Figure 2B)에서는 비발효 대조군의 경우 24시간에 0.13 mg AEAC/mL로 0시간(0.23 mg AEAC/mL)보다 감소하다가 증가하는 경향을 보이기는 하였으나, 초기 활성과 유의적인 차이를 보이지는 않았으며(Figure 2B-control), 발효물도 발효 0시간부터 72시간까지 거의 유사한 수준(0.21~0.22 mg AEAC/mL)의 활성을 보이다가 96시간에는 0.16 mg AEAC/mL로 감소하여 발효에 따라 대조군보다 활성이 증가한 ABTS 라디칼 소거능과는 달리 DPPH 라디칼 소거능에서는 발효 시간 경과에 따라 대조군(0.20 mg AEAC/mL)보다 오히려 감소하는 경향을 보였다(Figure 2B-fermented pepper). 일반적으로 항산화 활성의 논문에서 총 폴리페놀 성분의 함량과 ABTS 라디칼 소거능이 높은 상관성을 나타내고 있다고 보고하고 있으므로(16), 매운맛을 저감화시킨 *B. subtilis*의 액체배양으로 제조된 고추발효물의 항산화 활성도 플라보노이드보다 높은 함량으로 발효를 통해 증가한 폴리페놀에 기인함을 추정할 수 있게 해 주었다. 유산균의 식물추출물 발효액은 항산화 활성뿐만 아니라, 보습력과 휘발성 화합물의 생산을 유의적으로 증가시켜 다양한 식품소재로서의 활용성을 증가시키고(17), Kim 등(18)은 다양한 면역장애와 암 치료 등에 생약재로 이용되는 겨우살이를 폐주에서 분리한 *Aspergillus kawachii* 생산 조효소액과 발효시

켜 항산화 성분과 활성이 증가함으로써 항산화 활성에 발효 과정이 중요하게 작용하고 있다는 결과는 청양고추 착즙액의 *B. subtilis* 액체배양 발효물이 비발효 대조군보다 총 폴리페놀 함량과 ABTS 라디칼 소거능을 유의적으로 증가시켰다는 본 연구결과와 일치되는 경향을 보여주었다.

## 2. 매운맛이 저감화된 *B. subtilis* 액체배양 고추발효물의 암세포 증식 억제 활성

매운맛을 저감화한 *B. subtilis* 발효 유무에 따른 비발효 대조군과 고추발효물의 위암(MKN45)과 유방암(MCF7) 세포 증식억제 활성은 Figure 3에 나타내었다. 먼저, 위암(MKN45) 세포주에 대한 고추발효물의 암세포 증식억제율은 비발효 대조군의 경우 발효 0시간에 62%의 억제율을 보이다가 발효 시간에 따라 다소 차이(41~60%)를 보이기는 하였으나, 96시간에는 65%의 암세포 억제 효과를 보여 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았으나, 고추발효물에서는 0시간에 52%의 억제율이 24시간 이후 62%로 증가세를 보인 후 72시간까지는 유지하다가 96시간에 75%의 억제율을 나타내어 발효가 진행됨에 따라 비발효 대조군보다 증가하는 경향을 보였으나 대조군과 유의적인 차이는 보이지 않았다(Figure 3A). 또한, 유방암(MCF7)에 대한 시료의 독성효과는 Figure 3B에 나타내었는데, MCF7 세포주에 대하여 균주를 접종하지 않은 대조군인 청양고추 착즙 원액(control)과 *B. subtilis* 고추발효물의 암세포 억제 효과는 발효 48시간까지 유의적인 차이를 나타내지 않으면서 억제 활성이 감소하다가(0시간 65%; control 35%; 고추발효물 18%) 이후에는 다소 증가하는 경향을 보였으나, 발효 96시간에 유의적인 차이 없이



**Fig. 3. Comparison of cytotoxicity on fermentation time in submerged culture of pepper by *B. subtilis*.** Cytotoxicity; inhibition ratio of cancer cell proliferation against sample by MTT assay. \*  $p < 0.05$ ; significant difference between control (non-fermented pepper) and fermented pepper.

대조군보다 낮은 활성을 나타내면서(control 43%; 고추발효물 40%), 0시간보다 유방암 세포주에 대한 증식 억제 효과는 현저히 감소하는 경향을 나타내었다.

한편, 폐암(NCI-H460) 및 대장암(HCT116) 세포주에 대한 발효 중 경시적인 독성효과는 Figure 4에 나타내었다. 폐암(NCI-H460) 세포주에 대한 억제 활성에서는 발효 시간의 경과에 따른 유의적인 증가는 보이지 않았으며, 24시간에 다소 감소한 후 비발효 대조군은 48시간에 0시간의 억제 활성(51%)으로 회복되어 감소세가 적었지만(96시간 48%), 발효물의 경우에는 48시간 이후 급속히 감소하여 96시간에 13%의 억제 활성을 보여 비발효 대조군과 비교하여 폐암 세포주에 대한 증식 억제 활성이 현저히 감소함을 나타내었다(Figure 4A). 마지막으로 대장암(HCT116) 세포주에 대한 *B. subtilis* 고추 액체발효물의 암세포 증식억제율은 발효 시간에 따라 다소간의 차이를 보이기는 하였으나, 96시간 발효 후 52%의 억제 활성으로 0시간의 47%에 비교하여 유의적인 증가를 나타내었고, 비발효 대조군(57%) 수준의 암세포 증식 억제 활성을 나타내었다(Figure 4B).

Yoon 등(19)은 고추 재배방식과 품종에 따른 고추 메탄올 추출물의 유방암, 폐암 및 대장암에 대한 암세포 증식 억제 활성 실험에서 암 세포주에 따라 60~80%의 높은 암세포 증식 억제 활성을 보고하였으며, human endothelial cells (ECV 304)를 이용한 Richeux 등(20)의 결과에서 고추의 주 성분인 capsaicin이 175  $\mu\text{mol}$ 에서 50%의 암세포 저해 효과를 보고하였다. 본 연구의 결과에서는 청양고추 자체의 추출물이 아닌 발효물임과 함께 항암 활성 성분으로 알려진 capsaicin의 감소에도 불구하고, 대조군과 유사하거나 위암

과 대장암 세포주에서는 비발효 대조군보다 증가한 독성활성을 보인 것은 *B. subtilis*의 액체배양 고추발효물이 항산화 활성과 함께 기능성식품 소재로서의 활용 가능성을 충분히 제시한 것으로 생각한다.

#### IV. 결 론

고추의 식품소재로서의 활용성을 높이기 위해 고추발효 식품으로부터 분리한 *Bacillus subtilis*를 이용하여 매운맛이 감소한 액상 발효물을 제조하고, 발효 시간에 따른 항산화 및 암세포 증식억제 활성을 평가하여 발효 시 고추의 생리활성에 미치는 영향을 조사하였다. 항산화 성분 함량의 경우에는 폴리페놀 함량이 발효 48시간부터 증가하여 96시간에 비발효 대조군의 1.2배인 0.83 mg GAE/mL에 도달하였고, 플라보노이드 함량은 발효 96시간까지 0.097 mg CE/mL로 비발효군에 비해 1.7배 증가하였다. ABTS 라디칼 소거능을 이용한 항산화 활성도 96시간 발효 시 비발효 대조군에 비해 3.4배(2.1 mg AEAC/mL) 증가하였다. 한편, *B. subtilis*에 의한 청양고추의 액체발효는 매운맛 성분인 캡사이신을 감소시켰는데 capsaicin은 항암성분으로 알려져 있으므로, 고추발효 과정 중 암세포(위암 MKN45, 유방암 MCF7, 폐암 NCH-H460 및 대장암 HCT116)에 대한 증식억제 활성을 경시적으로 검토하였다. 고추발효물은 위암 세포주에서 96시간 발효 후 75%의 저해 활성으로 비발효 대조군에 비해 높은 증식억제 활성을 나타내었고, 다른 암 세포주에서도 대조군과 유사한 저해 활성을 보였다. 결론적으로, *B. subtilis*-고추 액체발효물은 매운맛은 감소하였지만 생리활성은 유

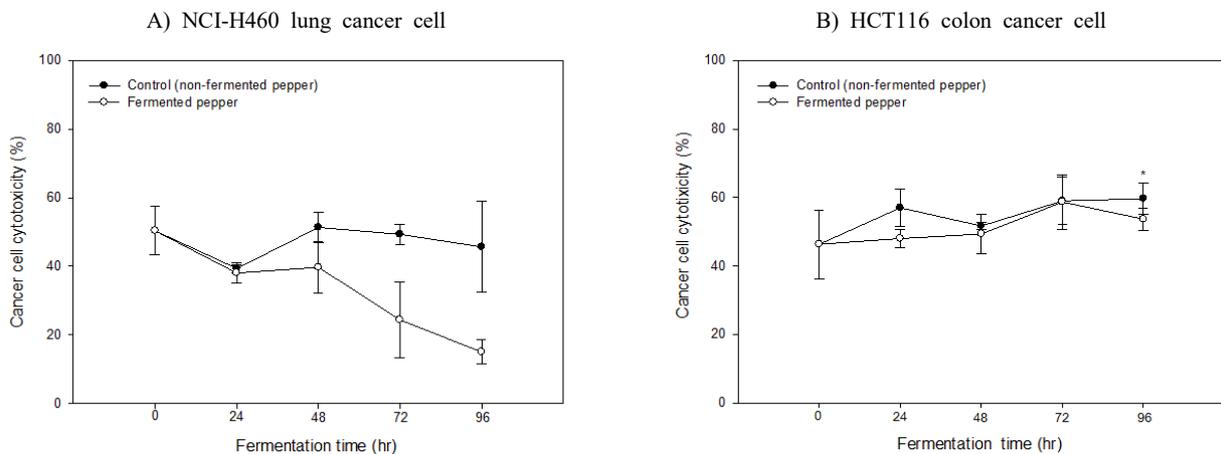


Fig. 4. Comparison of cytotoxicity on fermentation time in submerged culture of pepper by *B. subtilis*. Cytotoxicity; inhibition ratio of cancer cell proliferation against sample by MTT assay. \*  $p < 0.05$ ; significant difference between control (non-fermented pepper) and fermented pepper.

지되어 기능성식품 소재로 활용될 가능성을 제시하였다.

## 사 사

이 논문은 2021년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구임.

## 참고문헌

1. Massey PB. (2002) Dietary supplements. *Med Clin North Am.* 86, 127~47.
2. Adefegha SA. (2018) Functional foods and nutraceuticals as dietary intervention in chronic diseases: Novel perspectives for health promotion and disease prevention. *J Diet Suppl.* 15, 977~1009.
3. OECD Health statistics 2021. (2021). <http://www.oecd.org/health/health-data.htm>
4. Probst YC, Guan VX, Kent K. (2017) Dietary phytochemical intake from foods and health outcomes: A systematic review protocol and preliminary scoping. *BMJ Open.* 7, 1~9.
5. Chopan M, Littenberg B. (2017) The association of hot red chili pepper consumption and mortality: A large population-based Cohort study. *PLoS One.* 12, e0169876.
6. Yokoyama K, Yamada Y, Akamatsu Y, et al. (2020) Effects of capsaicinoids on daily physical activity, body composition and cold hypersensitivity in middle-aged and older adults: A randomized study. *Nutrients.* 12, 212.
7. Srinivasan K. (2016) Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56, 1488~500.
8. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, et al. (1998) Anti-oxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* 46, 4113~7.
9. Stankovic MS. (2011) Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci.* 33, 63~72.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. (1999) Anti-oxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26, 1231~7.
11. Leong CN, Tako M, Hanashiro I, et al. (2008) Anti-oxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L. *Food Chem.* 109, 415~20.
12. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 65, 55~63.
13. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 81, 215S~7S.
14. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Technol Metall.* 40, 255~60.
15. Sacipriya G, Miria CL, Siddhuraju P. (2014) Influence of pressure cooking on antioxidant activity of wild (*Ensete superbum*) and commercial banana (*Musa paradisiaca* var. *monthan*) unripe fruit and flower. *J Food Sci Technol.* 51, 2517~25.
16. Ali MW, Shahzad R, Bilal S, et al. (2018) Comparison of antioxidants potential, metabolites, and nutritional profiles of Korean fermented soybean (*Cheonggukjang*) with *Bacillus subtilis* KCTC 13241. *J Food Sci Technol.* 55, 2871~80.
17. Joung JY, Lee JY, Ha YS, et al. (2016) Enhanced microbial, functional and sensory properties of herbal yogurt fermented with Korean traditional plant extracts. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 36, 90~9.
18. Kim SY, Yang EJ, Son YK, et al. (2016) Enhanced anti-oxidative effect of fermented Korean mistletoe is originated from an increase in the contents of caffeic acid and lyoniresinol. *Food Funct.* 7, 2270~7.
19. Yoon J, Jun JJ, Lim SC, et al. (2010) Changes in selected components and antioxidant and antiproliferative activity of peppers depending on cultivation. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39, 731~6.
20. Richeux F, Cascante M, Ennamany R, et al. (2000) Implications of oxidative stress and inflammatory process in the cytotoxicity of capsaicin in human endothelial cells: Lack of DNA strand breakage. *Toxicology.* 147, 41~9.