

토마토 발효액을 이용한 고추장의 이화학적 및 기능적 특성

임은정¹ · 조승화¹ · 정도연^{1,*}

¹(재)발효미생물산업진흥원

Physicochemical and functional properties of *Gochujang* with fermented tomato products

Eun-Jung Yim¹, Seung-Wha Jo¹, and Do-Youn Jeong^{1,*}

¹Microbial Institute for Fermentation Industry

Abstract This study was conducted to investigate the physicochemical and functional properties of *Gochujang* in the presence of fermented tomato products. To accomplish this aim, tomatoes were fermented using *Bacillus subtilis* SRCM100333, and the products were used with *Gochujang*. As a control, non-fermented tomato liquid was used with *Gochujang*. There were no significant differences in quality characteristics except for amino nitrogen in *Gochujang*. The functional properties of tomato liquid (TL), fermented tomato product (FTP), *Gochujang* made with tomato liquid (TLG), and *Gochujang* made with fermented tomato products (FTG) were investigated. There were significant differences in the pancreatic lipase inhibition (PLI) and superoxide scavenging activity between FTP (87% and 28%, respectively) and TL (77% and 14%, respectively). Nitric oxide scavenging activity of FTG (52%) was higher than that of other groups (TL, FTP, and TLG). Overall, the results indicate that the fermented tomato can be used to develop functional *Gochujang*.

Keywords: Tomato, *Gochujang*, pancreatic lipase inhibitory activity, superoxide scavenging activity, nitric oxide scavenging activity

서 론

고추장은 우리나라에서 오랫동안 된장, 간장과 함께 꾸준히 이용되어 온 고유의 전통 발효식품이다. 고추장은 고춧가루의 매운 맛과 더불어 탄수화물이 분해되어 생성되는 당류의 단맛, 단백질이 분해되어 생성된 아미노산의 구수한 맛 그리고 소금의 짠맛 등이 잘 조화를 이루어 독특한 맛을 형성하는 복합 향신 조미료이다(Kwon 등, 1996). 또한 된장과 간장에 비해 다양한 비타민 및 엽산 등이 다량 함유되어 있고, 미생물의 대사 및 발효작용으로 생성되는 유기산, 핵산, 알코올 및 색소 등의 미량성분이 맛, 향 및 색 등과 조화를 이루는 식품이다(Woo와 Kim, 1990).

최근에는 식품 선택 시 식품의 관능적인 품질과 함께 기능성을 중시하는 소비자들의 경향으로 인해 식생활 문화가 변화하고 있다. 이러한 변화를 반영하여 식습관과 밀접하게 연관되어 있는 당뇨병(Lee 등, 2014)이나 비만(Kwon 등, 2014)과 같은 질병에 대한 식품 및 식품재료의 기능적 특성과 관련된 연구들도 보고되고 있다. 그중에서도 장류의 암세포증식 억제효과(Lim 등, 2004a), 항돌연변이 활성(Lim 등, 2004b), 항산화 활성(Lee 등, 1991), 혈압 강하 작용(Kim 등, 1999a), 항혈전 활성(Kim 등, 1999b) 등에 대한 연구와 더불어, 고추장에 과즙(Park 등, 1993),

마늘(Yoo 등, 1995), 키토산(Na 등, 1997), 키위(Kim과 Song, 2002), 동충하초(Bang 등, 2004), 톳(Kim 등, 2012a), 더덕(Kim 등, 2012b), 버섯(An 등, 2003), 양파(Kim 등, 2005), 홍삼(Shin 등, 1999) 및 브로콜리(Oh 등, 2013) 등을 첨가하여 풍미와 기능성을 동시에 향상시킨 연구들이 보고되고 있다.

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.)는 가지과에 속하는 일년생 작물로, 각종 비타민과 무기질, 글루탐산을 비롯한 필수 아미노산이 골고루 존재하여 영양적으로 우수한 식품재료이다. 토마토에 함유된 라이코펜(lycopene)은 강력한 항산화제로서 활성산소 제거능이 뛰어나 다양한 질병과 암의 예방 효과가 있다고 보고되었으며(Masico 등, 1989), 비타민 C의 경우 채소작물 가운데 토마토에 가장 많이 함유되어 있다(Lee 등, 2008). 또한 토마토의 과피에 페놀 물질인 quercetin이 다량 함유되어 전립선암 예방에 효과적이라는 연구결과가 있으며(Friedman, 2002), 토마토에만 존재하는 tomatine은 인체 암세포에 대한 항암 화학 요법에 활용될 수 있는 것으로 보고되었다(Hwang과 Phyllis, 2004).

따라서 본 연구에서는 당뇨병, 비만, 면역질환 등의 질병과 관련된 식품의 기능적인 특성들을 중시하는 소비자들의 경향에 맞춰 기능성 토마토 발효액을 제조하여 다양한 한국음식에 활용하고자 하였다. 이를 위하여 토마토 발효액을 첨가하여 만든 고추장의 α -glucosidase inhibition 활성, pancreatic lipase inhibition 활성, superoxide 소거능, nitric oxide 생성 억제능 및 지방세포분화 억제 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 토마토는 전북 장수군에서 여름철에 수확

*Corresponding author: Do-Youn Jeong, Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI) Sunchang, Jeonbuk 56048, Republic of Korea

Tel : +82-63-650-2000

Fax : +82-63-653-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

Received January 20, 2020; revised March 4, 2020;

accepted April 7, 2020

한 데프니스 품종을 원물 상태로 구입하였으며, 쌀, 찹쌀, 고춧가루 등은 전북 순창군에서 재배되어 분말로 가공된 것을 구매하였다. 그 외의 소금, 물엿, 발효 주정 등의 부재료들은 시중에서 구입하여 사용하였다.

토마토 발효액의 제조

본 연구에서는 토마토 발효 고추장에 적합한 발효 균주를 선별하기 위하여, (재)발효미생물산업진흥원(Sunchang, Korea)에서 기보유 중인 *Bacillus* 속 균주들 중에서 α -glucosidase inhibition (AGI) 활성을 지닌 균주를 토마토와 발효시켜 사용하고자 하였다. 토마토는 세척 후 꼭지를 제거하고 믹서기를 사용하여 착즙한 뒤 고추장용 메줏가루를 첨가하여 121°C에서 15분간 가열하였다. 토마토 착즙액을 식힌 후 nutrient broth (NB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 전 배양시킨 선발된 발효 균주 *Bacillus subtilis* SRCM100333를 1% (w/v) 접종하였고, 37°C에서 200 rpm의 교반속도로 120시간 발효하였다. 대조구로 사용한 토마토 착즙액은 균주를 접종하지 않았으며, 제조된 발효액은 항후 기능성 분석 및 토마토 발효 고추장에 첨가하여 사용되었다.

토마토 고추장의 제조

고추장 제조 시 토마토 발효액과 (재)발효미생물산업진흥원에서 보유 중인 당화력이 우수한 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 제조한 쌀 코지에 소맥분(국산), 천일염(전남 신안) 등의 부재료의 비율을 결정하고 첨가하여 1차 숙성물을 제조하였다. 쌀 코지는 멥쌀(전북 순창)을 물에 12시간 이상 침지한 후 121°C에서 30분간 가열하여 식힌 후 발효균주인 *A. oryzae*를 접종하였고, 30°C에서 습도 80% 이상으로 72시간 발효 후 건조, 분쇄하여 코지를 제조하였다. 대조구로는 토마토를 발효하지 않고 첨가하였다. 1차 숙성물은 30°C에서 발효하며 발효 기간에 따라 아미노산성 질소값이 적정 수준까지 증가함을 확인한 후 물엿, 주정 등의 비율을 결정하고 혼합하여 토마토 발효 고추장을 제조하였다(Table 1). 제조된 토마토 첨가 고추장과 토마토 발효 고추장은 토마토 발효액과 함께 기능성 분석의 시료로 사용하였다.

이화학적 특성

토마토 고추장의 이화학적 특성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 수분함량은 적외선 수분측정기(JP/FD-720, Kett engineering, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. pH 및 적정 산도는 시료 5g을 10배 희석하여 pH meter (Mettler Toledo CH/MPC227, Switzerland)로 측정하였다. 적정 산도는 0.1 N NaOH를 가하여 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고, 이 때 소비된 양(mL/g)을 표시하였다. 아미노산성 질소는 Formol 적정법을 사용하여 시

료 2g을 취하여 증류수 100 mL를 가하고 1시간 동안 교반한 후 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하고, 중성 포르말린 용액 20 mL를 가한 후 다시 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4가 되도록 적정하였다. 이후 별도로 증류수를 이용하여 바탕 시험을 시행한 후 아미노산성 질소 함량을 측정하였다. 색도는 색차계(CR-400, Minolta Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 L* (lightness), a* (redness), b* (yellowness) 값을 측정하였다. 샘플은 5g씩 채취하여 직경 3.5 cm petri dish에 담아 백색판 위에서 측정하였고, 실험에 앞서 표준 백색판(L*=97.79, a*=-0.38, b*=2.05)으로 보정한 후 측정하였다. 염도는 시료 10g을 취해 증류수 90 mL를 가하여 충분히 혼합한 후 디지털 염도계(TM-30D, Takemura Electric works Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정된 값에 희석배수를 곱하여 나타내었다.

유기산 및 유리당

유기산과 유리당의 분석은 고추장 5g에 증류수 45 mL를 가하여 1시간 동안 균질화시킨 후 0.45 μ m membrane filter에 통과시킨 후 시료로 사용하였다. 전처리된 시료 20 μ L를 refractive index detector (RID), diode array detector (DAD) (210 nm), Aminex HPX-87P column (300 \times 7.8 mm)이 장착된 HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 5 mM H₂SO₄을 이동상으로 사용하여 50°C에서 분당 유속 0.6 mL의 조건으로 동시 분석하였다.

유리 아미노산

유리 아미노산은 고추장 2g을 취하여 3차 증류수 30 mL를 넣고 교반한 후 50 mL로 정용하고 초음파를 이용하여 20분간 추출한 후 원심분리(3,000 rpm, 10분, J-26 XPI, Beckman, Indianapolis, USA)하였다. 상등액 2 mL에 5% trichloroacetic acid (TCA) 2 mL를 넣고 원심분리(10,000 rpm, 10분)하여 0.02 N HCL로 희석한 상등액을 0.2 μ m syringe filter에 통과시킨 후 amino acid analysis (L-8900, Hitachi high-technologies Co., Tokyo, Japan), UV/Vis Detector (440-570 nm), column (Hitachi 4.6 \times 60 mm separation, Hitachi 4.6 \times 40 mm Ammonia filtering)을 사용하여 분석하였다. 시료량은 20 μ L, 이동상은 buffer set (PH-SET, KANTO, Tokyo, Japan), 분석 온도는 50°C, buffer 유속은 0.40 mL/min, ninhydrin 유속은 0.35 mL/min으로 분석하였다.

α -Glucosidase inhibition 활성

토마토 발효액 및 고추장을 시료로 하여 α -glucosidase inhibition (AGI) 활성을 측정하였다. AGI 활성은 Watanabe 등(1997)의 방법을 변형하여 측정하였다. 토마토 발효액 및 고추장 3g에 70% 에탄올을 첨가하여 20°C에서 10시간 추출 및 100 mL로 정용한 후 시료로 이용하였다. 시료 50 μ L에 0.5 U/mL α -glucosidase 효소액 50 μ L (in 0.1 M PBS, pH 6.8)를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 3 mM ρ -nitro-phenyl- α -glucopyranoside (ρ -NPG, in 0.1 M PBS, pH 6.8) 100 μ L를 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시켰으며 0.1 M Na₂CO₃ 100 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 생성된 ρ -nitrophenol의 양을 분광광도계(elisa reader, Infinite 200 TECAN, Grodic, Austria)를 사용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

Pancreatic lipase inhibition 활성

Pancreatic lipase inhibition (PLI) 활성은 Jung 등(2012)의 방법을 변형하여 측정하였다. 토마토 발효액 및 고추장 3g에 80% 메

Table 1. Mixing ratio of raw material for Gochujang preparation

Raw materials	Ingredient ratio (%)
Tomato	25.0
Red pepper	17.8
Glutinous rice	11.3
Rice	10.0
Sea salt	6.7
Meju	3.3
Water	1.2
Starter	0.03
Starch syrup	25.0
Ethyl alcohol	3

탄올을 이용하여 24시간 동안 실온에서 진탕 추출한 후 100 mL로 정용한 후 시료로 이용하였다. Porcine pancreatic lipase 0.3 mg에 10 mM MOPS와 1 mM EDTA (pH 6.8)를 포함하는 buffer를 30 µL를 넣고 tris buffer (100 mM tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)를 850 µL 첨가하여 enzyme buffer를 준비하였다. Enzyme buffer에 시료 20 µL를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 10 mM ρ-nitrophenyl butyrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 20 µL를 첨가하여 다시 37°C에서 15분간 반응시켰다. ρ-Nitrophenyl butyrate가 ρ-nitrophenol로 가수분해된 정도를 분광광도계를 사용하여 흡광도 400 nm에서 측정하였다. Lipase 저해활성(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Pancreatic lipase inhibitory activity (\%)} = [1 - (B - C) / A] \times 100$$

- A: Absorbance without addition of the sample
- B: Absorbance of the sample
- C: Absorbance without addition of the enzyme

Superoxide 소거능

항산화 활성은 superoxide (SO) 소거능으로 확인하였다. SO의 소거능은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 확인하였다. 시료를 최종 농도가 0.1%, 0.5%, 1%가 되게 희석한 다음, kit 내 reaction solution에 섞어 96-well plate에 넣고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 450 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후, 아래 수식을 통해 SO 소거능을 산출하였다.

$$\text{SO scavenging activity (\%)} = \{[(C - D) - A - B] / (C - D)\} \times 100$$

- A: sample과 reaction solution을 반응시킨 후 흡광도
- B: sample과 WST Working Solution을 반응시킨 후 흡광도
- C: reaction solution 흡광도
- D: WST Working Solution 흡광도

세포 독성

토마토 발효액 및 토마토 발효 고추장을 각각 증류수와 1:1로 섞은 후 원심 분리 한 다음 상등액을 0.2 µm syringe filter를 사용하여 여과한 후 시료로 사용하였고, 세포 독성을 Desai 등(2008)의 방법에 준하여 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay를 통해 확인하였다. 정상 세포주인 293T (human kidney epithelial cell) 세포를 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 시료의 안전성을 알아보기 위해 293T (human kidney epithelial cell) 세포에서 MTS assay 방법을 통해 세포의 생존율을 측정하였다. 293T (human kidney epithelial cell) 세포를 96-well plate에 2×10⁴ cell/well씩 분주한 다음 농도별로 시료를 처리하고 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTS 용액을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 분광광도계로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

Nitric oxide 생성 억제능

Nitric oxide (NO) 생성 억제능은 Raw 264.7 세포(mouse monocyte/macrophage-like cell)를 10% FBS가 첨가된 phenol red free DMEM을 이용하여 24-well plate에 5×10⁵ cell/well씩 분주한

다음, 시료를 최종 농도가 0.1, 0.5, 1%가 되게 처리하고 48시간 배양하였다. 배양액은 Griess reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 1:1로 96-well plate에 처리하고, 상온에서 15분간 반응한 다음 540 nm 파장으로 측정하였다. Lipopolysaccharide (LPS)는 실험 대조군으로 이용하였다.

지방세포분화 억제활성

지방세포분화 억제 활성을 평가하기 위하여 3T3-L1 전지방 세포를 분화하여 세포 내 지방 축적률을 Oil red O 염색을 통해 확인하였다. 시료는 세포독성실험과 동일한 방법으로 제조한 시료를 사용하였다. 3T3-L1 전지방 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하고 DMEM에 10% bovine calf serum (BCS)과 1% penicillin streptomycin이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 3T3-L1 전지방 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM을 이용하여 지방세포로 분화하였다. 3T3-L1 전지방 세포를 각 well에 같은 양을 분주하여 세포를 배양한 후 100% confluency가 되면 2일간 그대로 유지한다. 전지방 세포에 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, insulin (MDI) 배지를 포함한 10% FBS DMEM으로 지방세포분화를 유도하고 72시간 후 1 µg/mL insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후 10% FBS DMEM으로 교체하여 지방세포 분화를 유도하였다. 지방세포 분화 유도 동안 시료를 처리하지 않은 군을 대조군으로 명명하고 각 시료를 농도별로 처리하여 실험하였다. 분화가 완료된 well dish에서 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척하고 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 세포를 고정하였다. 10% formaldehyde 용액을 제거한 후 증류수로 2회 세척하고 60% isopropyl alcohol로 5분간 고정한 다음 제조된 Oil red O 염색액을 처리하여 10분간 염색하였다. 염색 후 염색액을 제거한 다음 증류수로 세척하고 100% isopropyl alcohol을 처리하여 세포의 지방구에 염색된 Oil red O 염색액을 용출한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복하여 결과를 도출했으며, 통계 프로그램(SPSS ver. 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균±표준편차(Mean±SD)로 계산하였다. 각 시험군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 독립 표본 t검정(independent samples t-test)과 one-way analysis of Variance (ANOVA) test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다 (p<0.05).

결과 및 고찰

이화학적 특성

토마토 발효 고추장과 대조군인 토마토 첨가 고추장의 이화학적 특성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 토마토의 발효 여부에 따른 고추장은 아미노산성 질소 함량을 제외하고, 다른 특성은 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 아미노산성 질소 함량은 고추장의 구수한 맛에 영향을 미치는 성분으로 고추장의 일반적 인 품질지표로 사용되며, 유리 아미노산의 함량과 관련이 있다 (Yoo 등, 1995). 토마토 발효 고추장의 아미노산성 질소 함량이 높은 이유는 발효 균주로 사용된 *Bacillus* 속 균주가 지닌 단백질 분해능(Choi와 Kim, 2017)으로 인해 고추장의 유리 아미노산이 증가되었기 때문인 것으로 추측된다.

Table 2. Physicochemical characteristics of Gochujang made with tomato liquid or fermented tomato products

Constituents	TLG ¹⁾	FTG ²⁾	p	t
Moisture (%)	45±0.70 ³⁾	44±0.14	.112	2.035
Salinity (%)	6.2±0.09	6.2±0.10	.973	.036
pH	4.7±0.13	4.7±0.05	.949	.069
Titrateable acidity (mL/g)	2.82±0.11	2.86±0.05	.723	-.381
Amino nitrogen (mg%)	178±3.74	204±3.56	.002*	-7.120
Chromaticity (L value)	22.44±0.75	23.36±0.76	.288	-1.223

¹⁾Gochujang made with tomato liquid²⁾Gochujang made with fermented tomato products³⁾Values are means±SD (n=3).*Significantly different at $p<0.05$ **Table 3. Free sugars and organic acids contents of Gochujang made with tomato liquid or fermented tomato products** (unit: ppm)

Constituents	TLG ¹⁾	FTG ²⁾	p	t	
Free sugars	Maltose	3732±76.71 ³⁾	3571±63.30	.084	2.285
	Glucose	27500±398.08	25132±634.68	.011*	4.470
	Fructose	1065±13.95	1450±27.07	.000*	-17.880
Organic acids	Citric acid	488±9.90	651±20.82	.001*	-10.019
	Succinic acid	70±1.70	80±2.94	.016*	-4.022
	Lactic acid	21±1.41	22±0.82	.435	-.886
	Acetic acid	21±0.47	20±0.47	.101	2.121

¹⁾Gochujang made with tomato liquid²⁾Gochujang made with fermented tomato products³⁾Values are means±SD (n=3).*Significantly different at $p<0.05$

유리당 및 유기산

토마토의 주성분은 당질이며, 신맛을 내는 유기산으로 citric acid, malic acid, tartaric acid를 함유하고 있어 소화를 돕고, 에너지를 생성하는 작용을 한다고 알려져 있다(Ha와 Choi, 1988). 토마토 발효 고추장과 대조구인 토마토 첨가 고추장의 유리당, 유기산 분석 결과 glucose, fructose, citric acid, succinic acid 함량은 유의적 차이를 보였다(Table 3). 유리당 중에서는 glucose 함량이 가장 높게 분석되었으며, 시판 고추장에서 검출되는 sucrose, galactose, rhamnose 등은 확인되지 않았다. 이는 사과, 파인애플, 포도 등의 과즙을 첨가하여 제조한 고추장에서도 주된 유리당의 성분은 glucose였던 연구와 비슷한 결과를 보였으며(Kim 등, 1999), 이는 코지 및 메주에 함유된 전분질 분해효소의 종류와 그 활성에 따른 것으로 생각된다(Shin 등, 1997).

유리 아미노산

유리 아미노산 분석 결과 총 23종이 검출되었으며 그중 필수 아미노산인 threonine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, histidine, arginine, lysine이 모두 함유되어 있었다. 아미노산 중 글루탐산은 다른 아미노산에 비해 높은 함량을 나타냈다(Table 4). 이는 수박, 참외, 복숭아, 자두 등의 다른 과일보다 맛난 맛을 내는 글루탐산이 토마토에 더 많이 함유되어 있기 때문으로 생각된다(Lee 등, 1972). 토마토 첨가 고추장과 토마토 발효 고추장의 유리 아미노산의 함량은 ammonia arginine를 제외하고는 모두 유의적으로 차이가 있었다. 그 중에서 γ -aminobutyric acid (GABA)는 토마토 첨가 고추장보다 토마토 발효 고추장에서 유의적으로 많이 측정되었다. 토마토는 많은 양의 글루탐산을 함유하고 있으므로(Cho 등, 2012) 토마토 발효 고추장의 GABA 함량이 더 높은 결과는 미생물이 글루탐산을 GABA로 전환시켰기 때문인 것으로 판단된다.

α -Glucosidase inhibition 활성

α -Glucosidase는 소장의 brush-border membrane에 존재하여 α -amylase에 의해 분해된 당질 중 엿당을 최종적으로 포도당으로 전환시키는 효소이므로, α -glucosidase 활성을 저해시킴으로써 당질의 가수분해를 방해하고 포도당의 흡수 과정을 지연시켜 식후 혈당 농도를 조절할 수 있다(Hong 등, 2008; Lee 등, 2014). 토마토 착즙액 및 토마토 발효액의 AGI 활성을 측정한 결과 각각 82.41, 84.45%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 2종류의 토마토 고추장의 활성 결과 역시 각각 97.93, 98.44%로 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1). 양성 대조구로 이용된 acarbose (10 mg/mL: 77.34%)에 비해 토마토 고추장(30 mg/mL: 97.93, 98.44%)의 농도 대비 활성은 낮았지만 토마토를 이용한 고추장은 토마토 착즙액에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 이는 고추장의 제조 시 토마토의 첨가는 혈당 강하 능력에 도움을 줄 것으로 판단되었다.

Pancreatic lipase inhibition 활성

Pancreatic lipase는 중성지방을 분해하는 효소로 효소의 활성이 과도하면 지방 축적이 높아져 비만을 초래할 수 있다. 지방흡수의 중요한 역할을 하는 lipase의 활성을 저해함으로써 지방의 축적을 막을 수 있다(Kwon 등, 2014). 항비만 효과를 판단하기 위해서 토마토 발효액 및 고추장에 대하여 pancreatic lipase를 이용한 실험을 수행하였다. 그 결과 농도에 따라 저해 활성이 높아지는 결과를 보였다. 토마토 착즙액 및 토마토 발효액은 30 mg/mL 농도에서 각각 77.26, 87.02%를 나타내었으며, 토마토 첨가 및 발효 고추장은 각각 70.36, 73.78%를 나타내었다(Fig. 2). 식품원료의 발효에 따른 pancreatic lipase inhibition 활성에 관한 연구로는 꾸지뽕 열매 발효물의 pancreatic lipase inhibition 활성이 발효 후에 증가되었다는 결과가 보고되었다(Lee 등, 2014). 토마토 발효

Table 4. Free amino acid contents of *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products (unit: ppm)

Amino acids	TLG ¹⁾	FTG ²⁾	p	t
Aspartic acid	652.7±10.97 ³⁾	554.1±10.34	.001*	9.249
Threonine	222.1±11.43	184.4±5.67	.014*	4.179
Serine	306.5±9.20	264.8±12.56	.019*	3.788
Glutamic acid	816.7±14.55	744.6±14.99	.008*	4.880
Glycine	188.3±7.64	148.9±8.35	.008*	4.923
Alanine	442.8±18.29	361.7±5.75	.004*	5.983
Citrulline	122.6±1.69	87.8±2.41	.000*	16.750
Valine	382.7±18.70	300.0±11.40	.006*	5.342
Cystine	38.3±2.02	177.7±6.69	.000*	-28.219
Methionine	92.1±1.89	135.2±3.97	.000*	-12.805
Cystathionine	398.0±5.72	90.9±2.70	.000*	68.715
Isoleucine	340.2±13.41	305.7±11.18	.049*	2.795
Leucine	587.0±12.75	493.7±14.91	.003*	6.724
Tyrosine	283.4±10.91	235.0±12.94	.016*	4.043
Phenylalanine	388.0±2.94	312.0±4.15	.000*	21.114
β-Alanine	313.4±7.12	282.1±13.49	.044*	2.903
β-Aminobutyric acid	57.6±1.36	49.5±1.48	.005*	5.699
γ-Aminobutyric acid	116.8±7.86	248.2±4.88	.000*	-20.090
Ammonia	166.7±9.46	160.3±7.78	.501	0.739
Ornithine	40.2±1.68	30.4±0.88	.002*	7.318
Lysine	502.6±12.38	416.4±17.94	.005*	5.592
Histidine	74.5±3.75	58.7±2.05	.007*	5.224
Arginine	451.8±3.93	340.5±89.91	.155	1.749
Totals	6,985.0±25.91	5,982.6±145.04	.001*	9.654

¹⁾*Gochujang* made with tomato liquid

²⁾*Gochujang* made with fermented tomato products

³⁾Values are means±SD (n=3).

*Significantly different at $p < 0.05$

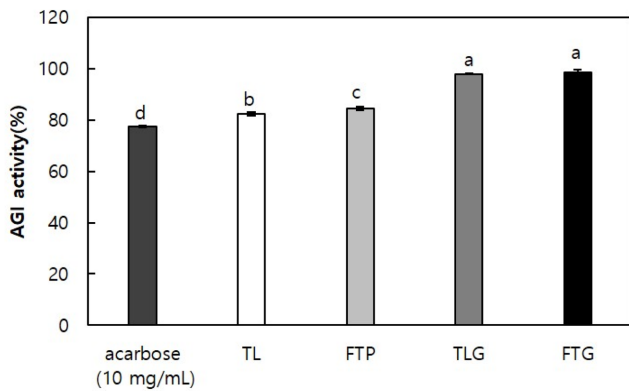


Fig. 1. α-Glucosidase inhibition activity of tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p < 0.05$ for each concentration.

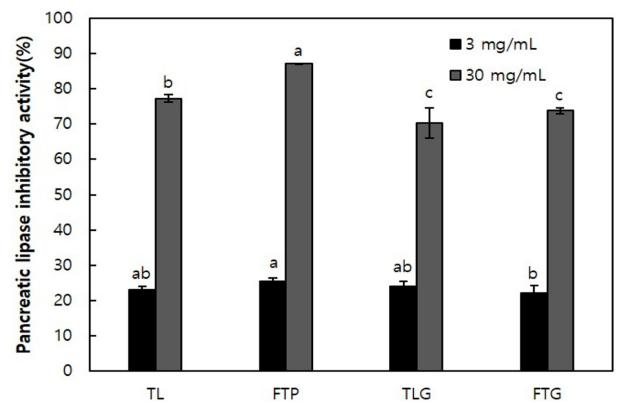


Fig. 2. Pancreatic lipase inhibition activity of tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p < 0.05$ for each concentration.

액은 발효하지 않은 토마토 착즙액에 비하여 pancreatic lipase 억제 효과가 높게 나타났다. 이는 토마토에 함유된 것으로 알려진 항산화 물질이나 페놀 성분의 활성이 발효미생물에 의해 높아졌기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 고추장의 경우 토마토 첨가구와 토마토 발효 첨가구에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았

으며, 이는 고추장의 부재료 및 숙성과정, 미생물의 영향 때문인 것으로 판단된다.

세포 독성

토마토 발효액 및 토마토 고추장을 0.1, 0.5, 1% 농도로 293T

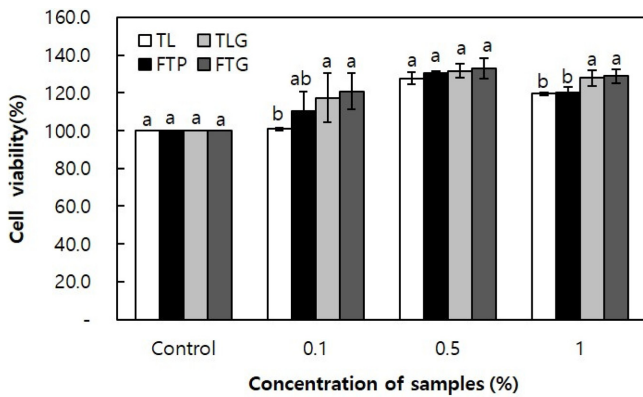


Fig. 3. Cytotoxicity of tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p<0.05$ for each concentration.

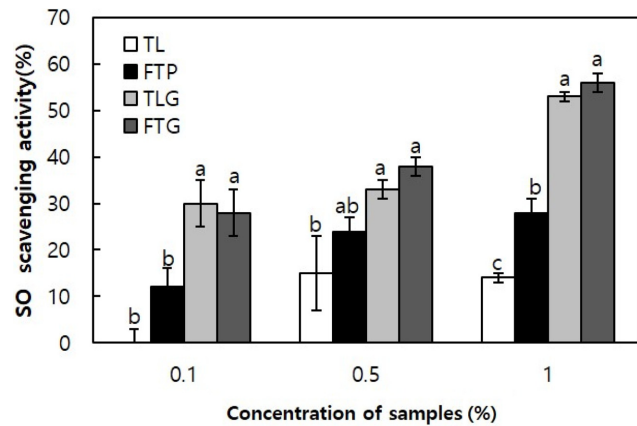


Fig. 4. Superoxide scavenging activity of tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p<0.05$ for each concentration.

세포에 처리하여 세포 독성을 확인한 결과, 모든 시료에서 293T 세포에 대한 세포 독성은 나타나지 않아 시료의 안전성이 확인되었다(Fig. 3).

Superoxide 소거능

노화와 성인병 질환의 원인은 생체 내에서 발생하는 superoxide radical, hydroxyl radical, hydroperoxyl radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide 등과 같은 활성 산소 종에 의한 산화적 대사 부산물에 기인할 수 있으며(Lee 등, 2004), 이러한 활성 산소종들을 조절하는데 관여하는 다양한 항산화제들이 알려져 있다(Lee 와 Lee, 2004). 고추장의 경우 마늘(Song 등, 2008), 더덕(Kim 등, 2012b), 작두콩 청국장(Chang 등, 2013) 등을 첨가하였을 때 항산화 활성이 증가되었다는 연구가 있다. 토마토 착즙액의 항산화 효과를 검증하기 위하여 SO 소거능을 측정된 결과, 토마토 발효액 1% 처리 시험구에서는 토마토 착즙액의 2배인 28%의 소거능이 확인되었고, 토마토 첨가 고추장 및 토마토 발효 고추장은

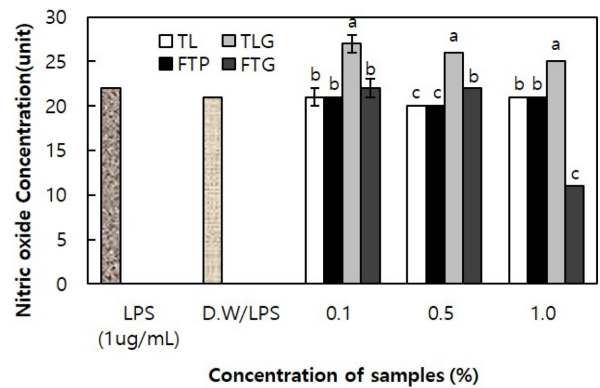


Fig. 5. Production of nitric oxide in tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products; LPS, lipopolysaccharide; D.W/LPS, lipopolysaccharide made with distilled water. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p<0.05$ for each concentration.

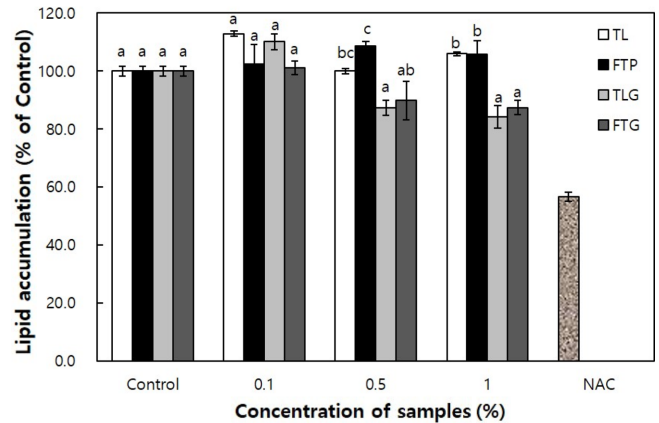


Fig. 6. Lipid accumulation of tomato and *Gochujang* made with tomato liquid or fermented tomato products. TL, tomato liquid; FTP, fermented tomato products; TLG, *Gochujang* made with tomato liquid; FTG, *Gochujang* made with fermented tomato products; NAC, N-acetyl cystein. Values are means±SD (n=3). Means with different letters above a bar are significantly different at $p<0.05$ for each concentration.

각각 53, 56%의 소거능이 확인되었다(Fig. 4). SO 소거능은 착즙액과 발효액에서는 그 차이가 뚜렷하였으나 고추장 제조 후에는 시료 간의 차이가 그대로 반영되지 않고 감소하였음을 알 수 있었다. 이는 토마토가 고추장의 원료로 들어가면서 그 양이 희석됨과 동시에 고추장의 다른 부재료들이 혼합되어 이와 같은 결과가 나타난 것으로 사료된다.

Nitric oxide 생성 억제능

Nitric oxide (NO)는 혈액응고와 혈압조절 기능 및 암세포에 대한 면역기능을 지닌 물질이지만, 과량 존재 시 세포 손상, 염증 반응과 같은 유해한 영향을 미친다고 알려져 있다(Chung 등, 2001). 토마토 발효 고추장은 1% 처리 시 52%의 NO 생성 억제능이 확인되었으나, 토마토 착즙액, 토마토 발효액에서는 NO 생성 억제능은 확인되지 않았다(Fig. 5). 또한 토마토 첨가 고추장에서 그 활성이 나타나지 않았는데 이는 토마토 발효 균주인

Bacillus 속이 고추장 발효 시 NO 생성을 억제하는 물질을 생성하였기 때문에 추측된다. 사과를 이용하여 제조한 고추장에서 사과 첨가 고추장 추출물보다 사과 발효 고추장 추출물에서 NO 생성 억제 활성이 높았다는 선행 연구 결과가 보고되었다(Jo 등, 2019).

지방세포분화 억제활성

Oil red O 염색을 통해 3T3-L1 세포 내에 생성된 지방구 축적률을 비교한 결과 토마토 착즙액과 토마토 발효액에서 지방세포분화 억제 활성이 확인되지 않았으나 토마토 고추장 시료에서는 토마토의 발효 유무와 상관없이 1% 구간에서 지방 축적률을 13-16% 정도 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이는 고추의 매운맛 성분인 capsaicin은 에너지 소비를 증가시켜 항비만 효과를 나타낸 기존의 연구결과들과(Choo와 Shin, 1999; Kawada 등 1986) 일치하며, 이는 고춧가루를 함유한 고추장 자체가 가진 효능이라 할 수 있다. 고지방식을 섭취시킨 흰쥐에 고추장을 함께 섭취시켰을 때 체중이 13%, 체지방 축적량이 30%가 감소하였다는 연구결과에서도 고추장에 함유된 고추의 capsaicin 성분이 에너지 소비량을 증가하는데 기여한 것으로 보고 있다(Choo, 2000).

요 약

Bacillus subtilis SRCM100333로 발효한 토마토 발효액을 제조하고, 이를 사용하여 제조한 고추장의 이화학적 및 기능성 특성을 비교하였다. 대조구로는 토마토 발효액 대신 발효하지 않은 토마토 액을 첨가하였다. 2종의 토마토 고추장 시료는 수분함량 44-45%, 염도 6.2%, pH 4.7, 적정 산도 2.8 mL/g, 색도(L 값) 22-23을 나타냈으며 아미노산성 질소를 제외한 모든 항목에서 유의적인 차이가 없는 경향을 보였다. 토마토 착즙액과 발효액 및 이를 첨가한 고추장의 기능성 분석결과, α-glucosidase 저해(AGI) 활성, pancreatic lipase 저해(PLI) 활성, 항산화, 지방세포분화 억제 활성을 보였으며 모든 시료에서 세포독성은 나타나지 않았다. 토마토 발효액은 토마토 착즙액에 비하여 더 높은 PLI 활성과 SO 소거능을 보였다. 토마토 발효액을 사용하여 고추장 제조 시 52%의 NO 생성 억제능을 보였으나, 대조구인 토마토 착즙액 고추장에는 NO 생성 억제능이 확인되지 않았다. 발효하지 않은 토마토 착즙액을 이용하여 고추장을 제조한 경우와 비교 하였을 때, 토마토 발효액을 첨가하여 제조한 고추장은 고유의 붉은색은 유지하면서 강한 매운맛은 감소하였으며 다양한 기능성이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과를 토대로 다양한 소비자자들의 기호를 충족시킬 수 있는 고추장 개발과 같은 추가적인 연구가 지속되기를 바란다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 지역전략식품육성사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

An MR, Jeong DY, Hong SP, Song GS, Kim YS. Quality of traditional *Gochujang* supplemented with mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*). J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 46: 229-234 (2003)
 Bang HY, Park MH, Kim GH. Quality characteristics of *Gochujang* prepared with *Paecilomyces japonica* from silkworm. Korean J.

Food Sci. Technol. 36: 44-49 (2004)
 Chang MI, Kim JY, Kim US, Back SH. Antioxidant, tyrosinase inhibitory, and anti-proliferative activities of *Gochujang* added with *Cheonggukjang* powder made from sword bean. Korean J. Food. Sci. Technol. 45: 221-226 (2013)
 Cho SC, Kim DH, Park CS, Koh JH, Pyun YR, Kook MC. Production of GABA-rich Tomato Paste by *Lactobacillus* sp. Fermentation. Korean J. Food Nutr. 25: 26-31 (2012)
 Choi CY, Kim MD. Isolation of a potent producing *Bacillus subtilis* from *Kimchi*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 45: 12-18 (2017)
 Choo JJ. Anti-obesity effects of *Gochujang* in rats fed on a high fat diet. Korean Nutr. Sci. 33: 787-793 (2000)
 Choo JJ, Shin HJ. Body-fat suppressive effects of capsaicin through β-adrenergic stimulation in rats fed high-fat diet. Korean J. Nutr. 32: 533-539 (1999)
 Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bio regulator of apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications 282: 1075-1079 (2001)
 Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. J. Pharm. Sci. 97: 2745-2756 (2008)
 Friedman M. Tomato glycoalkaloid: Role in the plant and in the diet. J. Agric. Food Chem. 50: 5751-5760 (2002)
 Ha SK, Choi YH. Rheological characteristics and viscosity prediction models of tomato ketchup suspensions. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 812-819 (1988)
 Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 957-964 (2008)
 Hwang ES, Phyllis E. Effect of tomatoes and lycopene on prostate cancer prevention and treatment. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 455-462 (2004)
 Jo SW, Kim EJ, Yim EJ, Kim JK, Jeong DY. Physicochemical and biological properties of *Gochujang* in the presence of fermented apple products. Korean J. Food Preserv. 26: 201-210 (2019)
 Jung SA, Kim KBWR, Kim DH, Cho JY, Kim TW, Ahn DH. Lipase inhibitory mode of dieckol isolated from *Eisenia bicyclis* ethanol extract. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 41: 112-118 (2012)
 Kawada T, Hgihara K, Iwai K. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. J. Nutr. 116: 1272-1278 (1986)
 Kim SH, Lee YJ, Kwon DY. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Doenjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 848-854 (1999a)
 Kim SH, Yang JL, Song YS. Physiological functions of *Chonggukjang*. Food Industry Nutr. 4: 40-46 (1999b)
 Kim YS, Song GS. Characteristics of kiwifruit-added traditional *Gochujang*. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 1091-1097 (2002)
 Kim JY, Park KY, Yang HS, Cho Ys, Jeong CH, Shim KH, Lee ST, Seo KI. Anticancer and immuno-activity of methanol extract from onion *Gochujang*. Korean J. Food Preserv. 12: 173-178 (2005)
 Kim JH, Song HS, Yang JY. Nutritional characteristics of *Gochujang* added with fermented extracts of *Hizikia fusiforme*. Korean J. Food Hyg. Satety 27: 473-478 (2012a)
 Kim OS, Sung JM, Rye HS. Antioxidative activity and quality characteristics of *Kochujang* amended with different ratios of Deodeok (*Condonopsis lanceolata*) root powder. J. East Asian Soc. Dietary Life 22: 667-676 (2012b)
 Kwon DJ, Jung JH, Kim JH, Park JH, Yoo JY, Koo YJ, Chung KS. Studies on establishment of optimal aging time of Korean traditional *Kochuhang*. Agric. Chem. Biotechnol. 39: 127-134 (1996)
 Kwon OJ, Lee HY, Kim TH, Kim SG. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of *Anemarrhena asphodeloides*. Korean J. Food Preserv. 21: 421-426 (2014)
 Lee DJ, Lee JY. Antioxidant activity by DPPH assay. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 12: 187-194 (2004)
 Lee ES, Jo SW, Yim EJ, Kim YS, Park HS, Kim MK, Cho SH. Fermentation characteristics of mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruits produced using microbes isolated from traditional fermented food, and development of fermented soybean food. Korean J. Food Preserv. 21: 866-877 (2014)
 Lee HB, Yang CB, Yu TJ. Studies on the chemical composition of

- some fruit vegetables and fruits in Korea. Korean J. Food Sci. Technol. 4: 36-43 (1972)
- Lee JH, Kim MH, Im SS. Antioxidative materials in domestic *Meju* and *Doenjang*-(1)-Lipid oxidation and browning during fermentation of *Meju* and *Doenjang*. J. Korean Soc. Food Nutr. 20: 148-155 (1991)
- Lee JN, Kim HE, Kim YS. Anti-diabetic and anti-oxidative effects of *Opuntia humifusa* Cladodes. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43: 661-667 (2014)
- Lee JS, Cho MS, Hong JS. Quality characteristics of *sulgidduk* containing added tomato powder. Korean J. Food Cookery Sci. 24: 375-381 (2008)
- Lee Km, Jeong GT, Park DH. Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar. J. Biotechnol. Bioeng. 19: 381-384 (2004)
- Lim SY, Rhee SH, Park KY. Inhibitory effect of methanol extract of *Doenjang* on growth and DNA synthesis of human cancer cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 936-940 (2004a)
- Lim SY, Rhee SH, Park KY, Yun HS, Lee WH. Inhibitory effect of methanol extracts and solvent fractions from *Doenjang* on mutagenicity using *in vitro* SOS chromotest and *in vivo* *Drosophila* mutagenic system. Korean J. Food Sci. Nutr. 33: 1432-1438 (2004b)
- Masico P, Kaise S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch. Biochem. Soc. Trans. 274: 532-538 (1989)
- Na SE, Seo KS, Choi JH, Song GS, Choi DS. Preparation of low salt and functional *Gochujang* containing chitosan. Korean J. Food Nutr. 10: 193-200 (1997)
- Oh YS, Beak JW, Park KY, wang JH, Lim SB. Physicochemical and functional properties of *Gochujang* with broccoli leaf powder. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 675-681 (2013)
- Park JS, Lee TS, Kye HW, Ahn SM, Noh BS. Study on the preparation of *Gochujang* with addition of fruit juices (in Korean). Korean J. Food Sci. Technol. 25: 98-104 (1993)
- Shin DH, Kim DH, Choi U, Lim MS, An EY. Physicochemical characteristics of traditional *Kochujang* prepared with various raw materials. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 907-912 (1997)
- Shin HJ, Shin DH, Kwak YS, Choo JJ, Ryu CH. Sensory evaluation and changes in microflora and enzyme activities of red ginseng *Gochujang*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 766-772 (1999)
- Song HS, Kim YM, Lee KT. Antioxidant and anticancer activities of traditional *Gochujang* added with garlic porridge. J. Life Sci. 18: 1140-1146 (2008)
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, NiKi R. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from tochucha (*Eucommia ulmoides*). Biosci. Biotech. Biochem. 61: 177-178 (1997)
- Woo DH, Kim ZU. Characteristics of improved *Gochujang*. Korean J. Agric. Chem. Soc. 33: 161-168 (1990)
- Yoo Ms, Park HJ, and Chang CM. The quality improvement of *Gochujang* (Korean red pepper paste) by adding ground garlic. RDA J. Agri. Sci. 37: 709-714 (1995)