

지역특산 전통된장의 항혈전 활성분석과 고기능성 된장 제조방법에 관한 연구

채희정* · 인만진**

(*호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공 · **청운대학교 식품영양학과)

Fibrin Clotting Inhibition Analysis of Traditional Doenjang and Manufacturing Method for High Functional Products

Chae, Hee-Jeong* · In, Man-Jin**

*Dept. of Food and Biotechnology., and

Dept. of Innovative Industrial Technology., Hoseo University, Asan 336-795, Korea

**Dept. of Food and Nutrition., Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

적 요

우리 콩으로 만든 전통된장의 제조방법을 조사하였고 혈액 응고 저해 활성 (fibrin clotting inhibition activity)을 fibrin clotting assay법으로 분석하여 혈액 응고 저해 활성과 제법 간의 상관 관계를 검토하였다. 전통된장의 혈액 응고 저해 활성이 대규모로 생산되는 공장형 개량된장보다 24% 정도 높았다. 메주 제법시 인위적인 균의 접종은 크게 영향을 미치지 못하였으며, 메주 제조시 100% 메주만을 이용해 담금한 된장이, 담금 과정시 메주에 보리, 밀 등의 전분류를 첨가하여 만든 된장보다 혈액 응고 저해 활성이 24% 정도 높게 나타났다. 된장의 발효·숙성 조건의 경우, 발효 조건은 크게 영향을 미치지 못하였으며, 보통 전통된장 발효시 90일 숙성 시키는 경우가 많았으나, 180일 이상 숙성시킨 된장이 혈액 응고 저해 활성이 30~90일 숙성시킨 된장에 비해 뛰어났다. 일부 된장은 고상인 메주와 액상인 메주 추출액(간장)을 모두 사용하여 제조되고 있다. 대부분의 된장은 간장을 분리하여 각각 간장과 된장으로 별도 제조 판매되고 있다. 된장 제조 시 간장 분리를 하지 않고 된장을 제조한 된장이, 분리한 된장보다 혈액 응고 저해 활성이 20% 정도 높게 나타났다.

또한 바뀌어 된장의 소비율이 줄어들고 있는 추세이며, 우리의 우수한 전통발효식품이 설자리가 좁아지고 있는 실정이다.

I. 서론

1. 연구개발의 필요성

가. 연구 목적

된장은 우리 식생활에서 빼놓을 수 없는 식품이며 다양한 기능성을 가진 세계의 어떤 식품보다도 우수한 발효 식품이다. 그러나 점차 세대가 바뀔에 따라 입맛

본 연구에서는 현재 지역 농산물의 활용도를 높이고 농가부업의 형태로 운영되어 농가수익에 중요한 몫을 차지하고 있는 전통된장의 다양한 기능 중 하나인 항혈전에 대한 연구를 통하여 심혈관계 질환 예방의 가능성이 강화된 고기능성 된장제조방법을 개발하고자

하였다.

① 지역별 전통된장의 항혈전 활성분석 및 우수 전통된장 발굴

② 항혈전 기능성과 제법간의 상관관계 연구를 통한 고 기능성 된장제조 방법 도출

나. 연구의 필요성

1) 기술적 측면

■ 장류(된장)의 기능성 연구

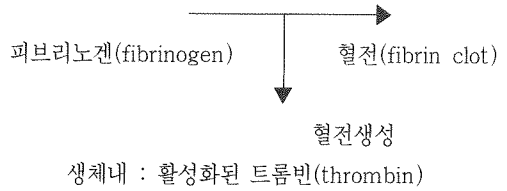
- 한국의 된장에 대해서 항암, 항산화, 면역조절기능, 혈압강하, ACE저해 펩타이드 등에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 발효 균주에 따른 향의 변화에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나, 이러한 실적인 연구가 산업화에 응용되어짐은 아직 미흡한 실정이다.
- 최근들어 전통장류식품의 다양한 생리활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 본 연구팀은 이중 항혈전 기능성에 대한 연구의 결과를 활용하여 농촌지역 특산물의 형태로 제조되고 있는 전통된장의 제조방법에 대한 연구를 수행하고자 하였다.

■ 혈전관련 질환

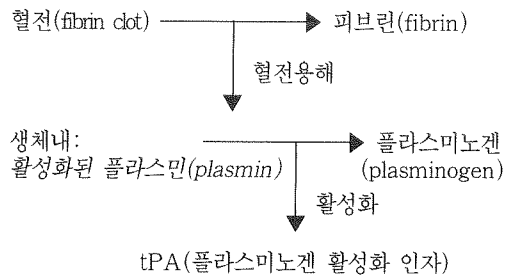
혈전으로 인한 질병은 매우 다양하다. 혈전이 뇌혈관에 생성되면 뇌혈전증에 의한 반신불수(중풍)나, 뇌혈관이 파열되면 뇌출혈이, 뇌의 미세한 혈관이 파열되어 뇌와 머리뼈 사이의 공간으로 출혈되면 거미줄막 출혈, 심장혈관이 막히면 심부전증에 의한 심장마비를 불러 일으킨다. 현재 우리나라 국민 사망률중 43%가 순환계 질환에 의한 것으로, 암(19.4%), 교통사고(14.9%), 간질환(5.5%), 호흡계 질환(5.2%) 등에 비하면 월등히 높은 수치이며, 점차 고령화되어가는 우리 사회의 실정과 노인성 치매 환자의 60%가 혈전에서 기인한다는 점을 생각할 때 순환계 질환에 대한 대책이 시급하다고 할 수 있다. 더욱이 이러한 문제는 세계 거의 모든 나라의 공통된 현상인 것으로 알려져 있다.

■ 혈전의 생성 및 용해 반응기작

(1) 혈전의 생성



(2) 혈전의 용해



■ 된장을 이용한 예방과 치료

- 혈전증의 예방 및 치료의 형태는 식품에 의한 자연적인 예방보다는 의약품을 사용한 인위적인 징후 치료가 주가 되고 있으며, 치료제로는 urokinase, tPA, streptokinase 등이 있으나 가격이 너무 고가이며, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 문제가 있다. 더군다나 혈전성 성인병은 병징이 나타나기 시작한 후에는 치료가 매우 어려워지므로 의약품으로 치료하는 개념이 아닌, 일상 식품의 장기적인 섭취에 의해 혈전을 예방하고 생성된 혈전을 제거하는 것이 더 바람직한 방법이다. 이러한 목적에 가장 부합되고 우리 국민이 일상적으로 섭취하는 식품으로는 전통 발효식품인 된장이 있다.
- 현재 혈전예방과 혈전용해의 효과를 보여주고 있는 대표적인 예가 일본의 전통 대두 발효식품인 나토(natto: 일본식 청국장)로부터 분리된 nattokinase라는 효소이다. 이를 경구투여시 생체 내에서 혈전용해작용을 가진다는 보고가 있으며, 나토를 직접 섭취했을 때 혈액중의 혈전이 감소하고, 혈전생성을 예방할 수 있다는 것이 실험적

으로 증명되었다. 그리하여 현재 일본에서 나토가 혈전용해작용을 가진 제품으로 알려져 건강식품으로서 판매량이 크게 증가하였다(Sumi et al, 1990).

- 우리나라의 청국장에도 혈전용해 작용이 있다는 보고가 있었으나 국민들의 섭취량이 된장에 비하여 미미한 수준이므로 그 효과는 작다고 판단된다. 청국장과 마찬가지로 콩을 원료로 하여 발효시켜 섭취해온 우리의 전통식품인 된장에도 혈전용해 능력이 있을 수 있다고 보고되고 있으며, 일상적인 된장과 찜장의 섭취에 의해 혈전의 예방 및 치료가 가능하다면 국민들의 된장 섭취량으로 볼 때 그 효과가 매우 클 것이다.

■ 본 연구팀의 연구방향

- 된장 같은 대두발효식품에서 항혈전 물질로 기대할 수 있는 물질은 ① 혈전용해효소 뿐만 아니라 ② 혈전생성에 작용하는 thrombin을 저해하는 thrombin inhibitor로서 혈액응고저해 펩타이드가 있다.
- 된장이 혈전용해 또는 혈액응고저해활성작용(antithrombin activity)을 가지더라도 된장 제조사마다 다른 제조방법 및 사용하는 균주에 따라 혈전용해능력 및 혈액응고 저해활성이 차이를 보일 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 우리 콩을 사용하는 지역특산 전통 된장제조 업체를 위주로 된장을 수집하여 그 효능을 조사하여 고기능성 된장을 발굴하고 항혈전 및 혈전용해 활성이 우수한 된장의 제조방법을 알아보고자 하였다.

2) 경제적 측면

■ 장류 시장규모

현재 국내의 장류 시장은 연간 3,000억 정도의 규모를 이루고 있으나, 된장의 경우 세대의 입맛 변화로 인하여 된장의 소비량이 줄어들고 있으며 다른 장류에 비하여 소비량이 감소하고 있는 추세이다. 국내 1천 3백만 가구중 약 30% 미만의 가구가 된장을 소비하는 것으로 보고된 바 있다.

이는 간장이 90%, 고추장이 50% 이상의 소비율을 보이는 것에 비하면 상당히 적은 수치이다. 이러한 이유로 점차 생산기업의 규모는 작아지고 된장 생산 기업은 경쟁력을 갖기 힘든 실정이다.

■ 된장 제조업체 현황

현재 된장을 생산하는 공장규모의 형태는 아주 다양하며, 가내수공업형태에서 점차 공장형 기업형태로 확대되고 있는 추세이나 아직 가내수공업의 형태를 벗어나지는 못하고 있다. 현재 장류의 업체평균 매출액은 48억원으로 기타 다른 식품가공 산업에 비하면 가장 낮은 매출액을 나타내고 있다. 그러나, 장류의 수출은 1999년 820백만원에 비하여 2000년 1256백만원으로 50%가 넘는 증가세를 보이고 있어 장류의 수출 실적은 빠르게 증가할 것으로 판단된다.

■ 지역 농수산물 가공공장 현황

- 농수산물 가공공장 중 농촌지역의 특산단지에서 농가부업의 형태로 운영되는 유형이 거업형태를 포함한 전체가공업 매출의 28%를 차지하고 있다.
- 경영주체 현황을 보면 전체업체수의 45.8%가 농가 5호 이상이 공동출자 한 공동운영체이고 33.3%가 영농조합법인이나 협동조합의 형태, 14.3%가 특산단지에서 운영되고 있어 대형식품가공업체는 전체업체수의 6.6%에 불과하다. 그럼에도 불구하고 가공식품을 이용하는 소비자들은 식품대기업을 매개로 제조, 판매, 유통되는 제품들에 더 익숙해져 있는 편이다.
- 농촌 지역에서 운영되고 있는 전통장류 가공업체의 영세성은 장류의 품질개선 및 기능성 강화와 관련된 연구기반이 취약하므로 지역농산물의 활용도를 높이고 농촌지역에서 운영되어 농가수익에 기여하고 있는 전통장류 식품가공분야에 대한 기술적 지원이 요구되고 있다.

■ 심혈관계 관련시장

심장 혈관계 질환이 현대의 주요 성인병이 되면

서, 약 4,000 억원 규모의 순환기계 의약 시장이 형성되어 있으며 국민들의 예방차원의 인식고조, 1차적 예방을 겨냥한 천연소재의 제품시장으로 집약될 것이므로 항혈전 관련 식품의 잠정적 시장규모는 무한하다는 전망이다.

■ 경제적 기대효과

- 된장의 경우는 추정소요량에 비하여 공장공급량이 30%를 넘지 않기 때문에 잠재 시장 규모는 상당히 큰 편이다. 또한, 산업의 발달로 핵가족화로 변환되고, 주거형태는 단독주택에서 아파트가 절대적으로 많아져 장류를 집에서 직접 제조하는 수가 점차 감소하여 된장의 소비율이 증가될 것으로 예상되고 된장에 대한 많은 연구로 인하여 다양한 기능성들이 첨가된다면 소비율의 증가뿐만 아니라 된장을 응용한 다양한 기능성 식품소재 개발로 인해 수출까지도 이어질 가능성이 충분히 있을 것으로 본다.
- 더군다나, 항혈전 기능이 강화된 제품의 산업화가 이루어질 경우 생산규모의 대형화가 이루어질 것이고 이는 국산콩의 재배확대를 야기하며 이로써 재배작물의 다양화를 이룸으로써 국내농업의 보호적 측면에서도 큰 파급효과를 지닐 수 있을 것이다.
- 본 연구에서는 항혈전 기능이 뛰어난 된장과 된장으로부터 추출한 항혈전 펩타이드의 탐색 및 분리를 수행하여 응용제품의 개발과 신물질 동정시 의약품 또는 기능성 식품소재로 개발할 경우 전무하다시피 한 항혈전 기능성식품으로 인해 다방면으로 부가가치를 창출할 수 있으며 항혈전제와 혈전용해제의 수입 감소효과와 수출을 꾀할 수도 있을 것으로 판단된다.

3) 사회·문화적 측면

■ 전통 발효식품은 지금까지 독특한 맛으로 선조들로부터 우리의 세대에 이르기까지 아주 오랜 시간동안 사랑 받아오던 음식들이다. 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 장류에서도 지금의 세대에 이르기까지 항상 애용되던 식품들이다. 그러나, 간장과 고추장을 제외한 된

장, 청국장의 경우에는 다음 세대에서도 애용될지는 알 수 없는 실정이다. 외국에서 들어온 많은 패스트푸드를 즐겨 찾아 입맛조차 바뀌어 버린 지금의 청소년들은 된장과 청국장의 냄새조차 맡기 싫어하는 숫자가 많은 정도로 우리의 전통 발효식품이 점차 외면당하고 있는 실정이다.

■ 일부 식당에서는 된장국이라는 이름으로 일본의 된장국을 내놓고 있으며 대부분의 우리의 젊은 세대들은 그것이 우리의 전통 된장국인 듯 생각하고 있다. 또한 얼마 전에 결판지어졌던 김치와 기무치의 중주국 결정과 관련하여 기무치가 김치에서 유래된 것이라는 걸 세계에 알리는데 상당히 많은 노력과 투자가 있었다는 것은 주지의 사실이다.

■ 우리 전통 발효식품인 된장에 대한 연구가 세분화, 다양화되어 향의 변화와 순환계 질환의 방지, 항암, 항산화 등에서 뛰어난 능력을 가진 기능성이 강화된다면 된장의 우수성을 세계에 알릴 수 있을 것이다. 또한, 다양한 기능을 살린 우리의 전통 장류가 발전을 이뤄나간다면 패스트푸드에 익숙해진 청소년층에서 외면당하고 있는 된장류를 다시 그들과 가까운 식품으로 접근시킬 수 있을 것이다.

■ 전반적으로 시민의 건강에 대한 관심이 점차 고조됨에 따라 된장에 대한 관심과 소비율이 증가할 것이고, 궁극적으로는 우리의 된장의 우수성을 널리 알려 된장 또는 된장을 응용한 기능성식품을 세계에 진출시킬 수 있을 것이다.

2. 전통된장의 항혈전 관련물질 연구개발 현황

가. 국내외 관련기술 현황

■ 항혈전 물질은 항혈전제와 혈전용해제 2가지로 나뉜다.

- 항혈전제(thrombin inhibitor, 또는 혈전응고 저해제) 혈전의 생성을 막는 것으로 혈액응고인자의 억제, 혈소판의 응집을 억제, 혈관내피세포의 항혈전기능을 촉진하는 물질을 말하는 것으로 coumarin과

warfarin 등의 유기합성제제와 heparin(소나 돼지의 심장, 소장에서 추출) 등이 있다.

• 혈전용해제

이미 형성된 혈전을 용해시키는 것으로 plasminogen activator(plasmin을 경유하여 혈전을 녹이는 것)와 직접 혈전을 용해하는 물질로 tPA, urokinase, streptokinase, lumbrikinase 등이 있다. 현재 사용중인 혈전용해제로는 streptokinase(SK), urokinase(UK), tissue plasminogen activator(tPA), single chain urokinase type plasminogen activator(SCUPA)라 불리는 prourokinase(pro-UK), anisylated plasminogen-streptokinase activator complex(APSAC) 등이 있다.

1) 해외 연구 동향

■ 혈전용해제

미국의 Sobel 등이 사람 또는 동물의 뇨 중에서 정제한 urokinase는 현재까지 정맥 주사용으로 시판, 사용되고 있다. 그러나 고가이고 주사제로만 사용되며, 응급 환자에게만 사용이 한정되고 있다. Fletcher 등은 용혈성 연쇄상 구균(*Streptococcus haemolyticus*)에 의하여 생산되는 물질 중에서 혈전용해의 효과가 있는 streptokinase를 정제하였는데 이는 혈전을 직접 분해하는 것이 아니라 혈액 중의 plasminogen을 활성화하여 plasmin을 생기게 하여 간접적으로 효과를 나타내는 것이다(Lin *et al.* 1995). Streptokinase는 Urokinase보다 혈중의 반감기는 길고 전신에 고루 작용하는 이점이 있으나 출혈이 큰 부작용이 나타났으며, 사람의 악성 종양인 melanoma 유래의 tissue plasminogen activator(이 물질은 혈관 내피세포와 같은 사람의 정상세포에서도 생산되며 tPA 로 총칭)가 현재 혈전용해제로서 임상에 사용되고 있다. 이는 혈전과의 친화력이 강하며 fibrin 분해력이 큰 것이 특징이나 혈중 반감기가 짧고 고가인 관계로 경제성에서 문제가 있다. 또한 최근에 일본의 Mihara 등이 지렁이의 체단백질로부터 혈전용해작용이 강한 효소를 분리정제하여 Lumbrokinase(LK)라고 명명한 이 효소는 혈전용해작용이 강하지만

일반 단백질의 분해작용이 그 이상으로 강하여 문제가 되고 있다(Mihara *et al.* 1993). 이 LK는 일본에서는 판매가 불허되었으나 우리나라에서는 생약성분으로 판매가 허용되고 있다. 이 LK는 국내의 2개 제약회사 제품으로 고가에 시판중이다. 최근에는 nattokinase(NK)라는 혈전용해효소를 일본의 Sumi등이 납두(한국의 청국장)로부터 분리정제하여 발표하였다(Sumi *et al.* 1990).

■ 항혈전제

항혈전제에 대한 연구로는 Fenton 등이 thrombin의 구조와 기능에 대하여 연구하였고, Binie 등이 hirudin 펩타이드 합성에 의한 thrombin의 활성 저해에 대하여 발표하였으며, Carpiello 등은 사람의 thrombin에 대한 2가지 hirunorm 펩타이드의 저해활성에 대하여 연구하였다(Capoello *et al.* 1996).

2) 국내 연구 동향

■ 혈전용해제

우리 나라에서도 최근 전통 발효식품이나 거머리, 지렁이 등으로부터 혈전용해효소를 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 한국식품개발연구원에서는 된장에서 항혈전 활성을 띄고 있는 펩타이드를 분리하였으며, Kim 등은 청국장으로부터 유래한 *Bacillus sp.* strain CK 11-4로부터 혈전용해효소를 분리하였고 Kim 등은 것갈에서 분리한 *Bacillus sp.* KA 38을 이용하여 새로운 혈전용해효소의 생산과 특성에 대하여 연구하였다. 롯데에서는 것갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정과 청국장으로부터 혈전용해 균주를 분리하였으며(장영렬 외, 1998), 생명공학연구소에서는 된장으로부터 fibrin 용해 세균의 분리에 대한 연구를 시행하였다(김용택 외, 1998). 한국식품위생연구원에서는 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* K-54이 분비하는 혈전용해효소의 정제 및 특성에 대해서, 동아대학교 식품영양학과에서는 역시 청국장에서 분리한 *Bacillus sp.* KP-6408로부터 효소 생성에 대하여 연구하였다(길지은 외, 1998).

한편, 혈액응고 저해제(thrombin inhibitor)에 대한 연구는 최근 들어 몇몇 연구자들에 의해 본격적으로 이루어지고 있다. 한국과학기술원의 Hong은 granulin와 유사한 아미노산 구조를 갖고있는 단백질을 흙벌레머리로부터 분리해냈으며, Kim 등은 된장에서 thrombin inhibitor의 탐색과 열안정성에 대하여 연구하였다(Kim et al 1998).

■ 항혈전제

국내 여러 종류의 혈전용해제가 있으나 많은 수가 수입에 의존하고 있으며 최근에 혈전응고 저해능을 가지는 건강보조 식품으로 풀무원에서 포도씨 추출물, 홍차 추출물, 녹차 추출물, 대두발효 추출물, 산사자 추출물, 은행잎 추출물 분말 등을 탐색하여 항혈전 및 항콜레스테롤용의 건강보조 식품을 출시하였다.

■ 제품현황

기존의 연구동향에서는 대부분이 혈전용해효소를 위주로 다뤘으나, 본 연구에서는 ① 혈전용해능이 있는 효소 뿐만이 아니라 기능성 식품소재 등으로 사용하기 쉬워 응용성이 다양한 ② 혈액응고 저해 펩타이드를 연구의 대상으로 한다는 점과 이를 이용한 전통적인 된장의 제법개선을 통하여 고기능성 된장의 제법을 개발하여 농촌 현장에 적용하고자 한다는 점에서 기존의 연구와는 다소 차이가 있다고 하겠다.

3. 연구내용 및 개발범위

본 연구팀은 농촌지역에서 생산되고 있는 전통된장에 기능성을 첨가하여 보다 높은 품질과 부가가치를 부여, 전통된장의 제조 가공 농가의 소득증대를 꾀하고자 다음과 같이 혈전능이 우수한 된장의 선별과 그 제조방법의 특이점을 연구하고자 하였다.

- 1) 전통된장의 수집 및 제조방법 조사
- 2) 수집된 전통된장 중 항혈전 및 혈전용해능이 높

은 된장의 선별

- 3) 기타 분석 및 실험 : 항혈전 특성조사
- 4) 항혈전 기능성과 된장재료 및 제조방법의 상관관계 연구
- 5) 항혈전 기능성 된장의 제법 도출

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 시료

된장은 Table 1에서 보는 바와 같이 각 지역에서 수집한 것을 4°C에서 보관하였다.



Fig. 1. 수집된 실험대상 전통된장 및 공장된장

나. 시약 및 기기

시료 및 겔 크로마토 그래피에 이용되는 Tris base는 미국의 J.T.Baker의 제품을, Fibrinogen clotting assay에 사용되는 fibrinogen은 녹십자 제품을 사용하였다. Thrombin은 Diagnostica Stago(France)의 제품을, blood coagulation analyzer(Coatron MI)는 Teco(Germany)의 제품을 사용하였다.

2. 방법

가. 전통된장의 수집 및 제조방법 조사

전통적인 제조방법에 의해 제조된 각 지역별(도 단위) 된장과 각 식품업체에서 제조된 된장을 수집하였으며, 각 된장에 대한 원료 및 제조방법에 대한 조사를

수행하였다. 본 연구팀이 기 확보한 지역별 전통된장 제조 농가에 대한 리스트는 Table 1 과 같다.

나. 된장 시료의 전처리

각각의 된장 15g을 200ml의 증류수에 현탁하여 10분간 교반한 후 Whatman No. 42 종이 여과지로 여과하였다. 여과한 각 된장 시료의 고형분량을 굴절계로 측정하여 고형분량을 2.8%로 모두 동일하게 맞추었다.

다. Fibrin clotting assay

혈액 응고 저해 활성은 fibrin clotting assay를 이용하여 분석하였다. Blood coagulation analyzer인 coagulometer (Coatron M1, TECO, Germany)를 이용하여 fibrin clotting time(CT)을 측정하는 방법을 사용하였다. CT가 큰 값을 보이는 경우 thrombin에 의한 fibrinogen이 fibrin clot으로 전환되는 시간이 지연됨을 의미한다. 즉, 본 연구에서는 이러한 anticoagulant activity를 혈액 응고 저해 활성으로 하여 분석하였다. CT를 정량적 수치로 바꾸어 환산하기 위하여 thrombin time(TT)시약을 농도 별로 희석하여 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선의 기

울기와 절편을 이용하여 식(1)과 같이 thrombin unit(TU)으로 계산하였다. Thrombin inhibition % (TI%)를 식(2)과 같이 환산하여 계산하였다.

$$TU = \frac{a}{CT} + b \tag{1}$$

$$TI(\%) = \frac{1 - TU^{sample}}{TU_{Dw}} \times 100\% \tag{2}$$

라. Gel permeation chromatography에 의한 peptide 분리

Fibrinogen clotting assay법을 통해 선별된 시료를 Sephadex G-25를 이용한 gel permeation chromatography를 사용하여 전처리 된 된장시료 10ml를 gel permeation chromatography를 이용한 fraction을 얻어 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도를 측정하여 분석된 높은 흡광도 값을 바탕으로 하여 peptide 시료의 범위를 결정하였다.

Table 1. 수집된 전통된장 제조 농가 리스트

No	지역명	대표자	전화번호		생산제품
			마을	농업기술센터	
1	강원 철원군 갈말읍 동막리	강운자	033)452-8337	452-2327	메주, 된장, 막장, 고추장
2	강원 화천군 상서면 장촌리	오영자	033)441-3188	422-1100	메주, 간장, 된장
3	충북 제천시 청풍면단리	장태식	043)647-6571	648-0123	메주, 된장
4	충북 영동군 상촌면 임산리	남봉자	043)743-3175	743-1271	메주, 된장
5	전남 강진군 군동면 신기리	백정자	061)433-5248	430-3526	메주, 된장, 간장
6	전남 장성군 북하면 악수리	차후덕	061)392-7108	393-3772	메주, 된장
7	경남 의령군 칠곡면 산남리	전연수	055)572-3718	572-5959	간장, 된장, 청국장
8	전북 김제시 용지면 용암리	육점순	063)542-8263	542-8263	메주, 된장, 간장, 메주가루
9	경북 칠곡군 북삼면 승오리	김옥순	054)972-1762		된장, 간장
10	경기 김포시 하성면 전류1리	성정순	031)981-5949		간장, 된장, 고추장, 청국장
11	경기 용인시 남사면 방아리	조옥화	031)332-7693		간장, 된장, 고추장, 청국장
12	전북 장수군 계북면 농소리	이효숙	063)353-0094	351-5391	된장, 간장, 고추장
13	전북 진안군 성수면 용포리	권송남	063)432-9441,9445	432-9441	된장, 간장, 고추장
14	강원도 정선군 임계면 가목리 88-7	메주와첼리스트	033)562-2710		된장

Table 2. Gel permeation chromatography의 조건

Gel permeation Chromatography의 조건	
▶	column: Sephadex G-25(coarse)
▶	RV: 300ml
▶	SV: 0.3
▶	Buffer: HCl-Tris buffer 10mM pH 7.5

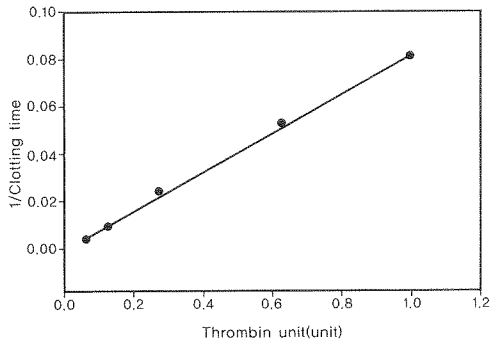


Fig. 2. Thrombin standard curve

III. 결과 및 고찰

1. 전통된장 및 개량된장 제조방법 조사

가. 전통된장 제조방법

된장제조 방법의 공정인 정선 및 수세, 침지, 탈수, 증자, 냉각등의 방법은 통합하여 정리하였다. 전통된장제조 방법에서는 메주제조방법, 메주제조시기, 띄우는 온도, 띄우는 시간, 담금, 발효시 간, 된장 숙성시간의 단계로 조사하였으며, 수집된 자료를 바탕으로 전통된장의 일반적인 제조공정을 정리하였다(Fig. 3의 [I]).

나. 개량된장 제조방법

개량된장의 경우 자세한 제조공정을 조사할 수 없어서, 일반적인 개량된장 제조공정(Fig. 3의 [II])과 배합 비율(Table 3)을 조사하였다.

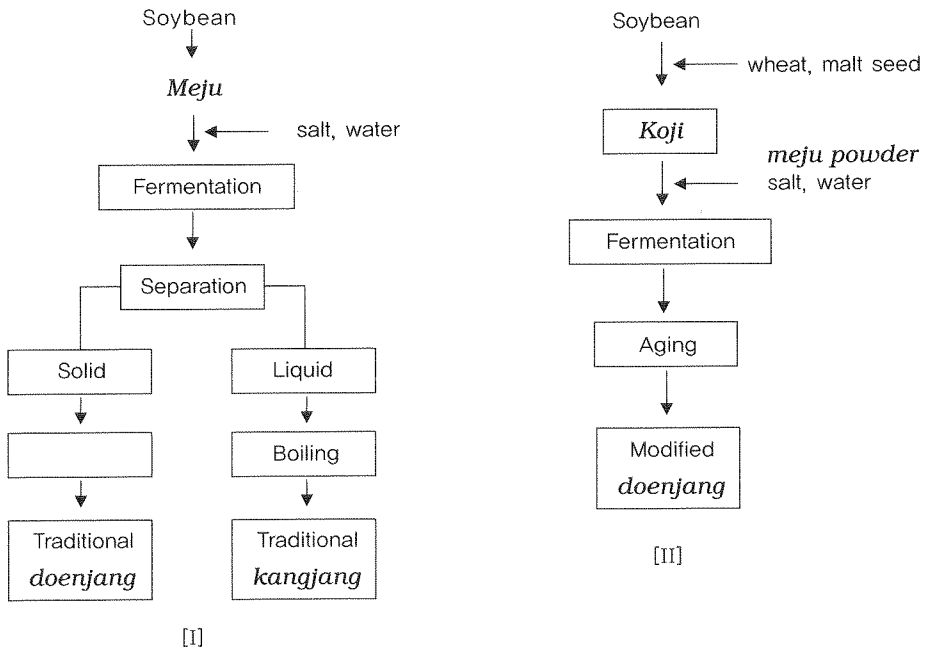


Fig. 3. 일반적인 전통된장[I]과 개량된장 [II]의 제조공정

Table 3. 개량된장의 배합비율

Sample	Soybean	Wheat	Other materials
D-1	38% (USA)	14.56% (USA, Australia)	salt, wheat <i>corn, meju</i>
D-2	28.4% (USA)	21.6% (USA, Australia/ domestic produciton)	salt, <i>meju</i> , alcohol
D-3	53.4% (USA)	—	salt, alcohol, <i>meju</i> soup

다. 결과 및 고찰

메주는 제조방법 및 시기에 따라 약간의 차이가 있으나 모든 전통된장 제조업체가 대두만을 사용하였다. 또한 발효를 위해 인공적인 균의 접종은 사용하지 않았으며, Table 4, 5, 6에서 보는 바와 같이 전통메주와 전통된장의 제조방법을 조사하였다(장담금 과정에서의 숯, 고추, 대추등의 첨가 과정은 생략하였다).

1) 전통메주 제조방법

전통메주 제조방법은 Table 4, Table 5와 같다.

Table 4. 메주제조 방법(I)

NO	Material	Manufacturing season(months)	Drying temperature (°C)	Drying time (day)	Fermentation temperature (°C)	Fermentation time(day)	Microbe inoculation
1	Soybean	November	40	10	25-30	60	X
2	Soybean	November	40	7	30	90	X
3	Soybean	November	40	5	30	60-90	X
4	Soybean	December	38-40	1	25-30	50	X
5	Soybean	December -January	40	7	25-30	60-90	X
6	Soybean	December	40	2-3	25-30	40	X
7	Soybean	November	35-40	3	30	60	X
8	Soybean	November	40	10	30	90	X
9	Soybean	December	40	7	25-30	45-60	X
10	Soybean	November	40	10	25-30	120	X
11	Soybean	November	40	2	30	90	X
12	Soybean	December	40	7	30	30	X
13	Soybean	December	38-40	7	25-30	50	X
14	Soybean	November	38-40	4-5	25-30	90	X

2) 전통된장 제조방법

전통된장 제조방법은 Table 6과 같다.

3) 담금 및 발효

전통된장의 담금에 사용되는 제조의 배합비를 정리한 결과와 숙성에 대한 결과는 Table 7과 같다.

4) 가르기 및 숙성

가르기(고액분리) 및 숙성에 대한 방법은 Table 8과 같다.

2. 수집된 전통된장 중 항혈전 지닌 된장의 선별

전처리를 통해 얻은 각 된장을 시료로 하여 fibrin clotting assay법을 실시하여 우선 CT가 늦어지는 된장 시료를 선별하였다. 전처리 과정을 마친 된장 시료의 CT를 측정하였으며, Fig. 4에서와 같이 시료 No. 5, 9, 10, 12, 14 의 CT가 높게 나타났다. No. 7과 No. 11의 경우는 음(-)의 활성이 나타난 것으로 보아 항응고 활성보다 혈액 응고 생성 촉진 능력이 더 큰 것으로 보

이며, 본 연구에서는 그러한 원인을 제공하는 구체적인 물질에 대한 추가적인 조사는 실행하지 않았으나, 혈액 응고 활성이 있는 물질이 존재하는 것으로 추측된다.

3. Gel permeation chromatography에 의한 peptide 분리

Fibrinogen clotting assay법을 통해 선별된 시료 No. 5, 9, 10, 14을 Sephadex G-25를 이용한 gel permeation

Table 5. 메주제조 방법(II)

공정 순서	제 조 방 법
원 료	전통된장의 원료는 순전히 콩만을 이용하여 제조
침 지	보통 12시간 침지한 후 물빼기하는 방법이 일반화 되었으나 제조공정의 편의를 위하여 침지를 시키지 않고 증자과정을 바로하기도 함
증 자	증자방법은 대부분 상압에서 술에 물을 붓고 불려놓은 콩을 4-6시간 정도 삶음
성 형	증자한 콩이 식으면 사각형 형태로 제조
제조시기	10월 중순에서 1월말 사이에 제조하나 보통 11월 중순에서 12월 중순사이에 제조
발 효	형태가 완성된 메주의 발효는 2단계의 발효과정으로 거침 1. 걸말림 과정으로 건조실이나 비닐하우스에서 벧짚을 깔고 그 위에서 40 에서 7-8일간 걸말림 2. 건조된 메주를 벧짚으로 메주덩어리를 묶어 비닐하우스나 발효실에서 25-30°C로 보통 60일에서 90일발효

Table 6. 된장제조 방법

NO	Mixing(materials)	Fermentation time (day)	Solid-liquid separation	Aging time (day)
1	Meju(5kg), salt water(20L), boiled soybean(1.4kg), boiled barley(1.4kg), red peper powder(200g)	7	X	730
2	Meju(5.5kg), salt water(20L), boiled barley(1.2kg), red pepper seed powder	15	O	180
3	Meju(5.5kg), salt water(20L)	40-60	O	90
4	Meju(5.5kg), salt water(25L)	60	O	50
5	Meju(5.5kg), salt(4kg), water(20L)	40-50	O	40
6	Meju(5.5kg), salt water(20L)	30	O	30
7	Meju(5.5kg), salt(6kg), water(16L)	180	O	30
8	Meju(65%), salt(18%), water(17%)	40-60	O	90-120
9	Meju(7.2kg), salt(4kg), water(20L)	45	O	90
10	Meju(7.2kg), salt(8kg), water(20L)	50-60	O	180
11	Meju(7.4kg), salt(4kg), water(20L)	50-60	O	90
12	Meju(5.5kg), salt water(20L)	60	O	90-120
13	Meju(5.5kg), salt water(20L)	60	O	30
14	Meju(5.5kg), salt water(20L)	40-60	X	730

chromatography를 사용하여 전처리된 된장시료 10ml를 gel permeation chromatography를 이용한 fraction을 얻어 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도를 측정하여 분석된 높은 흡광도 값을 바탕으로 하여 peptide 시료의 범위를 결정하였다. 된장시료에서 얻은 각 분획별 흡광도 및 fibrinogen clotting assay 결과는 다음과 같다

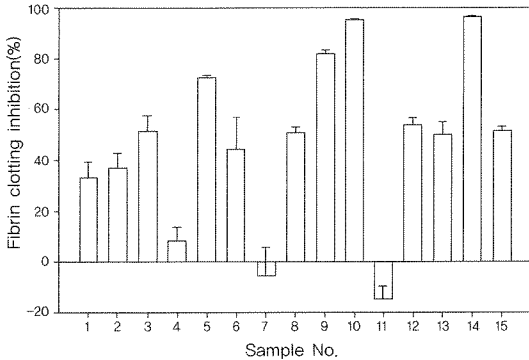


Fig. 4. 전통된장 시료별 항혈전 활성
1-14 : 수집한 된장 시료 번호, 15 : 1% heparin

가. Gel permeation chromatography한 된장시료 No. 5
Gel permeation chromatography한 시료 No. 5번 fraction을, 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도

를 측정하였으며, peptide 범위를 fraction number 26-70 번을 선정하여 fibrinogen clotting assay하였다. 그 결과 fraction number 56, 59, 66, 70번이 각각 활성이 있는 것으로 나타났으며, 그 중 59번의 clot time이 가장 높게 나왔다(Fig. 5).

나. Gel permeation chromatography한 된장시료 No. 9

Gel permeation chromatography한 시료 No. 9 fraction을, 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도를 측정하였으며, peptide 범위를 fraction number 26-55을 선정하여 fibrinogen clotting assay하였다. 그 결과 fraction number 40의 활성이 높게 나타났다(Fig. 6).

다. Gel permeation chromatography한 된장시료 No. 10

Gel permeation chromatography한 시료 No. 10 fraction을, 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도를 측정하였으며, peptide 범위를 fraction number 26-55을 선정하여 fibrinogen clotting assay하였다.

그 결과 fraction number 31, 33, 34, 35, 37, 38, 51, 52, 53, 54이 활성이 있는 것으로 나타났으며, 넓은 범위의 fraction에서 clot time이 느려지는 것이 확인되었다(Fig. 7).

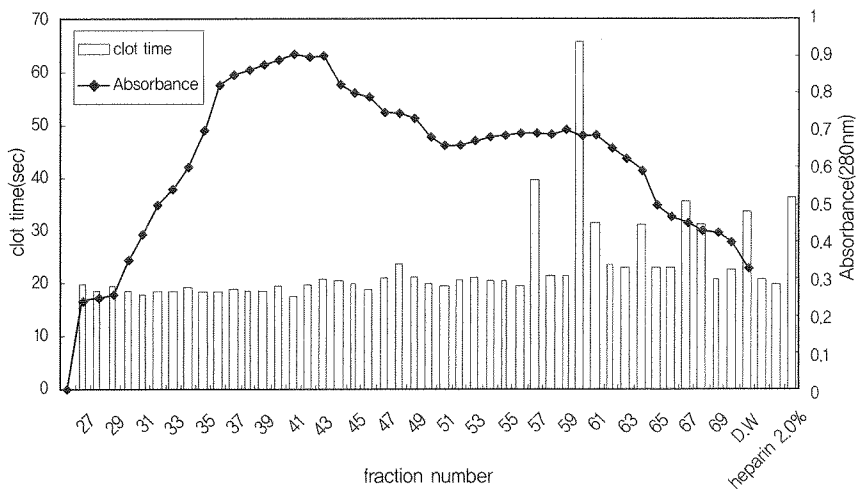


Fig. 5. 된장 No. 5의 fraction 흡광도 및 clot time 측정

된장 NO. 5(fraction number 25~70) : sample 35개, 56: 3차 증류수, 57 : 10mM Tris-buffer, 58 : 2% heparin

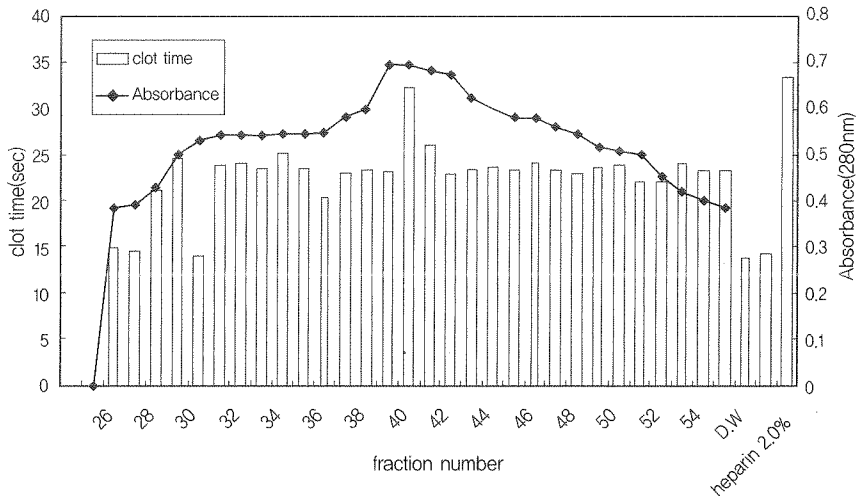


Fig. 6. 된장 No. 9의 fraction 흡광도 및 clot time 측정

된장 NO. 9(fraction number 26~55) : sample 30개, 56: 3차 증류수, 57 : 10mM Tris-buffer, 58 : 2% heparin

Table 7. 담금 및 발효

공정 순서	제 조 방 법
담 금	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통된장 제조 방법은 대부분이 된장과 간장을 분리. 2. 간장을 제조하지 않고 된장만을 제조할 경우 메주무게의 약 2배의 물을 첨가하였으나, 간장을 분리하는 경우에는 약 3-4배의 물을 넣음. 3. 메주로 된장을 제조할 경우에는 솔로 깨갓이 씻어 여러조각으로 쪼갬 후 햇볕에서 바짝 말린 다음 소금물에 담금. 4. 이때 사용되는 소금물의 염도는 15-20도로 다양하나, 20도의 빈도가 가장 높으며 염도계가 없는 곳에서는 계란이 소금물에 뜰 농도로 소금물의 비율을 맞춤.
발 효	<ol style="list-style-type: none"> 1. 담그는 시기는 1월-3월이며, 항아리에 장을 넣어 자연 발효. 2. 발효시기는 15일에서 730일로 다양하였으나, 60일에서 90일 발효 빈도가 높음.

Table 8. 가르기 및 숙성

공정 순서	제 조 방 법
가르기 (고액분리)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 장을 담근 후 약 2-3개월이 지나 숙성이 되면 액체 부분은 달여서 간장으로 만듦. 2. 간장을 거르지 않고 된장만을 제조 3. 가르기한 건더기에 메주가루와 소금을 섞기도 함.
숙 성	<ol style="list-style-type: none"> 1. 거르고 남은 건더기는 공기가 들어가지 않도록 항아리에 꼭꼭 눌러 숙성. 2. 숙성 기간은 30일에서 180일로 다양하였으나, 90일 숙성의 빈도수가 가장 높음. 3. 낮에는 뚜껑을 열어 햇볕을 쬐고 밤에는 뚜껑을 단아서 숙성시키며, 또한 된장이 벌을 많이 받아서 변질이 되지 않도록 항아리 입구 부분까지 건더기를 채워 넣음.

라. Gel permeation chromatography한 된장시료 No. 14

Gel permeation chromatography한 시료 No. 14 fraction을, 각 시험관을 5번 단위로 280nm에서 흡광도를 측정하였으며, peptide 범위를 fraction number 21-55을 선정하여 fibrinogen clotting assay하였다. 그 결과 fraction number 30, 31, 33-48이 활성이 있는 것으로 나타났으며, 상당히 넓은 범위의 fraction에서 clot time이 느려

지는 것이 확인되었다(Fig. 8).

4. 항혈전 활성이 높은 전통된장과 개량된장 활성비교

Fig. 4에서 활성이 높게 나온 No. 5, 9, 10, 12, 14와 개량된장 3종(D-1, D-2, D-3)의 혈액 응고 저해 활성을

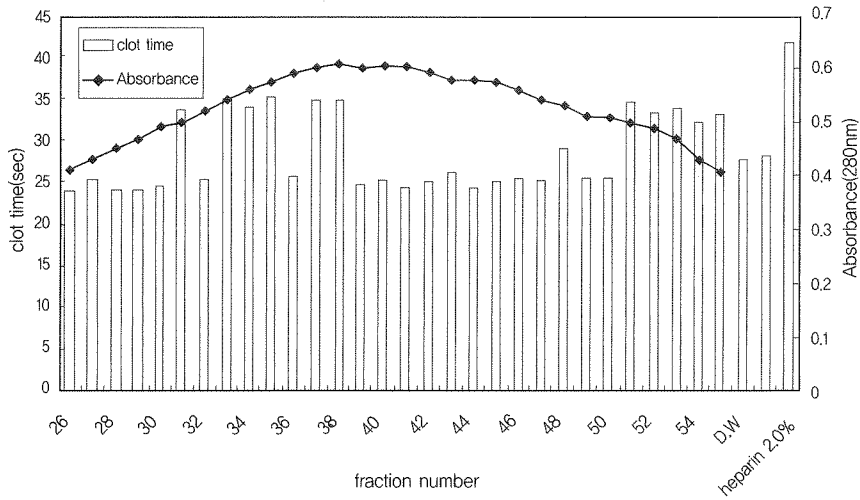


Fig. 7. 된장 No. 10의 fraction 흡광도 및 clot time 측정

된장 NO. 10(fraction number 21~55) : sample 35개, 56: 3차 증류수, 57 : 10mM Tris-buffer, 58 : 2% heparin

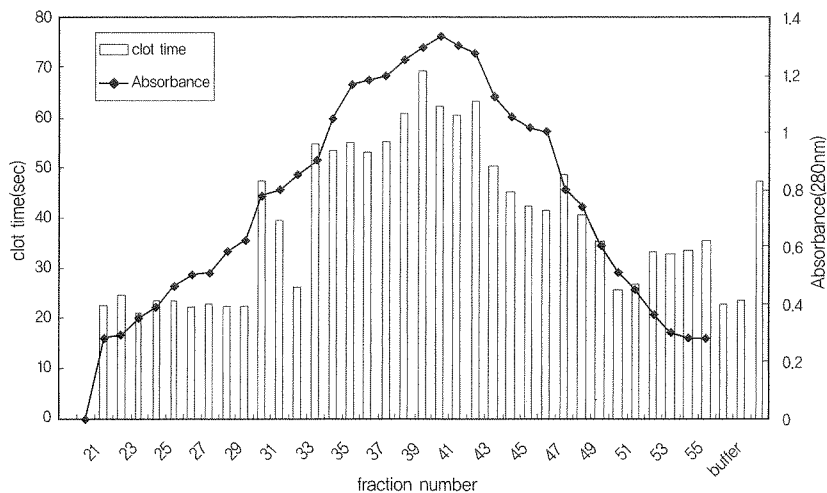


Fig. 8. 된장 No. 14의 fraction 흡광도 및 clot time 측정

된장 NO. 14(fraction number 21~55) : sample 35개, 56: 3차 증류수, 57 : 10mM Tris-buffer, 58 : 2% heparin

측정하여 Fig. 9와 같은 결과를 얻었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 전통된장이 개량된장보다 혈액 응고 저해 활성이 높게 나타났다.

5. 항혈전 기능성과 된장재료 및 제조방법이 상관관계 연구

전국적으로 수집된 메주(Table 4, 5) 및 전통된장 제조방법(Table 6)을 조사하여 원료별 차이, 사용 미생물 균총의 차이, 숙성 조건의 차이와 전처리 조건의 차이를 조사하였다. 또한 기능성과 제법 간의 상관관계를 조사하였다.

가. 원료별 상관관계

된장은 원료에 따라 화학성분이 약간씩 다르며, 전통된장은 일반적으로 개량된장에 비해 단백질이 적고 수분, 회분, 염분, 조지방이 많은 편이다. Fig. 10에서와 같이 100% 국산 콩으로 제조한 메주를 이용한 전통된장이, 수입 콩을 각각 28.4%, 28.4%, 53.4% 함유하고 소맥분, 식염, 밀 등을 첨가한 개량된장(D-1, D-2 및 D-3)보다 혈액 응고 저해 활성이 24% 높게 측정되었다.

또한 Table 8에서 보는 바와 같이 시료 No. 1과 No. 2의 제조과정의 경우 100% 콩으로 만든 메주를 사용한 장에 보리를 첨가하고 충분한 숙성 과정을 거쳤으나, 활성이 낮은 것으로 보아 된장 제조 시 100% 콩을 이용하여 메주를 제조하고, 분리 과정 중에 소맥분, 보리, 밀 등의 전분질 원료를 첨가하지 않은 된장 제조가 혈액 응고 저해 활성이 높은 것으로 나타났다.

나. 사용미생물 균총의 차이

전통된장은 옛날부터 가정에서 만들어 온 방법으로 따뜻한 방안이나 건조실에 삶은 콩을 벗겨내어 그 주변에 깔아 놓아 *Bacillus subtilis*가 자동적으로 성장하게 되므로, 인공적인 균을 접종하지 않는다.

그러나 개량된장의 경우 단백질과 전분질을 분해하는 *Aspergillus oryzae* 등의 균을 인공적으로 접종, 배양하여 코지를 만든 후 여기에 삶은 콩과 소금을 혼합하여 숙성시켜 마쇄 후 제품화한다. Fig. 9에서와 같이 전통된장이 개량된장보다 높은 활성을 보인 것으로 보아

미생물 균총의 인공적인 접종 유무보다 원료의 차이, 발효·숙성조건의 차이에 의한 영향이 크게 미치는 것으로 판단된다.

다. 숙성조건의 차이

발효가 잘된 메주는 우수한 품질의 간장이 되나, 된장의 품질은 저하된다. 이와는 반대로 숙성이 덜된 메주는 간장의 품질을 저하시키나, 된장의 품질은 향상된다. 된장의 숙성은 크게 발효와 숙성으로 나누어진다.

혈액 응고 저해 활성이 우수한 된장(No. 5, 9, 10, 12, 14)의 발효 시간과 숙성 시간을 살펴보면 5개의 된장 발효 시간이 40-60일로, 발효 시간에 크게 차이가 없는 것으로 보아 혈액응고 저해 활성에 큰 영향을 미치지

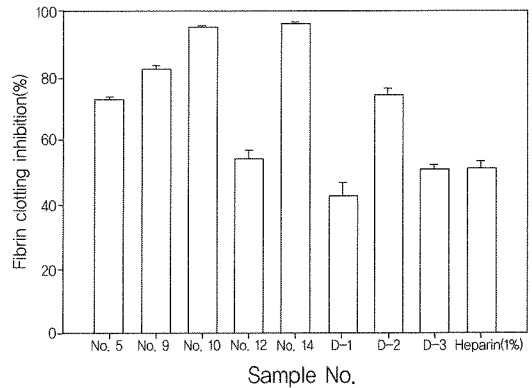


Fig. 9. 전통된장과 개량된장의 항혈전 활성

전통된장 : No. 5, 9, 10, 12, 14

개량된장 : D-1, D-2, D-3

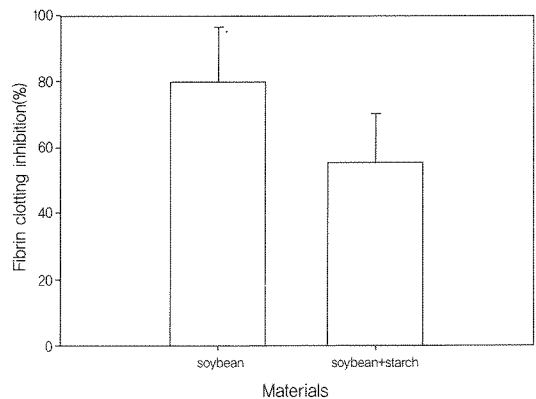


Fig. 10. 원료조건 차이에 의한 항혈전 활성

않는 것으로 판단되며, 숙성 시간의 경우는 40-730일로, 숙성시간에 크게 차이가 있었으며 이는 혈액 응고 저해 활성에 큰 영향을 끼치는 것으로 판단된다(Table 6).

Fig. 9와 같이 전통된장 5종류 중 No. 10과 No. 14의 활성이 다른 된장보다 우수하였으며, 이들의 숙성 기간은 각각 180일, 730일로, 메주의 보리를 첨가한 된장 No. 1과 No. 2를 제외하고는 된장 No. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13보다 길었다(Table 5).

Fig. 10에서 보는 바와 같이 숙성 기간이 길수록 혈액 응고 저해 활성이 높은 것으로 보아 항혈전 기능성 된장 제조를 위해서는 숙성 기간을 길게 하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

라. 전처리 조건의 차이

메주 제조 및 메주 발효과정의 경우는 제조사별로 크게 다르지 않았으며 혈액 응고 저해 활성의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 전처리 과정 중 메주와 소금을 첨가해 장을 담근 후 메주 추출액 (간장)을 분리하는 과정을 거쳐 제조된 전통된장과 추출액을 분리하지 않고 메주와 추출액이 포함된 전체 슬러리를 이용한 전통된장에서 큰 차이를 발견하였다.

Fig. 10과 같이 된장 No. 14의 혈액 응고 저해 활성이 가장 높게 나온 것을 알 수 있었다. No. 14의 경우 간장을 분리하지 않고 된장만을 제조하였다(Table 6). 간장을 분리하는 경우에는 약 3-4배의 물을 넣지만, 된장만을 제조할 경우 메주 무게의 약 2배의 물을 첨

가하는데, 메주에 물을 많이 첨가할수록 간장으로 이동되는 영양분이 많아짐으로 인해 된장의 품질이 저하될 수 있다.

따라서 간장을 거르는 과정을 제외하거나, 물은 최소한으로 적게(메주의 2배 정도) 첨가하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. Fig. 12은 수집 된 된장 시료의 제법 중 담근 후 간장 분리의 여부에 의한 혈액 응고 저해 활성 차이를 비교·검토한 것으로 고액 분리 (solid-liquid separation)하지 않고 제조한 된장이 고액 분리를 한 된장보다 혈액 응고 저해 활성이 20% 높게 나타났다.

V. 항혈전 고기능성 된장 제법 제안

지금까지의 연구결과를 토대로 기능성 전통된장 제조 공정을 위한 제안을 Fig. 13에 정리하였다. 전통된장이 개량된장보다 혈액 응고 저해 활성 효과가 우수하였으므로, 메주 제조는 개량식보다 재래(전통)식으로 만들어 자연적인 균총을 이루게 하며, 이렇게 제조한 자연메주를 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 또한 메주 제조 과정시 100% 메주만을 이용해 제조한 된장이, 제조 과정시 메주에 보리, 밀 등의 첨가물을 혼합하여 제조하는 것보다 담금 과정시 100% 메주만을 이용하도록 함이 바람직한 것으로 사료된다(Fig. 13에서 [I]).

숙성 시간의 경우 일반적으로 90일 발효시키는 경우가 많았으나, 180일 이상(많게는 730일) 숙성시킨(No.

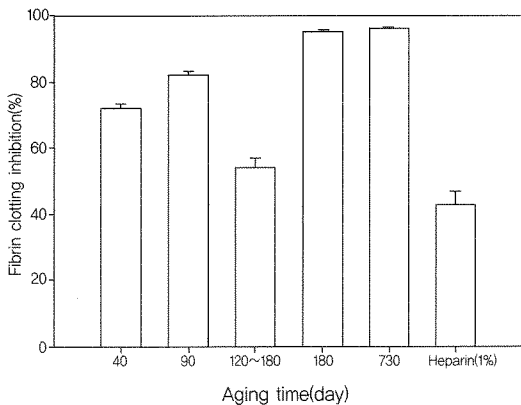


Fig. 11. 숙성조건 차이에 의한 항혈전 활성

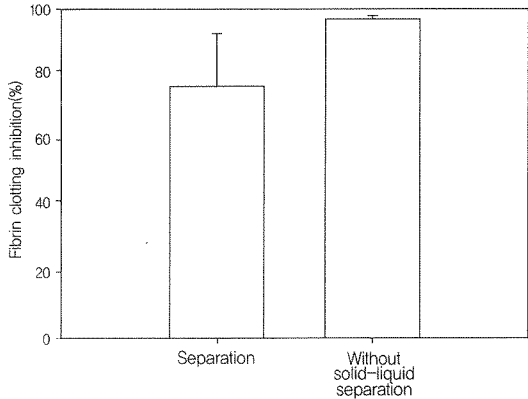


Fig. 12. 전처리 조건 차이에 의한 항혈전 활성

10, 14) 된장 시료가 30~90일 숙성시킨 다른 된장들 보다 혈액 응고 저해 활성이 뛰어난 것으로 보아, 숙성기간을 180일 이상 길게 하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

된장 제조 공정시 간장 분리(거르기)를 하지 않은 된장(No. 14)을 분리하여 제조한 된장보다, 혈액응고 저해 활성이 가장 큰 활성을 나타낸 것으로 보아(Fig. 13의 [II-2]), 기능성 된장 제조시 간장 분리를 하지 않고, 된장을 제조하도록 한다. 간장 분리를 하였을 경우에도 숙성기간을 180일 발효시킨 된장 시료(No. 10)의 혈액 응고 저해 활성이 우수한 것으로 보아, 숙성 기간을 180일 이상 충분히 발효시키는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. 권익부, 김원국. 1998. 청국장장의 혈전용해기능. 영남대학교 부설 장류 연구소.
2. 길지은, 김기남, 박인식. 1998. 새로운 혈전용해 효소의 생성 및 특성 : 청국장에서 분리한 *acillus* sp. KP-6408 로부터 효소 생성의 최적조건. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 27:51-56.
3. 김용택, 김원국, 오훈일. 1995. 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 23:1-5.
4. 손동화, 이경애, 김승호, 안창원, 남희섭, 이형재, 신재익. 1996. Microplate법에 의한 된장유래의 항혈전 펩타이드 탐색. *Korean J Food Soc Technol*, 28:684-688.
5. 이시경, 허석, 주현규, 송기방. 1999. 된장으로부터 fibrin용해 세균의 분리에 관한 연구. *한국농화학회지*, 42:6-11.
6. 이진욱. 1998. 생물반응기 배양에서 *Bacillus subtilis* BK-17의 혈전용해효소 생산. 부산대학교 대학원 화학공학과.
7. 장순애, 김명희, 이명선, 오태광, 손천배. 2000. 새우젓 유래 *Bacillus* sp. S19가 생산하는 혈전용해효소

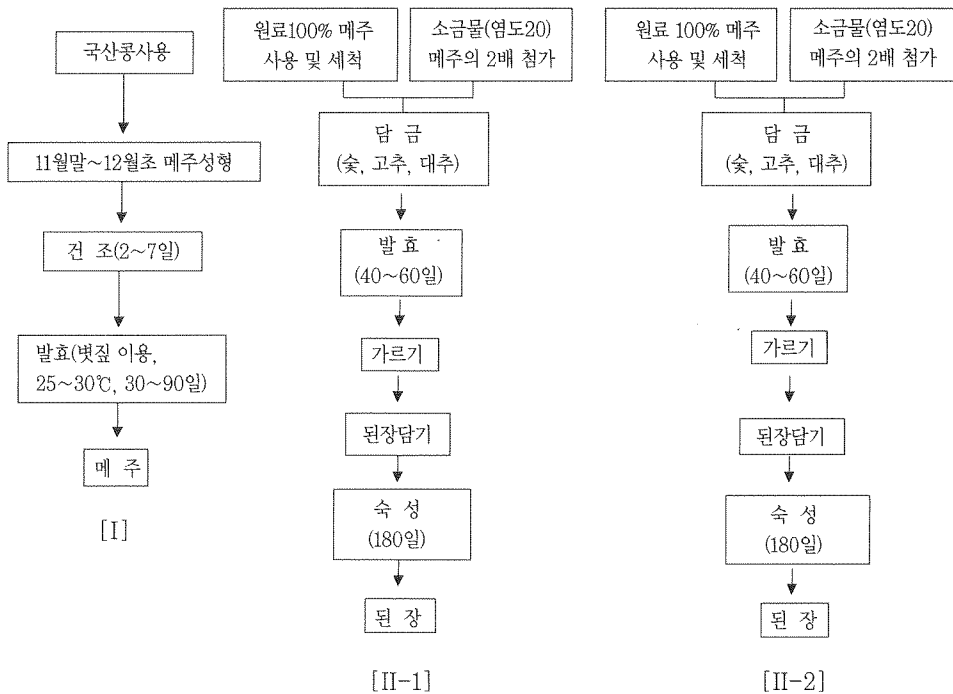


Fig. 13. 메주[I] 및 기능성 된장[II-1, II-2]을 제조하기 위한 제법 제안(□ : 가르기(고액분리) 안함)

- 의 정제 및 특성. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28:258-263.
8. 장영렬, 김원극, 권익부, 이현욱. 1998. 젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정. *Korean J Food SCI Technol* 130:655-659.
 9. 정영기, 양웅석, 강정욱, 공인수, 김정욱. 1995. 김치의 혈전용해작용. *생명과학회지 Korean J Life Science* 5:203-210.
 10. Binnine CG, Erickson BW, Hermans J., 1990. Inhibition of thrombin by synthetic hirudin peptides. *FEBS Lett* 270:85-89.
 11. Carpiello M, Vilado PG, Lippi A, Criscuoli MAD, Mura U., 1996. Kinetics of human thrombin inhibition by two novel peptide inhibitors(Hirunorm IV and Hirunorm V). *Biochem Pharmacol* 52:1141-1146.
 12. Chae, K.E., The Status of Production and Export of Korean Traditional Foods *Agricultural and Fishery Marketing Corporation Seoul 140-012, Korea.*
 13. Fenton, J.W., Oforu, F.A., Moon, D.G., Maraganore, J.M., 1991. Thrombin structure and function : why thrombin is the primary target for antithrombotics. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2:69-75.
 14. Kim, D.C., Chae, H.J., In, M.J., 2001. Stable thrombin inhibitors in salted fermented anchovy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem*, (submitted).
 15. Kim, D.C., In, M.J., Oh, N.S., Hwang, W.J., Jung, J., 1998. Existence of thermally stable thrombin inhibitors in soybean paste. *Doenjang Agric Chem Biotechnol* 41:613-615.
 16. Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., Maruyama, M., 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *Lumbricus Rubellus Jap J Physiology* 41:461-472.
 17. Nakajima, N., Mihara, H., Sumi, H., 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm. *Lumbricus rumbellus Biosci Biotech Biochem* 57:1726-1730.
 18. Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburn, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D., 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli*. *Nature* 301:214-221.
 19. Reed, G.H., Lin, L.H., Parhami-Seren, B., Kussie, P., 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase plasminogen activation complex. *Biochemistry* 34:10266-10271.
 20. Sumi, H., Nakajima, N., Mihara, H., 1993. A very stable and potent fibrinolytic enzymes found in earthworm. *Lumbricus rumbellus Comp Biochem Physiol*
 21. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., Hiratani, H 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica* 84:139-143.
 22. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., Muraki, H., 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43:1110-1111.
 23. Seo, B.C., 1990. The Korean Traditional Fermented Soybean Food Industry for Globalization. *Sempio Foods Company R&D Institute Icheon 467-820, Korea.*
 24. Voet, D., Voet, J.G., 1990. *Biochemistry*. Willy press, 1087-1095.