

## 전통된장의 제조방법 조사 및 혈액응고 저해활성이 높은 된장의 스크리닝

장인환 · 인만진<sup>1</sup> · 채희정\*

호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공

<sup>1</sup>청운대학교 식품영양학전공

(2003년 11월 25일 접수, 2004년 1월 30일 수리)

전통된장 제조방법으로서 원료 혼합비, 메주의 건조시간 및 온도, 메주와 된장의 발효 시간 및 온도, 된장·간장의 분리 여부, 된장 숙성(aging) 시간을 조사하였다. 혈액응고 저해 활성(anticoagulant activity)을 fibrin clotting assay법으로 분석하여 혈액응고 저해활성과 제법간의 상관 관계를 검토하였다. 숙성 기간이 길수록 혈액응고 저해활성이 높게 나타나는 경향을 보였으나 선형적인 상관관계보다는 비선형적으로 양의 상관관계를 갖는 것으로 판단되었다. 이상의 결과를 토대로 혈액응고 저해활성이 높은 2종의 된장시료를 선발하였으며 숙성기간이 180일 이상일 경우 전통된장의 혈액응고 저해활성이 높은 것으로 판단되었다.

**Key words:** 전통된장, 제조방법, 혈액응고 저해활성

### 서 론

한국의 전통된장은 예로부터 계승되어 온 우리나라의 대표적인 발효식품으로서, 곡류 단백질에서 부족되기 쉬운 필수 아미노산 및 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민 등을 보충해 주는 영양학적 우수성을 지닌다.<sup>1)</sup> 전통식 된장은 지방을 제거하지 않은 콩을 증자·분쇄·성형한 메주를 자연상태에서 장기간 발효·건조시켜 사용한다. 간장과 달리 가열·살균처리를 하지 않는 특징이 있으며, 경우에 따라서는 간장을 분리하고 남은 고형물을 이용하기도 한다.<sup>2)</sup> 또한 콩 단백질은 발효 시 미생물들이 생산하는 가수분해 효소에 의해 여러 종류의 펩타이드로 분해되어지며 이들 펩타이드는 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 기대되고 있다.<sup>3)</sup>

Park 등은 전통식 된장의 항돌연변이성을 콩으로 제조된 다른 발효 식품들, 즉 일본된장, 청국장 및 개량식 된장과 비교해 본 결과 재래식 된장의 활성이 가장 컸으며, 다음으로 개량식 된장, 청국장, 일본된장의 순이었다고 보고하였다.<sup>4)</sup> 또한 재래식 된장은 *in vivo*에서도 항암 효과가 확인되었고<sup>5)</sup> 세포분자 수준에서도 암세포의 성장 억제를 확인한 바 있다.<sup>6)</sup> 또한 한국의 전통식된장은 이런 효능 외에도 항산화,<sup>7)</sup> 면역 조절기능, 혈압 강하, ACE저해,<sup>8)</sup> 혈전용해능<sup>9)</sup> 등에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

혈전의 형성은 혈관의 손상 등과 같은 요인으로 인한 출혈 시 혈액이 응고되는 현상으로 체외의 혈전은 지혈에 절대적으로 중요한 역할을 하지만 이러한 혈전이 혈관 내에 과도하게 형성될 경우 정맥 및 동맥에서 혈액순환을 방해하여 신체조직으로의 영양공급 및 산소공급을 저해할 뿐만 아니라 뇌출혈, 뇌

혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등 뇌심혈관계 질환의 발병 원인이 된다.<sup>10)</sup> 이러한 혈전증을 치료하기 위한 목적으로 다양한 치료제들이 개발되어 있으나 대부분 고가이거나 체내에서의 흡수, 내산성 등의 문제로 urokinase와 nattokinase를 제외하고는 경구 투여가 불가능한 것으로 알려져 새로운 제제 개발의 필요성이 대두되고 있다. 혈액응고 저해제로서 임상적으로 널리 사용되는 heparin은 혈액응고 기작 중에서 내인성 경로의 prothrombin activator 형성을 억제하여 thrombin 생성을 억제하거나 이미 형성된 thrombin의 저해제인 antithrombin III나 heparin cofactor II의 활성을 증가시킴으로서 매우 강력한 항응고 활성을 나타낸다.<sup>11)</sup> 혈액응고 저해제에 대한 연구로는 Fenton 등이 thrombin의 구조와 기능에 대하여 연구하였고,<sup>12)</sup> Binnie 등이 hirudin 펩타이드 합성에 의한 thrombin의 활성저해에 대하여 발표하였으며,<sup>13)</sup> Carpiello 등은 사람의 thrombin에 대한 2가지 hirunorm 펩타이드의 저해활성에 대하여 연구하였으며,<sup>14)</sup> Lee 등은 구름버섯으로부터 항응고성 다당류의 혈액응고 저해 기작에 대하여 연구하였다.<sup>15)</sup> Shon 등은 된장으로부터 혈소판 응집저해 활성을 갖는 펩타이드에 대해 연구를 하였으며,<sup>3)</sup> 된장 같은 대두 발효 식품에서의 혈액응고 저해 물질로 기대할 수 있는 물질은 혈전 형성에 작용하는 thrombin을 저해하는 thrombin inhibitor 또는 fibrin clotting inhibitor로서 혈액응고 저해 펩타이드가 알려져 있다.<sup>17)</sup> 된장이 혈액응고 저해활성(anticoagulant activity)을 갖고 있을 지라도 된장 제조방법에 따라 혈액응고 저해활성의 차이를 보일 것으로 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 지역 농산물의 활용도를 높이고 농가 부업의 형태로 운영되어 농가 수익에 중요한 몫을 차지하고 있는 전통된장의 생리활성 중 하나인 혈액응고 저해 활성에 대해 제조방법에 따른 상관관계를 검토하였다. 이것을 토대로 향후 혈액응고 저해물질의 기능성 소재화를 위한 원료원을 스크리닝 하였다.

\*연락처

Phone: 82-41-540-5642; Fax: 82-2-6280-6346

E-mail: hjchae@office.hoseo.ac.kr

## 재료 및 방법

**실험재료.** 전통적인 제조방법에 의해 제조된 각 지역별 전통된장(traditional *doenjang*) 11종을 농가로부터 수집하여 혈액 응고 저해활성과 각 된장의 원료 및 제조방법에 따른 상관관계를 조사하였다. Fibrinogen은 (주)녹십자(한국)로부터 제공받았으며, thrombin은 Diagnostica Stago사(Asnieres-sur-seine, France)로부터 구입하였다.

**된장 시료의 전처리.** 각각의 된장 15 g을 200 ml의 증류수에 현탁하여 10분간 교반한 후 종이 여과지(Whatman No. 42)로 여과하였다. 여과한 각 된장 시료의 고형분 함량을 굴절계(N.O.W., Tokyo, Japan)로 측정하여 고형분 함량을 2.8%로 동일하게 맞추어 혈액응고 저해활성 측정의 시료로 사용하였다.

**Fibrin clotting assay.** 혈액응고 저해 활성은 Blood coagulation analyzer인 coagulometer(Coatron M1, TECO, Germany)를 이용하여 fibrin clotting assay에 의하여 thrombin time(TT)을 측정하는 방법을 사용하였다. 혈액응고 활성 중 thrombin time을 측정하기 위하여, thrombin을 10 mM Tris buffer(6 ml)에 0.125 unit이 용해되도록 칭량하여 사용하였다. Fibrinogen은 10 mM Tris buffer(10 ml)에 0.150%(w/v)의 농도로 용해하여 사용하였다. 된장시료(12  $\mu$ l)와 fibrinogen 용액(238  $\mu$ l)을 마이크로튜브에 넣고 vortex를 이용하여 혼합하였으며, 된장-fibrinogen 혼합시료(25  $\mu$ l)를 큐벳에 첨가한 후 coagulometer에서 3분간 37°C로 예열하였다. 예열된 큐벳에 thrombin(50

$\mu$ l)를 첨가한 후 fibrin clotting time을 coagulometer를 이용하여 측정하였다. 즉 TT가 큰 값을 보이는 경우 thrombin에 의한 혈액응고가 지연됨을 의미한다. 즉, 본 연구에서는 이러한 TT를 혈액응고 저해 활성으로 하여 분석하였다. TT를 정량적 수치로 바꾸어 환산하기 위하여 thrombin 시약을 농도별로 희석하여 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선의 기울기(a)와 절편(b)을 이용하여 식(1)과 같이 thrombin unit(TU)으로 계산하였다. Fibrin clotting inhibition(FCI)를 식(2)와 같이 환산하여 계산하였다.

$$TU = \frac{a}{CT} + b \quad (1)$$

$$FCI = \frac{1 - TU^{sample}}{TU_{DW}} \times 100 (\%) \quad (2)$$

혈액응고 저해활성 분석의 양성 대조구로 천연 혈액응고 저해물질인 heparin(1%)을 이용하였다. 모든 분석은 3회 반복실험의 결과를 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

**전통된장의 제조방법 조사.** 각 전통된장 제조 업체에서 사용하는 메주의 제조방법을 Table 1에 정리하였다(장 담금 과정에서 솥, 고추, 대추 등의 첨가 과정은 생략하였다). Table 2는 메주 제조 후의 전통된장 제법을 조사한 결과이다. Table 1

Table 1. *Meju* manufacturing process for traditional *doenjang*

No.	Material	Manufacturing season (months)	Drying temperature (°C)	Drying time (day)	Fermentation temperature (°C)	Fermentation time (day)
1	Soybean	November	40	7	30	90
2	Soybean	November	40	5	30	60-90
3	Soybean	December	38-40	1	25-30	50
4	Soybean	December-January	40	7	25-30	60-90
5	Soybean	December	40	2-3	25-30	40
6	Soybean	November	40	10	30	90
7	Soybean	December	40	7	25-30	45-60
8	Soybean	November	40	10	25-30	120
9	Soybean	December	40	7	30	30
10	Soybean	December	38-40	7	25-30	50
11	Soybean	November	38-40	4-5	25-30	90

Table 2. *Doenjang* manufacturing process of the collected samples

No	Raw materials	Fermentation time (day)	Solid-liquid separation	Aging time (day)
1	<i>Meju</i> , salt water, boiled barley, red pepper seed powder	15	O	180
2	<i>Meju</i>	40-60	O	90
3	<i>Meju</i>	60	O	50
4	<i>Meju</i>	40-50	O	40
5	<i>Meju</i>	30	O	30
6	<i>Meju</i>	40-60	O	115
7	<i>Meju</i>	60	O	90
8	<i>Meju</i>	45	O	180
9	<i>Meju</i>	50-60	O	115
10	<i>Meju</i>	60	O	30
11	<i>Meju</i>	40-60	X	730

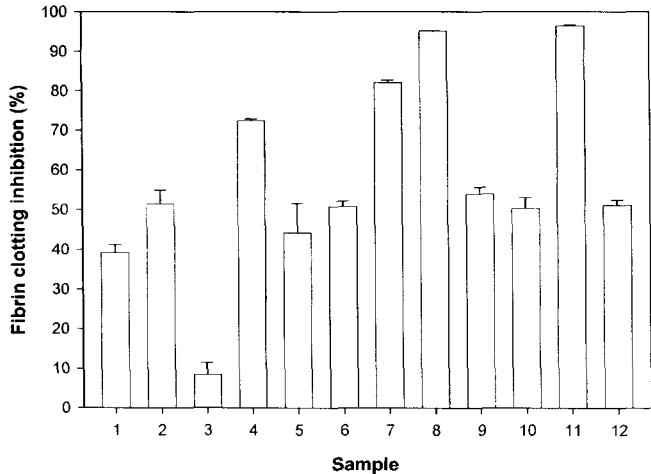


Fig. 1. Fibrin clotting inhibition activity of traditional doenjang samples. No. 1-11: traditional doenjang, No. 12: heparin (1%).

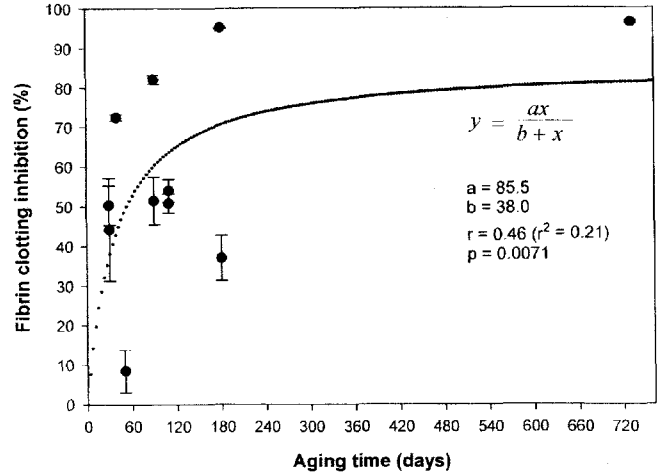


Fig. 2. The effect of doenjang aging time on fibrin clotting inhibition.

과 Table 2에서 정리한 바와 같이 전통된장 제조방법으로서 원료 혼합비, 메주의 건조시간 및 온도, 메주와 된장의 발효 시간 및 온도, 된장·간장의 분리 여부, 된장 숙성(aging) 시간을 조사하였다. 메주는 제조방법 및 시기에 약간의 차이가 있었으나, 수집된 모든 전통된장 제조 업체가 원료로 대두만을 사용하였으며 인위적으로 미생물을 접종하지 않고 자연 상태에서 발효시켜 된장을 제조하였다. 메주의 제조시기는 보통 11~12월 이었고, 메주의 건조 온도와 건조 시간은 각각 38~40°C와 1~10 일이었으며 메주의 발효 온도와 발효 시간은 각각 25~30°C와 30~120일이었다. 수집된 자료를 바탕으로 전통된장의 일반적인 제법을 정리하면 다음과 같다. 콩으로 메주를 담그고 소금과 물(또는 염수)을 혼합하여 일정 시간 발효시킨 다음 고상인 메주와 액상인 메주 추출액(meju extract)을 체(sieve) 등으로 고액분리(solid-liquid separation)한다. 고형 성분과 액상은 각각 숙성과 달이기(boiling)를 거쳐 된장과 간장으로 제조된다.

**된장의 혈액응고 저해활성 측정.** 혈액응고 저해활성 분석은 coagulometer를 이용하여 aPTT(activated partial thromboplastin time), PT(prothrombin time), TT(thrombin time) 측정할 수 있으며 외인성 경로인 Factor II, V, VII, X 및 내인성 경로인 Factor VIII, IX, XI, XII는 각각 PT, aPTT법을 이용하여<sup>15)</sup> 측정할 수 있다. 본 연구에서는 fibrinogen이 thrombin과 반응하여 fibrin을 형성하며 응고가 일어나는 시간(TT) 측정을 통하여 혈액응고 저해활성(anticoagulant activity)과 관련한 전통된장의 기능성을 평가하고자 하였다. 전처리를 통해 얻은 각 된장을 시료로 하여 fibrin clotting assay법을 실시하여 우선 TT가 큰 된장 시료를 선별하였고 이를 FCI로 환산하였다. 또한 시료 중 염의 함량이 혈액응고 저해활성에 영향을 끼칠 것으로 판단되어 시료 중 염의 함량이 FCI에 미치는 영향을 상관관계 분석한 결과 염의 함량이 10% 이하에서는 FCI에 영향을 끼치지 않은 것으로 나타났다(데이터 제시는 생략함). 일반적으로 된장에는 10~15% 정도의 염이 함유되어 있지만 된장을 대략 13배로 희석하여 사용하였으므로 시료 중의 최종 염농도는 1%이내로 감소하여 FCI 활성화에 영향을 끼치지 않은 것으로 판단되었다.

Fig. 1에서와 같이 시료 No. 8, 11의 FCI가 높게 나타났으며, SPSS 10.0 프로그램(SPSS Science, USA)을 이용하여 시료 No. 8, 11의 FCI 값들에 대한 각각의 평균값을 검정값으로 하여 일표본 T 검정을 한 결과 두 시료에 대한 유의확률이 모두 0으로서 시료 No. 8, 11의 FCI값이 유의적인 값이라는 것을 알 수 있었다. 된장에서의 혈액응고 저해활성이 나타나는 이유는 혈전용해효소 및 대두 발효 식품 속에 thrombin inhibitor가 보고된 바<sup>17)</sup> 있는 것처럼 이는 대두 유래의 펩타이드 성분 중 혈액응고효소인 thrombin의 활성을 저해하는 물질이 존재하기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같이 본 연구에서도 혈액응고 저해인자의 존재 유무와 양에 의해 된장의 제조사별로 서로 상이한 결과가 나타난 것으로 판단된다. 된장 시료 No. 11을 고형분 농도별(0.5-5%)로 FCI를 측정할 결과 고형분 농도의 증가에 따라 FCI값이 증가함을 확인하였다(데이터제시는 생략함).

**된장의 숙성기간에 따른 혈액응고 저해활성.** Table 2와 같이 수집된 전통된장의 제조방법(원료에 의한 차이, 숙성조건의 차이 등)을 조사하여 FCI와의 상관관계를 검토하였다(Fig. 1).

전통된장은 옛날부터 가정에서 만들어 온 방법으로 따뜻한 방안이나 건조실에 삶은 콩을 벗겨내서 싸거나 그 주변에 깔아 놓아 *Bacillus subtilis*가 자동적으로 성장하게 되므로, 인위적으로 균을 접종하지 않는다. 그러나 개량된장의 경우 단백질과 전분질을 분해하는 *Aspergillus oryzae* 등의 균을 인위적으로 접종, 배양하여 코지를 만든 후 여기에 삶은 콩과 소금을 혼합하여 숙성시켜 마쇄 후 제품화한다.<sup>18)</sup> 전통된장의 제조를 위한 원료의 차이, 발효·숙성 조건의 차이, 여과여부 등이 전통된장 제조사별로 상이하였으나 메주 제조 및 메주 발효과정은 제조사별로 크게 다르지 않았다. 이와 같이 제조사별 제조조건의 차이와 혈액응고 저해 활성간의 상관관계를 검토 분석하였으나 일정한 상관관계를 도출할 수 없었다. 발효 시간과 숙성 시간을 살펴보면 발효 시간은 크게 다르지 않았으며 숙성 시간의 경우는 30-730일로, 숙성 시간이 큰 차이를 나타내었다. Fig. 1에서와 같이 전통된장 중 No. 8과 No. 11의 활성이 각각 95%와 96%로서 다른 된장보다 우수하게 나타났으며, 이들의 숙성

기간은 각각 180과 730일로, 비교적 다른 된장에 비하여 숙성 기간이 긴 것으로 조사되었다(Table 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 숙성 기간이 길수록(180일 이상) 혈액응고 저해활성이 높게 나타나는 경향을 보였으나 선형적인 상관관계보다는 비선형적으로 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타났다.

Sigma Plot 2001 프로그램(SPSS Science, USA)을 이용하여 두개의 매개변수(a, b)를 갖는 hyperbola형 수식을 이용하여 회귀분석(regression analysis)을 수행하였다. 분산분석(analysis of variance)을 한 결과 숙성 기간과 FCI값 간에 유의적인 관계가 있음을 알 수 있었다( $p=0.0071$ , 유의수준 5%).

이상의 결과를 토대로 혈액응고 저해활성이 높은 2종의 된장 시료(No. 8, 11)를 선발하였으며 숙성기간이 180일 이상일 경우 전통된장의 혈액응고 저해활성이 높은 것으로 판단되었다.

### 감사의 글

본 연구는 2002-2003년 대산농촌문화재단의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Yang, S. H. and Chung, Y. J. (1992) Optimization of the taste components composition in traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Nutr.* **21**, 449-453.
2. Park, S. K., Seo, K. I., Moon, J. S. and Lee, Y. H. (2000) Quality characteristics of home-made *doenjang*, a traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* **16**, 23-29.
3. Shon, D. H., Lee, K. A., Kim, S. H. and Ahn, C. W. (1996) Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 684-688.
4. Park, K. Y., Moon, S. H., Baik, H. S. and Cheigh, H. S. (1990) Antimutagenic effect of *doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *Korean J. Soc. Food Nutr.* **19**, 156-162.
5. Park, K. Y. (1997) Destruction of aflatoxins during the manufacture of *doenjang* by traditional method and cancer preventive effects of *doenjang*. *Korean J. Assoc. Cancer Prev.* **2**, 27-37.
6. Choi, Y. H., Choi, B. T., Lee, W. H., Rhee, S. H. and Park, K. Y. (2001) Doenjang hexane fraction induced G1 arrest is associated with the inhibition of Prb phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21 in human breast carcinoma MCF 7 cells. *Oncol. Rep.* **8**, 1091-1096.
7. Santiago, A. R., Hiramatsu, H. and Mori, A. (1992) Japanese soybean paste miso scavenging free radicals and inhibit lipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **38**, 297-302.
8. Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., Lee, H. J. and Moon, T. H. (1995) Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 230-234.
9. Kim, S. H. (1998) New trend of studying on potential activities of *doenjang* fibrinolytic activity. *Korean Soybean Digest.* **15**, 8-15.
10. Kim, Y. T. (1994) Identification of the fibrinolytic bacterial strain from *chungkook-jang*. Ph. D. Thesis. Sejong University, Seoul, Korea.
11. Y. S. Kim (1992) Structure and activity of heparin. *Korean Sci. Biochem. Mol. Biol.* **4**, 209-215.
12. Fenton, J. W., Ofosu, F. A., Moon, D. G. and Maraganore, J. M. (1991) Thrombin structure and function: why thrombin is the primary target for antithrombotics. *Blood Coagul. Fibrin.* **2**, 69-75.
13. Binnine, C. G., Erickson, B. W. and Hermans, J. (1990) Inhibition of thrombin by synthetic hirudin peptides. *FEBS Lett.* **270**, 85-89.
14. Carpiello, M., Vilado, P. G., Lippi, A., Criscuoli, M. A. and Mura, U. (1996) Kinetics of human thrombin inhibition by two novel peptide inhibitors (Hirunorm IV and Hirunorm V). *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1141-1146.
15. Lee, H. S., Kweon M. H. and Lim, W. J. (1997) Inhibitory mechanism of blood coagulation by the anticoagulant polysaccharide from *Coriolus versicolor*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 817-822.
16. Kim, D. C., Chae, H. J. and In, M. J. (2004) Existence of stable fibrin clotting inhibitor in salt-fermented anchovy sauce. *J. Food Compos. Anal.* (in press)
17. Song, Y. S. and Kwon, T. K. (2000) Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Food Ind. Nutr.* **5**, 36-41.
18. Park, K. Y., Hwang, K. M., Jung, K. O. and Lee, K. B. (2002) Studies on the standardization of *doenjang* (Korean soybean paste) 1. standardization of manufacturing method of *doenjang* by literatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 343-350.

---

**Manufacturing Method for Traditional *Doenjang* and Screening of High Fibrin Clotting Inhibitory Samples**  
In-Hwan Jang, Man-Jin In<sup>1</sup> and Hee Jeong Chae\* (*Dept. of Food and Biotechnology, Natural Science Division and Dept. of Innovative Industrial Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Asan 336-795, Korea, <sup>1</sup>Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea*)

---

Key words: traditional *doenjang*, manufacturing method, fibrin clotting inhibition activity

\*Corresponding author