

키위와 무를 첨가한 소림 검정콩 청국장의 정미성분

손미예¹ · 권선화¹ · 서권일^{1,2} · 박석규^{1,2*} · 박정로²

¹한국전통발효식품연구소

²순천대학교 식품영양학과

Taste Compounds of Small Black Bean *Chungkugjang* Added with Kiwi and Radish

Mi-Yae Shon¹, Sun-Hwa Kwon¹, Kwon-II Seo^{1,2}, Seok-Kyu Park^{1,2*} and Jeong-Ro Park²

¹Korea Fermented Food Research Institute, Sancheong 666-962, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

To confirm the repression of off-odor and improvement of food quality in small black bean *chungkugjang* (SBC), some taste compounds of SBC added with kiwi and radish homogenate and fermented for 3 days at 42°C were investigated. Contents of free amino acids in SBC were lower than that of soybean *chungkugjang* (SC) and were increased by adding kiwi and radish homogenate to black bean, indicating that two materials were effective to the enzymatic digestibility of soy protein. Of organic acids, citric acid was the most abundant, followed by acetic acid and lactic acid. Fatty acid composition was high in the order of linoleic acid (50.82~54.51%), oleic acid (17.76~22.10%) and palmitic acid (12.13~13.79%). There were no significant difference in compositions of organic acids and fatty acids of *chungkugjangs*. Major volatile compounds of SBC were indole, 2,5-dimethyl pyrazine and trimethyl pyrazine. Contents of alkyl pyrazines that contribute the characteristic aroma and flavor of SBC added and fermented with kiwi and radish homogenate were 3 times lower than those of SC. Uracil and UMP were major nucleic acid-related compounds in all four *chungkugjangs*. Contents of the other nucleic acid-related compounds were a similar trend in all *chungkugjangs*.

Key words – small black bean, *chungkugjang*, free amino acid, organic acid, fatty acid, volatile and nucleic acid-related compound

서 론

청국장은 곡류에서 부족한 필수아미노산을 많이 함유하고 있는 대두를 이용하여 가장 단시간에 발효시킨 것으로

단백질과 지방함량이 다른 장류에 비하여 많으며, 콩단백질의 소화와 흡수가 빠르고, 구수한 풍미와 점질성을 가지고 있는 우리나라의 대표적인 조미 발효식품이다[13,15].

약콩이라 불리는 소림 검정콩에는 스트레스성 단백질의 생성을 저하하여 유방, 직장 및 전립선암 등에 대한 항암 작용이나, 유해한 활성산소종을 제거하는 항산화효과를 나타낼 수 있는 genistein, daidzein과 같은 isoflavone류가

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (061) 750-3652, Fax : (061) 750-3652
E-mail : bestmeju@sunchon.ac.kr

있다[2,3,7,10-12]. 약콩의 단점으로는 종피가 두껍고 지방함량이 적어 최종 발효식품의 찰기가 없으며, 육질이 단단하여 발효 할 때 단백질 분해도가 낮다. 또한 종피에는 항균활성을 나타내는 수용성 색소가 존재하여 발효도가 낮은 편이다[14,15].

최근의 청국장은 좋아하는 사람도 있지만, 젊은 사람들과 외국인들에게는 입맛의 서구화와 간편화로 인하여 외면당하고 있다. 그 이유 중의 하나는 청국장 고유의 강한 이취 때문에 싫어하는 사람들이 많다. 청국장과 유사한 납두는 이취가 적고, 위생적으로 제조되어 일본 국민들이 선호하고 있는데, 우리의 청국장도 앞으로는 기존의 재래 청국장보다 바람직하지 못한 냄새를 줄이고, 위생적인 고품질의 기능성 청국장으로 품질을 개선한다면 세계화 식품으로서 각광 받을 것으로 확신한다[5].

본 연구에서는 약리효과가 많고 표면적이 넓어 종자하기 쉬운 소립 검정콩을 청국장 제조에 이용하였으며, 콩발효율 증진과 이취발생 억압을 위하여 키위와 무를 첨가해서 발효시킨 소립 검정콩 청국장의 유리아미노산, 유기산, 핵산관련물질, 휘발성분 및 지방산을 분석하였다.

재료 및 방법

유리아미노산 분석

유리아미노산의 분석은 청국장 5 g에 중류수 약 100 mL를 가하고 마쇄하여 500 mL로 정용한 후 60°C에서 30 분간 추출하였다. 이 추출액을 0.2 μm membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과한 후 아미노산분석기(LKB 4150, alpha autoanalyzer)로 분석하였다[1].

유기산 분석

유기산의 분석은 청국장 50 g에 중류수 50 mL를 가하여 homogenizer로 마쇄하고 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상정액 중 일부를 0.45 μm membrane filter와 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시킨 후 HPLC로 분석하였으며, 유기산 각각의 농도는 표준물질로 검량선을 작성하여 환산하였다[14].

핵산관련물질

핵산관련물질의 분석은 마쇄한 청국장 10 g에 10% 냉과

염소산 용액 25 mL를 침가하여 15 분간 마쇄하고 원심분리 (4,000 × g, 10 min)하였다. 상정액을 취한 후 다시 같은 방법으로 추출하여 얻은 상정액을 합하고, 5 N-KOH 용액을 가하여 pH 6.5로 조절하여 중화된 냉과염소산 용액으로 100 mL 정용하였다. 이를 30분간 방치한 후 원심분리 (10,000 × g, 10 min)하여 상정액을 0.45 μm membrane filter로 여과하고 Sep-pak C₁₈ cartridge를 통과시킨 후 HPLC (Shimadzu SPD 10A)로 분석하였으며, 이를 물질의 함량은 각 표준물질로 검량선을 작성한 후 환산하였다[8].

휘발성분 분석

휘발성분의 분석은 Likens와 Nikerson의 simultaneous steam distillation solvent extraction (SDE) 장치[14]를 이용하여 추출하였다(Fig. 1). 즉 시료 플라스크에 마쇄 청국장 30 g과 중류수 300 mL 및 내부표준물질 4-decanol (10 ppm)을 첨가한 후 10분간 혼합 교반하여 100°C로 유지하고, 또 다른 용매 플라스크는 제 중류한 디에칠에테르 50 mL를 넣은 후 40°C로 하여 2시간 동안 휘발성분을 포집하였다. 이후 추출시료를 무수황산나트륨을 사용하여 4°C에서 하룻밤 탈수한 후 35°C 수욕조에서 rotary vacuum evaporator로 에테르를 제거하여 농축한 것을 gas chromatograph (Hewlett packard GC 5890) 및 GC-mass spectrometry (Shimadzu GC-MS QP 1000)로 분석하였다.

지방산 조성 분석

지방산 조성의 분석은 청국장 5 g과 Folch 용액[14](chloroform : methanol = 2 : 1, v/v) 100 mL를 혼합하여 마쇄 기로 마쇄한 후 질소충진한 다음에 밀봉하여 실온에서 30 분간 교반하여 Büchner여과기로 여과하였다. 여과액을 분액여두에 옮기고 중류수 70 mL를 가한 후 서서히 혼합한 다음, 냉장고(5°C)에서 두층이 분리될 때까지 방치한 후, 아래층을 취해서 회전진공농축기(35°C)에서 농축시켰다. 농축액을 시험관에 옮겨 질소가스로 건고시킨 다음 5% sulfuric acid-methanol 3 mL를 가하고 질소충진하여 밀봉하고 90°C에서 90분간 반응시켜 메칠에스테르화하였다. 다시 5% NaHCO₃ 3 mL를 가하고 석유에테르 3 mL로 3회 추출하여 질소가스로 건고시킨 다음, 석유에테르 100 μL로 녹여서 GC (Hewlett packard GC 5890)로 분석하였다.

결과 및 고찰

유리아미노산

대두 및 소립 검정콩을 이용한 청국장의 유리아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 전체유리아미노산 함량은 440.6~724.0 mg%로 나타났으며, 그중 대조구인 황색대두 청국장이 724.0 mg%로 가장 높았으며, 키위와 무를 첨가하지 않은 소립종 청국장이 440.6 mg%로 가장 낮게 나타났다. 이것은 소립 검정콩 청국장이 대조구인 황색 대두 청국장 보다 40% 정도가 발효율이 떨어진다는 것을 의미한다. 따라서 단백질 분해효소력이 높다고 알려져 있는[14], 키위와 무를 첨가한 결과 유리아미노산의 값이 황색 대두 청국장보다는 적지만 비첨가 검정콩 청국장에 비하여 약 15%정도 증가한 바 이것으로써 발효율에 효과가 있음을 알 수 있었다.

또한 모든 청국장에서 정미성분으로 알려진 glutamic acid의 함량이 가장 많았는데, 검정콩 청국장류가 대조구

Table 1. Contents of free amino acids of small black bean chungkugjang fermented at 42°C for 72 hours (mg%)

Amino acids	Soy-bean	Small black bean		
		No addition	Radish	Kiwi
Aspartic acid	23.9	11.6	13.5	13.7
Threonine	30.8	14.0	13.9	15.6
Serine	12.4	6.3	6.1	6.4
Asparagine	28.6	15.2	21.2	17.6
Glutamic acid	107.1	148.6	175.9	179.6
Proline	17.9	T	9.8	8.4
Glycine	24.3	9.4	12.1	10.7
Alanine	51.8	21.5	24.7	25.7
Citrulline	5.5	7.8	20.8	20.4
Valine	60.5	30.6	36.0	35.6
Methionine	19.4	8.7	10.0	9.9
Isoleucine	48.4	22.7	27.1	27.5
Leucine	96.3	47.7	57.2	56.2
Tyrosine	59.4	27.3	16.7	19.0
Ornithine	35.2	16.5	11.6	12.9
Lysine	82.3	44.4	51.2	52.3
Histidine	20.2	8.3	10.1	10.8
Essential amino acids (A)	337.7	168.1	195.4	197.1
Total amino acids (B)	724.0	440.6	517.9	522.3
(A)/(B) × 100 (%)	46.6	38.2	37.7	37.7

인 황색대두 청국장의 107.1 mg%에 비해 월등히 많았으며, 특히 키위를 넣은 소립종 검정콩 청국장이 179.6 mg%로서 가장 많았다. 그리고 모든 청국장에서 phenylalanine과 tryptophan을 제외한 필수 아미노산이 195.4~337.7 mg% 존재 하였으며, leucine, lysine 및 valine 순으로 그 함량이 많이 나타났다. 특히 청국장의 lysine은 쌀을 주식으로 하는 우리의 식생활에서 부족한 필수아미노산의 좋은 급원이 될 수 있을 것으로 생각되어진다.

Seo 등[16]은 대두에 각각 *Bacillus natto*와 *B. subtilis*를 첨가하여 3일간 발효시킨 청국장의 전체 유리 아미노산 조성을 측정한 결과 18.64 및 12.94 mg%이었고, 이 중 glutamic acid가 각각 3.03 및 1.90 mg%로서 가장 높았으며, 그 다음으로 leucine이 각각 2.42 및 1.47 mg%로 나타났다고 보고하였다. 또한 Choi 등[6]은 *B. subtilis* DC-2균주를 이용하여 제조한 청국장의 발효 중 72시간 때의 총유리아미노산 함량은 10,502.83 mg%이었으며, glutamic acid가 1,008.40 mg%로 가장 많았으며, 그 다음이 phenylalanine, alanine 순이었다고 보고하였다. 이상의 보고들은 glutamic acid 함량이 가장 높은 것은 본 연구 결과와 같은 경향이었으나, 그 함량은 균주, 실험재료 및 제조방법에 따라 차이가 많을 것으로 생각되어진다.

유기산

대두 및 소립 검정콩을 이용한 청국장의 유기산 함량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 유기산은 균주를 접종한 청국장을 제외하고는 citric acid의 함량이 88.7~113.2 mg%로서 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음 순으로 acetic acid 가 64.8~84.7 mg%로 나타났으며, lactic acid가 14.1~19.9 mg%로 다른 유기산에 비하여 적은 함량을 나타내었다. 각 시료간에는 citric acid의 경우 키위를 첨가한 소립 검정콩 청국장이 113.2 mg%로 가장 높게 나타났고, 무를 첨가한 소립 검정콩 청국장이 88.7 mg%로서 가장 적게 나타났다. acetic acid의 경우 비첨가 황색대두 청국장이 84.7 mg%로서 가장 많이 나타났고, 무를 첨가한 소립 검정콩 청국장이 64.8 mg%로 가장 적게 나타났다.

Chang [4]은 전통 청국장 시험구의 평균 총 유기산 함량(882.9 mg%) 중에서 citric acid의 함량이 782.0 mg%로서 가장 많았고, 다음으로 acetic, lactic acid 순이었다고 보고하였는데, 이는 본 결과와 같은 경향이었다.

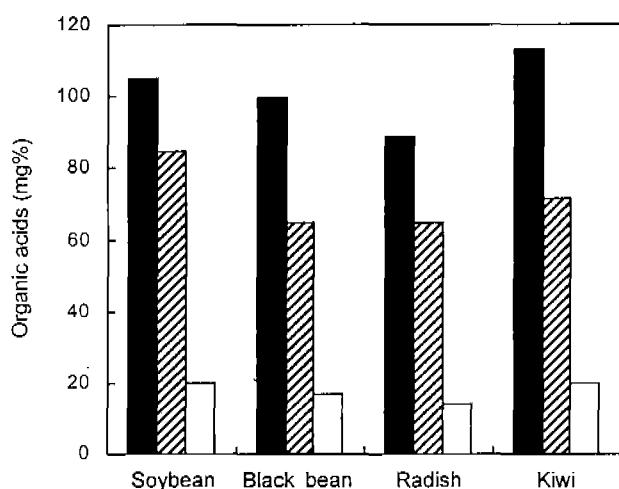


Fig. 1. Contents of organic acids of small black bean chungkugjang fermented at 42°C for 72 hours.
 ■: Citric acid; ▨: Acetic acid; □: Lactic acid

핵산관련물질

대두 및 소립 검정콩을 이용한 청국장의 핵산관련물질의 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 핵산관련물질 중 uracil 및 UMP의 함량이 많은 함량을 나타내었는데, UMP는 무를 첨가한 검정콩 청국장(10.64 mg%)과 키위를 첨가한 검정콩 청국장(8.10 mg%)이 가장 많이 나타났다. 또한 감칠맛을 나타내는 GMP, IMP, AMP를 비롯하여 cytosine, guanine, CMP, ADP 및 ATP도 검출되었다.

Table 2. Contents of nucleic acid-related compounds of small black bean chungkugjang fermented at 42°C for 72 hours (mg%)

Compounds	Soybean	Small black bean		
		No addition	Radish	Kiwi
Cytosine	0.53	0.45	0.72	0.63
Guanine	T	3.50	T	3.21
Uracil	8.72	7.11	10.64	7.44
CMP	3.06	3.28	T	2.33
UMP	6.96	7.34	6.81	8.10
GMP	3.73	3.73	2.99	3.49
IMP	1.06	0.96	1.58	1.62
AMP	0.70	1.18	0.86	1.05
ADP	1.34	0.99	1.23	1.21
ATP	0.57	0.72	0.75	0.87

휘발성분

대두 및 소립 검정콩을 이용한 청국장의 휘발성분을 SDE 법에 의하여 추출하고 GC 및 GC-MS로 동정한 결과는 Table 3과 같다. 청국장의 휘발성분은 2,5-dimethyl pyrazine, trimethyl pyrazine 및 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine을 포함한 24종류의 휘발성 화합물이 동정되었다. 이들 중 indole이 20.38~43.22 ppm으로 가장 많이 나타났으며, 2,5-dimethyl pyrazine, trimethyl pyrazine 및 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine 등의 pyrazine류는 청국장 특유의 냄새로서[15], 전체 함량이 10.71~30.9 ppm을 나타내었다. 그 중 대조구인 황색대두 청국장이 30.9 ppm으로 가장 높았으며, 소립 검정콩에 무 및 키위를 첨가한 청국장에서는 이를 휘발성분이 각각 11.97, 10.71 ppm로서 약 3배 정도가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 키위나 무를 첨가한 청국장이 대조구인 황색대두 청국장보다 이취액제가 많이 되었다고 생각된다. 또한 pyrazine류 중에는 2,5-dimethyl pyrazine이 6.41~13.8 ppm으로 가장 많았으며, 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine가 1.09~4.27 ppm으로 가장 적게 나타났다.

지방산 조성

대두 및 소립종 검정콩을 이용한 청국장의 지방산 조성은 Table 4와 같다. 모든 청국장의 지방산 조성에서 linoleic acid의 비율이 50.82~54.51% 범위로 다른 지방산에 비하여 월등하게 높았는데, 시료간의 차이는 거의 미미하였다. 그 다음으로는 oleic, palmitic, α -linolenic 및 stearic acid 순으로 높게 나타났으며, arachidic acid 및 eicosapentaenoic acid (EPA)도 미량 검출되었다. 또한 전체적으로 불포화 지방산의 함량이 전체 지방산의 80% 이상을 차지하고 있으며, 그 중 다가불포지방산의 함량도 모두 60% 이상을 차지하였다.

본 실험 결과는 Park 등[10]이 전통방법에 의한 제조된 된장의 지방산 조성이 linoleic acid (49.24%), oleic acid (22.6%), palmitic acid 및 linolenic acid 순이었다고 보고한 것과 Kang과 Lee[9]가 보고한 90일간 숙성한 전통된장의 palmitic (11.43%), stearic (4.17%), oleic (23.87%), linoleic (52.23%), linolenic acid (7.77%)와 비슷한 지방산 조성이었는데, 된장과 청국장은 발효에 의한 지방산의 조성 변화가 크게 일어나지 않음을 알 수 있었다.

Table 3. Contents of volatile compounds of small black bean *chungkugjang* fermented at 42°C for 72 hours and analyzed by SDE method (ppm)

Compounds	Soybean	Small black bean		
		No addition	Radish	Kiwi
Trimethyl silanol	1.54	ND	1.53	1.59
4-Heptanol	0.62	0.53	0.63	0.55
2,5-Dimethyl pyrazine	13.81	10.58	6.41	6.99
Trimethyl pyrazine	12.78	10.17	3.45	2.63
4-Decanone	2.34	2.69	2.70	2.12
3-Ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	4.27	3.34	2.11	1.09
Benzaldehyde	4.16	0.63	1.07	1.18
4-Decanol			Internal standard	
Isovaleric acid+heptyl butyric acid	1.43	0.85	0.31	0.46
Methyl phenyl acetate	0.50	ND	0.26	ND
Ethyl phenyl acetate	0.65	ND	0.28	ND
Caproic acid	2.78	ND	ND	ND
Guaiaconol	1.21	1.72	2.22	1.43
Benzyl alcohol	0.56	0.44	0.60	0.38
2-Phenyl-2-butanol	1.26	1.55	2.08	1.16
2-Acetyl pyrrole	0.90	0.53	0.76	0.41
5-Phenyl-2-phenyl-2-hexanal	0.50	ND	ND	ND
Methyl palmitate	0.86	0.91	0.99	0.60
cis-Parnesol	0.47	0.18	0.53	0.38
4-Vinyl phenol	1.31	0.53	0.64	0.32
Benzoic acid	0.33	ND	ND	ND
Indole	43.22	20.38	25.82	23.62
Myristic acid	0.43	ND	0.58	ND
Pentadecanoic acid	0.52	1.86	2.32	0.38

ND : not detected

Table 4. Fatty acid compositions of small black bean *chungkugjang* fermented at 42°C for 72 hours (%)

Fatty acids	Soybean	Small black bean		
		No addition	Radish	Kiwi
Palmitic acid	12.13	12.89	13.79	12.69
Stearic acid	3.53	4.45	3.98	4.36
Oleic acid	22.10	17.76	19.71	17.82
Vaccenic acid	1.50	1.43	1.34	1.44
Linoleic acid	50.82	54.51	53.05	54.42
α-Linolenic acid	8.78	8.01	7.75	8.54
Arachidic acid	0.33	0.35	0.19	0.35
Eicosanoic acid	0.25	T	T	T
Eicosapentaenoic acid	0.43	0.39	0.19	3.75

T : trace

요약

소립검정콩 청국장의 품질개선과 불쾌취 억압을 목적으로 키위와 무를 첨가하여 42°C에서 3일간 발효시킨 소립검정콩 청국장의 몇 가지 맛성분을 조사하였다. 소립검정콩 청국장은 황색대두 청국장보다 유리아미노산 함량이 적었지만, 키위와 무를 첨가하여 발효시키면 유리아미노산의 함량이 증가되어 콩단백질 분해에 효과적이었다. 유기산은 모든 청국장에서 citric acid가 가장 많았으며, 다음으로 acetic acid, lactic acid 순으로 많았다. 지방산은 linoleic acid (50.82~54.51%) > oleic acid (17.76~22.10%) > palmitic acid (12.13~13.79%) 순으로 많았다. 청국장의 종류별로 유기산과 지방산 비율은 유의적인 차이가 없었다. 청국장의 주요 휘발성 성분으로는 indole, 2,5-dimethyl pyrazine 및 tri-

methyl pyrazine였으며, 청국장의 독특한 향미성분인 pyrazine류는 대두 청국장보다 키위와 무를 넣은 소립 검정콩 청국장에서 약 3배 정도 감소하였다. 주요 핵산관련물질은 uracil과 UMP였으며, 다른 것은 그 함량에서 유사한 경향이었다.

참 고 문 헌

1. A.O.A.C. 1990. *Official Method of Analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 32.
2. Bae, E. A., T. W. Kwon and G. S. Moon. 1997. Isoflavone contents and antioxidative effects of soybean, soybean curd and their by-products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 371-375.
3. Bae, E. A. and G. S. Moon. 1997. A study on the antioxidative of Korean soybean. *J. Korean Soc. Food Sci. Nitr.* **26**, 203-208.
4. Chang, M. C., J. S. Kim, S. M. Yoo, J. S. Choe, H. J. Park and S. P. Hong. 1998. Physicochemical properties of traditional *chonggugjang* produced in different regions. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**, 377-384.
5. Choe, J. S., J. S. Kim, S. M. Yoo, H. J. Park, T. Y. Kim, C. M. Chang and S. Y. Shin. 1966. Survey on preparation method and consumer response of *chungkukjang*. *Korea Soybean Digest* **13**, 29-43.
6. Choi; U. K., D. H. Son, W. D. Ji, M. H. Im, J. D. Choi and Y. G. Chung. 1998. Changes of test components and palatability during *chunggugjang* fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 840-845.
7. Chung, C. Y. and M. Toyomizu. 1968. Studies on discoloration of fish products. V. Mechanism of rusting in amino acid - reducing sugar - lipid system. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **4**, 857-863.
8. Joo, O. S., K. I. Seo, Y. S. Lee, J. H. Lee, S. D. Choi and K. H. Shim. 1996. Changes in contents of some taste compounds of dried mussel and bady clam during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 882-888.
9. Kang, J. H. and H. S. Lee. 1994. Changes in lipid component and quantitative measurement of carbonyl compound during *doenjang* fermentation. *Korean J. Soc. Food Sci.* **10**, 51-57.
10. Park, S. K., K. I. Seo, M. Y. Shon, J. S. Moon and Y. H. Lee. 2000. Quality characteristics of home-made *doenjang*, a traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Sci.* **16**, 121-127.
11. Pratt, D. E. and P. M. Birac. 1979. Sources of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* **44**, 1720-1727.
12. Record, I. R., I. E. Dreosti and J. K. McInerney. 1995. The antioxidant activity of genistein *in vitro*. *J. Nutr. Biochem.* **6**, 481-487.
13. Seok, Y. R., Y. H. Kim, S. Kim, H. S. Woo, T. W. Kim, S. H. Lee and C. Choi. 1994. Change of protein and amino acid composition during *chungkookjang* fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *J. Agric. Chem. Biotechnol.* **37**, 65-71.
14. Shon, M. Y. 1999. Physicochemical properties and biological activities of *chungkugjang* produced from Korean black bean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Gyeongsang National University. Ph.D. Thesis*.
15. Shon, M. Y., K. I. Seo, S. W. Lee, S. H. Choi and N. J. Sung. 2000. Biological activities of *chungkugjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 936-941.
16. Suh, J. S., S. G. Lee and M. K. Ryu. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the *chungkookjang* processing II. Changes of the components and enzyme activities during the storage of *chungkookjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**, 309-314.

(Received August 24, 2001; Accepted October 30, 2001)