

청국장으로부터 면역증강활성이 우수한 *Bacillus pumilus* JB-1의 분리 및 분리균의 청국장 발효특성

권하영 · 김영숙 · 권기석¹ · 권정숙 · 손호용*
안동대학교 식품영양학과, ¹안동대학교 생명자원과학부

Isolation of Immuno-stimulating Strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and Fermentational Characteristics of JB-1. Kwon, Ha-Young, Young-Sook Kim, Gi-Seok Kwon¹, Chong-Suk Kwon and Ho-Yong Sohn*. Dept. of Food and Nutrition Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹The School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea - To produce functional and high nutritional chungkook-jang, an immuno-stimulating and rapid growing bacterium was isolated from one of Korean traditional food, chungkook-jang. The isolated bacterium was identified as *Bacillus pumilus* and deposited in Korean Collection for Type Culture (KCTC 10461BP). The chungkook-jang fermented by JB-1 has good taste and pleasant smell with high content of free amino acids, and the water extract of chungkook-jang showed 410% of immuno-stimulation activity at concentration of 2 mg/ml. The rapid fermentation in 16 h is achieved by inoculation of 20 ml culture broth of JB-1 into 6 kg cooked soybean in commercial scale at 40°C.

Key words: *Bacillus pumilus*, Chungkook-jang, immuno-stimulating activity, rapid fermentation

청국장은 된장, 간장 등과 더불어 한국인에게 매우 중요한 대두 발효식품으로, 전통 대두 발효식품류 중 가장 단기간에 제조 가능하며, 영양적, 경제적으로 가장 효과적인 콩의 섭취방법으로 인정되고 있다[14, 18]. 그러나 식생활의 서구화와 자가 제조의 어려움, 청국장 특유의 냄새, 낮은 저장성으로 인해 생산의 어려움 및 소비자의 거부현상이 증대되고 있는 실정이다[2]. 최근, 단백질 및 지방의 공급과 같은 청국장의 영양적 측면 이외에도 γ -glutamyltranspeptidase, isoflavone, saponin, 올리고당 등이 청국장에 다량 함유되어 있음이 규명되어 청국장의 혈전 용해능, 면역기능 강화, 항산화효과, phytoestrogen 효과 등에[4, 5, 10] 관심이 증대되고 있으며, 이에 따른 청국장의 대량 생산 및 기능성, 관능성 증대개선에 따른 소비 증대에 많은 연구가 이루어지고 있다[7, 12, 19, 20]. 또한 최근에는 썩, 허브류, 홍국분말, 상 황버섯, 동충하초 등을 포함하는 고기능성 건강 발효식품으로서의 연구도 매우 활발하게 진행되고 있다[6, 8].

현재 제조되고 있는 청국장은 메주콩을 미지근한 물에 12 시간 이상 불린 다음, 물빼기 후 2~3 시간 증자하고, 증자액을 제거하고 증자 대두에 자연발효, 또는 볶짚을 가하여 볶짚 유래의 미생물, 특히 *Bacillus subtilis*에 의해 40°C에서 2~3 일간 발효시켜 만든다. 이때 미생물 유래의 효소에 의해 그 특유한 맛과 향기가 생성되며, 원료 콩의 당질과 단백

질에서 유래된 레반형 프락탄과 폴리글루타메이트의 혼합물 질인 점질물질이 다량 생성되어 높은 점도를 가지게 된다 [16]. 자연발효 또는 볶짚을 가하여 발효시키는, 재래식 청국장 제조의 경우 비위생적이고 재현성도 좋지 않으며, 균일한 품질을 지닌 청국장을 제조할 수 없을 뿐만 아니라 저장성 또한 나빠 보존 및 유통의 어려움을 가지게 된다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 저이취, 고기능성 청국장 제조를 위한 균주 개발이 필요하며, 특히 대량생산을 위한 균주스타트의 개발이 절실하다.

최근까지 개발, 보고된 청국장 발효용 균주로는 *Bacillus licheniformis* B1, *B. subtilis* CHO-99, *Bacillus* sp. CS-17[3] 및 *B. subtilis* K-20[11] 균주 등으로 주로 저이취와 관능성 향상에 중점을 두고 있다.

따라서 본 연구에서는 청국장의 면역증강활성 증대, 속성 발효를 통한 생산성 증대와 함께 품질 균일화를 위해, 면역증강활성이 우수한 청국장 발효균주를 분리하고, 이를 증자 대두에 접종하여 속성 발효시켜, 관능성, 영양성, 면역증강활성이 증대된 기능성 청국장을 제조하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

균주 분리를 위한 균원 시료로는 경북지역에서 재래식으로 제조된 다양한 청국장을 사용하였다. 청국장 1 g을 멸균 증류수로 현탁하고 80°C에서 10분간 열처리한 후, LB 고체 배지(Difco Co.)에 도말하고 30°C에서 48 시간 배양하여 생

*Corresponding author
Tel: 82-54-820-5491, Fax: 82-54-820-5491
E-mail: hysohn@andong.ac.kr

육이 우수한 콜로니를 순수 분리하였다. 각각의 분리균주는 LB 배지 및 증자대두에 접종하여, 저이취의 균주를 선별하고, 이후 균학적, 형태학적 차이에 따라 2차 선별하였으며, 면역증강활성 측정에 따라, 생육이 우수하면서, 저이취, 면역증강활성을 가진 균주를 최종선별 하였다. 면역증강활성 분석을 위한 대조군으로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1914, *Lactobacillus casei* KCTC 3189, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0233 및 *S. cerevisiae* KCTC 1199를 사용하였다.

균주의 동정

최종 선별된 JB-1 균주는 Biolog test(GP2 Microplate, Biolog, CA, USA)를 이용한 95개의 탄소원에 대한 이용성과, 세포막 지방산 조성분석-MIDI 실험(Gas chromatography HP 5890, USA) 및 Bergey's manual 상에 준하여 동정하였다[1]. 지방산 분석의 경우에는 집균세포 50 mg을 50% 메탄올과 15% NaOH를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하여 용해시키고, 유리된 지방산은 methyl ester를 형성 후, 이를 추출하여 세척한 후 이용하였다.

증자 대두의 조제, 청국장 발효 및 분석

20 kg의 대두를 물 20리터를 가하여 90분간 100°C에서 증자한 후, 증자액을 제거한 후, 다시 10리터의 물을 가하여 1시간 증자하고 증자액을 제거하였다. 이 경우, 증자 콩의 무게는 38-40 kg으로 증가되었다. 증자된 대두 콩은 6 kg씩 준비된 발효판(100 cm × 60 cm × 10 cm)에 분주하고 40°C로 냉각한 후, LB 배지에서 12시간 전배양한 선별 균주 배양액 20 ml를 분무하였다. 이때 대조구로는 LB 배지에서 전배양한 *B. subtilis*를 이용하였으며, 한편 재래식 제조공장에서 사용하는 자연발효 방법도 비교하였다. 이를 동안 42-45°C의 발효실에서 발효시키면서, 청국장 시료를 경시적으로 회수하여 균체 생육도, 점도, 환원당 및 단백질 함량을 조사하였다. 균체 생육도는 발효대두 30 g씩을 취하여, 물 50 ml를 가하여 균체와 집질물을 유리시킨 후, 적당히 희석하여 LB 고체배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 한편 얻어진 상등액 5 ml를 Oswart 점도계에 넣고, 유출시간을 측정하여 점도를 측정하였으며, 이때 대조구로는 증류수를 사용하였다. 발효에 따른 점도 변화는 시료 상등액의 유출시간을 증류수의 유출시간으로 나눈 값으로 나타내었다. 청국장 시료의 환원당은 DNS 변법[13]을 사용하여 정량하였다. 유리아미노산은 아미노산 자동분석기(Biochrom 30, Peek column, UK)를 사용하여 측정하였다.

청국장 발효분말 조제

시판 청국장 및 JB-1 균주를 이용해 제조한 청국장을 각각 분쇄기로 분쇄한 후 동결건조기(Samwon Freeze Dry System, SFDSF24, Samwon Co. Korea)로 72시간 건조시켜 분쇄하여 30-50 mesh의 청국장 분말을 조제하고, 무게의

10배 중량의 증류수를 첨가한 후 50°C에서 2시간 교반하여 추출한 후 원심분리(8000 rpm, 30분)하여 얻은 상등액을 다시 동결건조, 분쇄하여 제조하였다.

면역증강활성 측정

면역증강활성은 Mishell 등의 방법[17]을 사용하였다. 먼저 마우스 비장세포를 유리한 다음 용해완충액(Tris-buffered ammonium chloride 0.87%, pH 7.2)으로 적혈구를 제거하고, 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유한 DMEM 배양액으로 5×10^5 cells/ml가 되도록 세포수를 조절하였다. 이를 96-well plate에 well당 90 μ l의 세포와 다양한 농도로 희석한 청국장 분말의 물 추출물 시료 용액 10 μ l를 혼합한 후, 96-well plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 MTT 용액(1 mg/ml) 50 μ l를 첨가하고 4시간 더 배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거한 후 DMSO 150 μ l를 가하고 5분간 방치한 후 Microplate Reader(Asys Hitec, Expert96, Asys Co. Austria)를 이용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장세포의 증식율은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{증식율 (\%)} = (\text{시료 흡광도} / \text{대조구 흡광도}) \times 100.$$

결과 및 고찰

청국장 발효균주의 분리 및 동정

경북지역의 재래식으로 조제된 청국장 8종으로부터 호기성, 포자형성 세균들을 분리하였다. 자가 제조된 청국장은

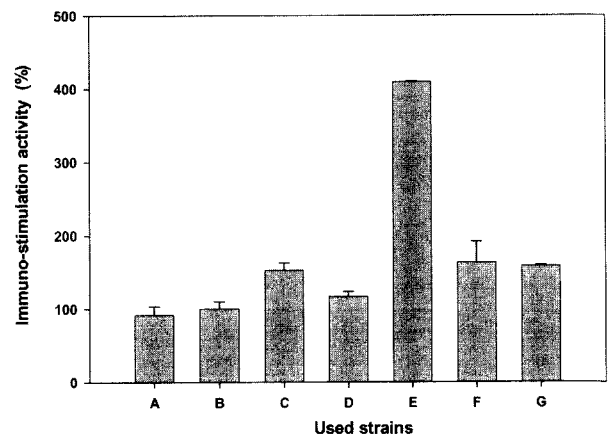


Fig. 1. Immuno-stimulation activity of the water extract of fermented soybean (chungkook-jang). The activity was evaluated by MTT method described in materials and methods, and the final concentration of water extract was adjusted to 2 mg/ml. Fermentation was conducted at 250 ml T-box (Toylab, Inc, Korea) containing 50 g cooked soybean at 40°C for 2 days with different microorganisms. Symbols; A, uninoculated; B, *Lactobacillus casei*; C, *Bacillus subtilis*; D, *Saccharomyces cerevisiae*; E, isolated strain JB-1; F, isolated strain JB-2; and G, isolated strain JB-3.

Table 1. Characteristics of the isolated strain, *Bacillus pumilus* JB-1.

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Morphological characterization		Physiological characterization	
Shape	rod	Catalase	+
Gram stain	+	VP-test	+
Mobility	+	Starch hydrolysis	+
Spore formation	+	Casein hydrolysis	+
		Growth at 45oC	+
Carbohydrate degradation		α -D-lactose	-
α -Cyclodextrin	-	Lactulose	-
β -Cyclodextrin	-	maltose	-
Dextrin	-	Maltotriose	-
Glycogen	-	D-Mannitol	+
Inulin	-	D-Mannose	+
Mannan	-	D-Melezitose	-
Tween40	-	D-Melibiose	-
Tween80	-	α -Methyl-D-Galactoside	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	β -Methyl-D-Galactoside	-
N-Acetyl-D-Mannosamine	-	3-Methyl Glucose	+
Amygdalin	-	α -Methyl-D-Glucoside	-
L-Arabinose	-	β -Methyl-D-Glucoside	+
D-Arabitol	-	α -Methyl-D-Mannoside	-
Arbutin	+	Palatinose	-
D-cellobiose	+	D-Psicose	+
D-Fructose	+	D-Raffinose	-
L-Fucose	-	L-Rhamnose	-
D-Galactose	-	D-Ribose	+
D-galacturonic Acid	-	Salisin	+
Gentiobiose	+	Sedoheptulosan	-
D-Gluconic Acid	-	D-Sorbitol	-
α -D-glucose	+	Stachyose	-
m-Inositol	-	Sucrose	+
D-Tagatose	+	L-Alaninamide	-
D-Trehalose	+	D-Alanine	-
Turanose	-	L-Alanine	-
Xylitol	-	L-Alanyl-glycine	-
D-Xylose	-	L-Asparagine	+
Acetic Acid	-	L-Glutamic Acid	-
α -Hydroxy Butyric Acid	-	Glycyl-L-Glutamic Acid	-
β -Hydroxy Butyric Acid	-	L-pyroglutamic Acid	-
δ -Hydroxy Butyric Acid	-	L-serin	-
p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	-	Putrescine	-
α -Keto Glutaric Acid	-	2,3-Butanediol	-
α -Keto Valeric Acid	-	Glycerol	+
Lactamide	-	Adenosine	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	2'-Deoxy Adenosine	-
L-Lactic Acid	-	Inosine	+
D-Malic Acid	-	Thymidine	+
L-Malic Acid	+	Uridine	+
Methyl Pyruvate	-	Adenosine-5'-Monophosphate	-
Mono-methyl Succinate	-	thymidine-5'-Monophosphate	-
Propionic Acid	-	Uridine-5'-Monophosphate	-
Pyruvic Acid	-	Fructose-6-phosphate	-
Succinamic Acid	-	Glucose-1-phosphate	-
Succinic Acid	-	Glucose-6-phosphate	-
N-Acetyl-L-Glutamic Acid	-	D-L- α -Glycerol Phosphate	-

(+: positive, -: negative).

pH 6.5~8.0, 수분함량 45~50%, 생균수 $1.2\sim6.2\times 10^8$ cfu/g으로 다양하게 나타났으며, 포자형성 바실러스 속 균주 이외의 효모, 곰팡이 등도 확인되었다. 열처리를 거쳐 순수 분리된 세균 콜로니 약 20여 종류는 각각 LB 배지 및 증자 대두에 접종하여 3일간 발효시킨 후, 불쾌취 및 식감을 평가하고, 균학적, 형태학적 차이에 따라 JB-1, JB-2, JB-3의 3 균주를 2차 선별하였다(results not shown). 이들 3 균주는 불쾌취가 미약하고, 발효종의 식감이 우수하여, 다시 증자대두에 접종하여 2일간 40°C에서 발효시킨 후, 각각 제조된 청국장 물 추출물을 이용하여 면역증강활성을 평가하였다. 그 결과, JB-1균주는 2 mg/ml의 농도에서 약 410%의 마우스 비장세포 증식율을 나타내었다. 이는 비접종 증자대두의 $91\pm 11\%$ 면역세포 증식율이나, JB-2, JB-3 균주 및 *B. subtilis* 발효의 150~190% 면역세포 증식율보다 월등히 우수하였으며, *L. casei* 또는 *S. cerevisiae*를 이용한 발효의 경우에는 균체 증식율도 낮았으며, 면역세포 증식율은 90~116%로 변화가 없었다(Fig. 1).

최종 선별된 JB-1 균주는 그림 양성의 간균으로 운동성이 있으며, 내열성의 포자를 형성하였으며, catalase test, V-P test, starch hydrolysis, casein hydrolysis 양성이며, 45°C의 온도에서도 생육이 활발하여 전형적인 *Bacillus* 속으로 판정되었으며, 95개 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과(Table 1), *Bacillus pumilus*로 나타났다. 또한 세포막 지방산 분석 결과 역시, C_{15:0} iso-fatty acid 39.7%, C_{15:0} anteiso-fatty acid 23.35%, C_{17:0} iso-fatty acid 13.43%, C_{17:0} anteiso-fatty acid 6.22% 등으로 나타나, JB-1 균주는 *Bacillus pumilus*로 확인되었다(results not shown). 따라서 최종 선별 균주는 *Bacillus pumilus* JB-1으로 명명하였으며, 이는 *Bacillus pumilus* KCTC 10461BP로 균주기탁 되었다.

선별균주를 이용한 청국장 속성발효

최종 선별된 *B. pumilus* JB-1의 전배양액 20 ml를 6 kg의 증자대두에 접종하여, 실제 산업현장에서 산업적 규모의 청국장 발효 특성을 검토하였다(Fig. 2). 접종직후 세포 농도는 5×10^7 CFU/g이었으며, 42~44°C에서 4시간 발효 후 세포 농도는 1×10^9 CFU/g으로 증가되었으며, 16시간 발효한 경우 1×10^{10} CFU/g으로 증대되어 최대값을 나타내었다. 이후 생균수는 8.8×10^9 CFU/g으로 약간 감소하였다. 대조군으로 사용된 *B. subtilis*의 경우, 16시간 발효시까지 세포 증식은 유사하게 나타났으나, 27시간 발효시의 생균수는 6.8×10^9 CFU/g으로 감소되었다. 반면, 산업현장에서 부가적인 균의 접종없이 자연 발효시킨 경우, 지속적으로 생균수의 증가가 나타났으며, 27시간 발효시 5.7×10^9 CFU/g까지 증가하였다. 그러나 이러한 균수의 증가는 인위적으로 특정균주를 접종한 경우의 8 시간 발효시 나타나는 균수에 상당하였다(Fig. 2a). 발효중의 점질물 생성에 따른 점도 변화 면에서는 JB-1 균주로 발효시킨 경우 8 시간 발효까지 급격한 점성증가

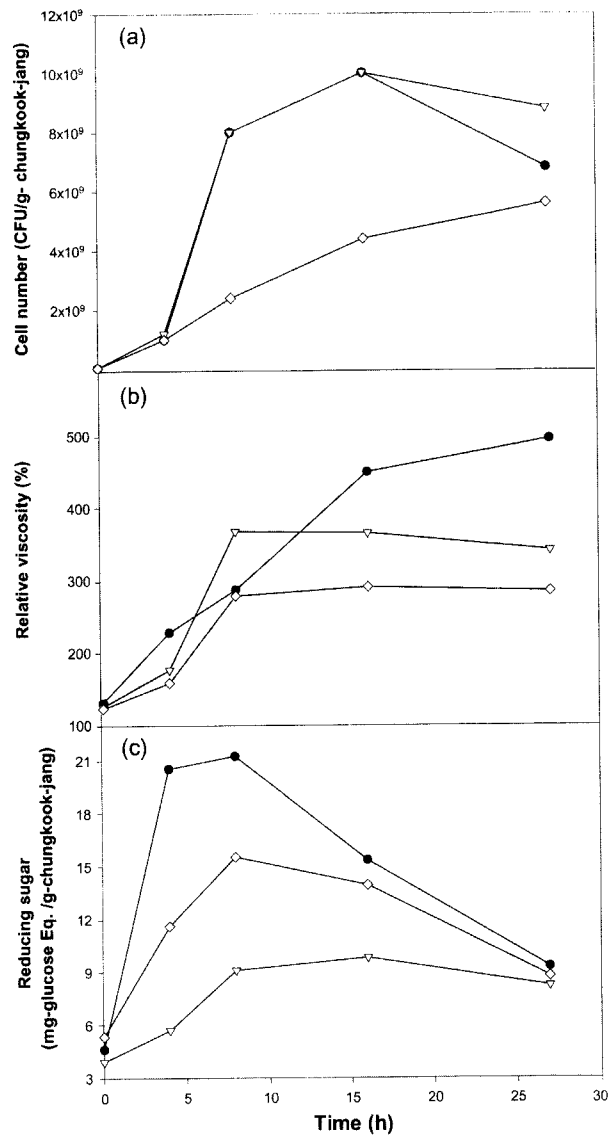


Fig. 2. The changes of (a) viable cell number, (b) relative viscosity, and (c) reducing sugar content during large scale fermentation of chungkook-jang using *B. pumilus* JB-1 (▽), *B. subtilis* (●) or natural fermentation in pilot scale without additional inoculation (◇).

가 나타났으나, 이후 더 이상의 증가가 나타나지 않았으며, 이러한 현상은 자연발효 경우에서도 유사하였다. 반면, *B. subtilis*의 경우에는 발효 종료까지 지속적인 점도 증가가 나타났으나, 특이한 불쾌취도 증대되어 기호성이 심각하게 저하되었다(Fig. 2b). 발효 중 환원당 농도의 변화를 조사한 결과, JB-1의 경우 초기 8 시간까지 환원당의 증가가 나타난 후 8.5 mg-glucose eq./g-청국장을 유지하였으나, *B. subtilis*를 접종한 경우 초기 8 시간동안 급격한 증가를 나타내었으며(21.2 mg-glucose eq./g), 이후 빠르게 감소하였다. 자연발효의 경우에는 JB-1과 *B. subtilis*를 접종한 경우의 중간형태

요 약

Table 2. The content of free amino acids of chungkook-jang fermented by *Bacillus pumilus* JB-1, *B. subtilis*, or natural fermentation. unit (mg/100 mg chungkook-jang)

Amino acids	Chungkook-jang (<i>B. pumilus</i> JB-1)	Chungkook-jang (Natural fermentation)	Chungkook-jang (<i>B. subtilis</i>)
Lys	1.29	0.72	2.58
His	1.49	0.56	1.91
Arg	5.97	0.71	2.18
Asp	0.19	1.26	4.26
Thr	0.57	0.24	0.67
Ser	0.76	0.56	2.14
Glu	9.61	3.12	7.74
Pro	0.65	0.51	2.09
Gly	0.33	0.63	1.66
Ala	1.37	0.61	2.34
Val	1.99	0.71	1.83
Met	0.57	0.09	0.97
Ile	0.39	0.62	1.65
Leu	0.79	0.71	3.33
Tyr	2.79	0.51	1.97
Phe	3.19	0.71	2.54
Trp	2.33	0.09	0.71
Cys	ND	0.11	ND
Total	34.27	12.47	40.57

ND: Not detected.

를 나타내었다(Fig. 2c). 이러한 급격한 환원당의 생성 및 소비는 강력한 당 분해효소와 빠른 호기적 대사를 의미하며 이러한 균학적, 대사학적 특성들이 청국장의 관능성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

각각 제조된 청국장에서 영양성과 관능성에 영향을 미치는 유리아미노산 함량을 비교하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 JB-1으로 발효시킨 경우 유리아미노산 함량은 *B. subtilis*로 발효시킨 경우보다는 다소 낮으나, 기존의 자연 발효에 비해 약 2.7배 이상의 높은 유리아미노산 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 순수 균주로 발효시킨 경우, 자연발효에 의한 경우보다 유리아미노산 함량이 현저히 증가된다는 기존의 보고와 유사하였다[9, 15]. 그러나 본 실험에 사용된 *B. subtilis*는 발효시의 강한 전분질, 단백질 분해활성과 유리아미노산 함량의 급격한 증가에도 불구하고 특유의 불쾌취에 의한 관능성 감소와 낮은 면역증강 활성으로 산업용 발효균주로 적합하지 않다고 판단되었다. 본 실험결과는 면역증강능이 우수한 *B. pumilus* JB-1를 인공 접종하여 청국장을 제조할 경우, 8~16 시간 이내에 면역증강 활성이 우수하면서, 영양성 및 관능성이 우수한 청국장을 속성 제조할 수 있음을 나타내었다. 앞으로 상업적 규모에서의 균주 생산, 최적 발효조건 검토 및 균주 제제화 연구가 필요하다.

고품질, 기능성 청국장 제조를 위한 균주 개발 연구의 일환으로, 재래식 청국장으로부터 생육이 빠르며, 면역증강 활성이 우수한 JB-1 균주를 분리하였다. 동정결과, JB-1 균주는 *Bacillus pumilus*로 확인되었으며 *Bacillus pumilus* KCTC 10461BP로 균주기탁 되었다. JB-1으로 발효시킨 청국장은 관능성과 영양성이 우수하며 물추출물 2 mg/ml 의 농도에서 410% 정도의 면역세포 증식율을 나타내었으며, 산업적 규모의 6 kg의 대두증자에 20 ml 배양액을 접종함으로써 16 시간 이내에 저이취와 높은 생균수 및 아미노산 함량의 청국장 제조가 가능함을 확인하였다.

REFERENCES

- Bulter, S. P. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, p. 1104-1133. 2nd ed. vol 2, Springer-Verlag. New York, Berlin Heidelberg.
- Choe, J. S., J. S. Kim, S. M. Yoo, H. J. Park, T. Y. Kim, C. M. Chang, and S. Y. Shin. 1996. Survey on preparation method and consumer response of *Chung-Kuk-Jang*. *Kor. J. Soybean Res.* **13**: 29-43.
- Choi, U. K., S. I. Lee, D. H. Son and W. D. Ji. 2002. Change of Flavor during *Chunggugjang* Fermentation by *Bacillus sp.* CS-17. *J. Kor. Soc. Hygienic Sciences.* **8**: 167-173.
- Chung, K. S., K. D. Yoon, S. S. Hong, and D. J. Kwon. 1996. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of korean fermented soybean products. *J. Food. Sci. Technol.* **1**: 75-85.
- Heo, S., S. K. Lee, and H. K. Joo. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional chungkookjang. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**: 119-124.
- Joo, H. K. and S. E. Yun. 1997. Improvement on flavor and taste of *Chungkookjang* by freeze denaturation of soybean. *Daesan Nonchong* **5**: 161-174.
- Kim, J. I., M. J. Kang, and T. W. Kwon. 2003. Antidiabetic Effect of Soybean and *Chongkukjang*. *Kor. Soybena Digest.* **20**: 44-52.
- Kim, J. S. 1996. Current research trends on bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest.* **13**: 17-24.
- Kim, J. S., S. M. Yoo, J. S. Choe, H. J. Park, S. P. Hong, and C. M. Chang. Physicochemical Properties of Traditional Chonggugjang Produced in Different Regions. *Agri. Chem. Biotech.* **41**: 337-383.
- Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. OH, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strains CK11-4 screened from chungkook-jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482-2488.
- Kim, Y. S., H. J. Jung, Y. S. Park, and T. S. Yu. 2003. Characteristics of Flavor and Functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chunggukjang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**: 475-478.
- Lee, B. Y., D. M. Kim, and K. H. Kim. 1991. Physico-Chem-

- ical Properties of Viscous Substance Extracted from *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**: 500-604.
13. Lee B. Y., D. M. Kim, and K. H. Kim. 1991. Studies on the Change in Rheological Properties of *Chungkook-jang*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**: 478-484.
 14. Lee, H. C. 1999. Fermentation food. pp. 105-117. SinKwang Press Co. Seoul. Korea.
 15. Lee, H. C. and J. S. Suh. 1981. Effect of *Bacillus* strains on the Chungkook-jang processing(I). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**: 97-104.
 16. Lee, Y. L., S. H. Kim., N. H. Choung, and M. H. Yim. 1992. A study on the production of viscous substance during *Chungkookjang* fermentation. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **35**: 202-209.
 17. Mishell, B. B. and S. M. Shiigi. 1980. Selected methods in cellular immunology. pp. 4-27. 1st ed. San Francisco, WH Freeman and Co. U.S.A.
 18. Yoo, J. Y. 1997. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. *The Microorganism and Industry* **23**: 13-30.
 19. Youn, K. C., D. H. Kim, J. O. Kim, B. J. Park, H. S. Yook, J. M. Cho, and M. W. Byun. 2002. Quality Characteristics of the Chungkookjang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 204-210.
 20. Yang J. L., S. H. Lee and Y. S. Song. 2003. Improving Effect of Powders of Cooked Soybean and *Chongkukjnag* on Blood Pressure and Lipid Metabolism in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 899-905.

(Received Sep. 21, 2004/Accepted Nov. 23, 2004)