

## 대두 열수 침출액을 이용한 청국장 발효균주 *Bacillus pumilus* JB-1의 배양 최적화

권하영 · 류희영 · 권정숙 · 이상한<sup>1</sup> · 손호용\*  
안동대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>경북대학교 식품공학과

**Optimization of Culture Conditions of *Bacillus pumilus* JB-1 for Chungkook-jang Fermentation in Soybean Boiling-Waste Liquor Medium.** Kwon, Ha-Young, Hee-Young Ryu, Chong-Suk Kwon, Sang Han Lee<sup>1</sup>, and Ho-Yong Sohn\*. Department of Food and Nutrition Andong National University, Andong 760-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – Soybean is useful source of protein, especially in Asia. But soybean needs heat inactivation or fermentation process before consumption, since it contains the toxic lectin and various protease inhibitors. Therefore, production of soybean boiling-waste liquor (SBWL) as a byproduct is inevitable. In this study, the chemical composition of SBWL and the optimization of culture conditions for *Bacillus pumilus* JB-1, a selected strain for functional chungkook-jang fermentation, using SBWL were investigated. The SBWL contains 88% water, 9.5% free sugar, 1.6% crude protein, 0.3% crude fat, 0.1% crude fiber and 2.1% ash, respectively. The contents of total polyphenol, total flavonoids and free amino acid in SBWL were 55%, 76%, and 30% of those of raw soybean, respectively. Culture conditions for *B. pumilus* JB-1 in SBWL were optimized. The 1/10-diluted, 0.1% of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> added SBWL without pH adjustment and carbon source addition was cultured at 37°C for 48 h with agitation (120 rpm). The 0.5% of inoculation was enough. The large scale fermentation in 5-L jar fermentor showed that the SBWL is a good resource for production of chungkook-jang starter and functional ingredients.

**Key words:** *Bacillus pumilus*, chungkook-jang, soybean boiling-waste liquor

### 서 론

대두는 전통 발효식품인 간장, 고추장, 된장, 청국장 제조의 기본원료이며, 두부, 콩우유 등의 다양한 식품의 원료로도 이용되고 있다. 대두의 조단백질 함량은 대두 건조분말의 20~45%에 달해[15, 26], 과거에는 대두가 주요 단백질 공급원으로서 연구되었으나, 현재에는 식생활의 질적 수준 향상으로 인해 단백질 부족현상이 감소하면서 오히려 대두의 다양한 유용 생리활성에 연구가 집중되고 있다. 최근에는 isoflavone을 포함하는 대두 유래의 물질들이 항암, 항지혈, 항산화 효과를 나타내어 심혈관계 질환 및 골다공증에 효과적임이 보고되면서, 대두의 소비가 빠르게 증가되고 있는 실정이다[4, 9, 10, 12, 23]. 그러나 대두에는 lectin과 같은 phytohemagglutinin 및 kunitz trypsin inhibitor, bowmanbirk inhibitor 등의 소화 효소 저해제를 포함하고 있어[5, 8, 14, 17, 24], 생 대두의 섭취는 설사, 영양분의 흡수저해, 체중감소, 성장억제 등 동물에게 농도 의존적 독성을 나타낸

다[6, 14, 17]. 따라서 대두는 가열처리 또는 발효과정을 거쳐 유해성분을 제거한 가공식품으로 제조 유통되며, 이러한 열처리 공정은 증자 대두(steamed soybean)와, 그 부산물로서 대두 열수 침출액(Soybean Boiling-Waste liquor)을 발생하게 한다. 현재 부산물로 생성되는 대두 열수 침출액은 유방암 세포의 성장 억제효과 및 지질 대사 개선활성을 나타낸다고 보고[19, 22]되어 있으나, 간장 제조시에 메주에 첨가하는 용도[3, 4], 또는 청국장 제조시에 콩을 삶고 남은 열수 침출액의 일부를 첨가하는 용도[16] 이외에는 거의 사용되지 못하고 폐기되는 실정이다.

한편 대두 발효식품 중 청국장은 증자 대두에 *Bacillus* sp. 균주들을 이용하여 발효시켜 제조하며, 전통 대두 발효식품류 중 가장 단기간에 제조 가능하고, 영양적, 경제적으로 가장 효과적인 콩의 섭취방법으로 인정되고 있다[25], 또한 청국장에는  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase, isoflavone, saponin, 올리고당 등에 의한 혈전 용해능, 면역기능 강화, 항산화효과, phytoestrogen 효과[4, 7, 10, 20] 등이 잘 알려져 있으며, 이에 따라 청국장의 대량 생산 및 기능성, 관능성이 강화된 청국장 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다[11, 23, 27]. 그러나, 현재의 자연발효 또는 볶짚을 가하여 발효시키는 재래식 청국장 제조의 경우, 비위생적이고 재현성도 좋지 않음

\*Corresponding author

Tel: 82-54-820-5491, Fax: 82-54-820-5491

E-mail: hysohn@andong.ac.kr

며, 균일한 품질을 지닌 청국장을 제조할 수 없을 뿐만 아니라 저장성 또한 나빠 보존 및 유통의 어려움이 있다. 이에 본 저자들은 청국장 특유의 불쾌취가 거의 없으면서, 강력한 면역증강 활성을 나타내는 *Bacillus pumilus* JB-1 균주를 보고하였으며, 확보 균주를 이용하여 상업적 규모에서 기능성 청국장 제조가 가능함을 확인한 바 있다[13].

본 연구에서는, 상당량의 영양성분과 생리활성물질을 함유하리라 예상되는 대두 열수 침출액을 *B. pumilus* JB-1 균주의 대량생산을 위한 배지로 사용하고자, 대두 열수 침출액의 성분을 검토하고, 이에 따른 배지 최적화 및 최적 배양 조건을 검토하였다. 이러한 대두 열수 침출액의 효율적인 이용은 환경오염을 저감하는 한편 대두의 유용 생리활성물질 및 영양성분의 손실을 최소화 할 수 있다고 판단된다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, 배지 및 대두

청국장 발효 및 대두 열수 침출액의 발효균주로는 저이취와 면역증강 활성이 우수한 *B. pumilus* JB-1[13]를 사용하였으며, Nutrient agar(Difco Co., USA) 배지에서 보존하며 4주마다 계대하였다. 대두는 경북 안동에서 구입한 국내산 대두를 사용하였다.

### 대두 증자 및 대두 열수 침출액의 조제

대두 증자는 통상의 청국장 제조업체에서 행하는 방식을 이용하였다. 경북 안동의 청국장 제조업체에서 대두를 증자하였으며, 대두 20 kg에 물 20리터를 가하여 90분간 100°C에서 증자한 후, 1차 열수 증자액 6리터를 회수하였다. 이후, 다시 10리터의 물을 가하여 1시간 더 증자하고 2차 증자액 4리터를 회수하였으며, 각각의 증자액을 합하여 이를 대두 열수 침출액으로 사용하였다. 증자과정을 통해, 대두 증자공의 무게는 38~40 kg으로 증가되었으며, 대두 열수 침출액은 적당한 농도로 희석하여 성분검사 하였으며, 발효용 배지로 이용하였다.

### 대두 열수 침출액을 이용한 배지 및 배양조건 최적화

회수된 대두 열수 침출액은 갈색의 높은 점도를 가진 액상으로, 멸균 증류수로 1/10 농도로 희석한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 이를 기본배지로 사용하였다. 기본배지 100 ml를 포함하는 250 ml 플라스크에 *B. pumilus* JB-1 균주를 접종하고, 여러 배양조건들을 변경하여 48시간 배양하여 균체 최적 생육조건을 검토하였다. 배양조건들 중 배양온도의 경우는, 30, 37, 43, 45°C 조건으로, 초기 pH 효과는 4, 6, 8, 10의 조건에서, 포도당 첨가효과는 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 및 3% 농도 범위에서, 질소원 첨가 효과는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0, 0.1, 0.2, 0.3, 및 0.4% 농도 범위, 교반효과는 60, 120, 240 rpm 조건에서, 초기 균주 접종량은 0.2, 0.5, 1.0, 2.0%의 조

건에서 각각 검토하여 최적 생육조건을 결정하였다. 이후 결정된 최적생육 조건하에서 5리터 Jar-fermentor(Mituwa Co., Japan, Working volume 3리터)를 이용하여 *B. pumilus* JB-1 균주의 대량 배양을 실시하였으며, 배양 중 정기적으로 배양액의 세포성장, pH 및 환원당 함량을 측정하였다.

### 일반분석

시료의 수분함량은 Halogen Moisture Analyzer(Mettler-Toledo, HG63-P, Switzerland)를 이용하여 A.O.A.C법에 준하여 측정하였으며, 단백질 분석은 마이크로 킬달 단백질 분석장비(Foss Tecator TM Digester Auto, Foss Kilted TM 2400, UK)를 이용하여 분석하였다. 또한 조섬유는 조섬유/식이섬유 분석기기(FOSS, Fibertec 2010/1023, UK)를 이용하였으며, 조지방, 회분 또한 A.O.A.C법에 준하여 분석하였다. pH 측정은 pH meter(Mettler Toledo, InLab 413, England)를 이용하여 측정하였다.

### 기타분석

유리아미노산 분석의 경우에는 Amino Acid Analyzer (Biochrom 30, Peek U-1631 column, UK, bed length 200 mm, diameter 4.6 mm, flow rate 20 ml/h)를 사용하여 측정하였다. 유리당 분석은 HPLC (High performance Liquid Chromatography: Shimadzu SCL-10A controller, Shimadzu LC-10AD pump와 ERC-7515A RI detector, column Aminex HPX-87P BioRad, USA)로 분석하였으며, column 온도 65°C, detector 온도 40°C, 3차 증류수 1 ml/min의 조건에서 수행한 후, SP4270 integrator(Spectra-Physics, USA)로 정량하였다. 환원당 측정은 DNS 변법[18, 21]을 사용하여 정량하였으며, 총당 함량은 Phenol-Sulfuric acid 방법[18, 21]으로 정량하였으며, sucrose를 표준물질로 사용하였다. Total polyphenol 함량 측정은 이미 보고한 Singleton 법의 변법으로, Total flavonoids 함량 측정은 Davis 방법을 이용하여 비색정량 하였다[18, 21]. 이때 각각 표준물질은 tannic acid 및 rutin(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다.

한편 발효액의 당 이용 패턴을 조사하기 위해 thin layer chromatography를 행하였으며, n-butanol:2-propanol:water:acetate:acetonitrile(7:5:4:10:2 v/v/v/v/v)의 혼합용액을 전개용매로 하여 전개 후, 10% 황산용액을 분무하여 분리당을 확인하였다. 이때 표준품으로는 xylooligosaccharide 및 glucose, sucrose를 spot당 5 µg 점적하였으며, 배양액의 경우에는 원심분리 후 상등액 5 µl를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 대두 열수 침출액의 성분 분석

대두 열수 침출액을 이용한 *B. pumilus* JB-1 균주 배양 가능성을 검토하기 위하여 제조된 침출액의 성분을 분석하

**Table 1. Comparison of pH and chemical compositions among raw soybean, steamed soybean and soybean boiling-waste liquor.**

Analysis	Raw soybean	Steamed soybean	*SBWL
pH	6.3±0.1	5.7±0.1	5.7±0.1
Water content (%)	13.9±1.5	48.6±1.3	88.3±2.9
Crude protein (%)	37.8±3.8	20.2±3.3	1.6±0.4
Crude fat (%)	18.0±3.2	5.2±0.7	0.3±0.1
Crude fiber(%)	4.7±2.5	8.9±0.3	0.1±0.02
Ash (%)	5.7±0.7	2.8±0.1	2.1±0.1
Total sugar (%)	11.6±0.3	27.2±2.2	9.5±0.7
Free sugar (%)	1.7±0.3	4.3±0.2	1.2±0.1
Total polyphenol (%)	2.90±0.1	0.54±0.2	1.61±0.3
Total flavonoids (%)	6.41±1.0	13.66±0.8	4.92±0.6

\*SBWL: Soybean boiling-waste liquor.

였다. 열수 침출액의 경우 상온에서 갈색의 고점성을 나타내어 미생물 배지로 부적당하였으며, 1/10 농도로 희석한 경우 물과 유사한 점도를 나타내었다. 분석의 대조구로는 증자하지 않은 생 대두와 증자 대두를 이용하였다(Table 1). 먼저 pH의 경우 증자에 의한 pH 감소가 나타났으며, 대두 pH가 6.3인 반면 증자 대두 및 열수 침출액 모두 5.7 정도의 pH를 보였다. 증자과정으로 인해 대두의 수분함량은 급격히 증가되어 약 48%를 나타내었고, 열수 침출액은 90% 정도의 수분함량이 가지고 있었다. 조단백질 및 조지방 함량은 증자하지 않은 생 대두에 비해 증자 대두 및 침출액에서 상당히 감소된 값을 나타내었으며, 특히 침출액에서는 1.6% 및 0.3% 함량을 나타내었다. 조섬유 함량의 경우에는 증자 대두에서 8.9%의 상대적으로 높은 함량을 보였으며, 열수 침출액은 매우 낮은 0.1%농도를 나타내었다. 회분의 경우 증자대두 및 침출액에서 유사하게 2.1~2.8% 함량을 나타내었다. 한편 침출액에서 총당 및 유리당이 각각 9.5% 및 1.2%를 나타내어 수용성 당 및 다당류가 주성분이며, total polyphenol 및 total flavonoid 함량도 생콩과 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 대두 열수 침출액이 수용성 올리고당 및 유리당을 풍부하게 함유하며, 항산화 및 다양한 생리 활성을 나타낼 것으로 추측된다.

발효를 위한 유리당의 종류를 분석한 결과, 상당량의 대두 올리고당과 sucrose(79.6 mg/ml), glucose(5.92 mg/ml), fructose(5.82 mg/ml) 및 galactose(0.36 mg/ml)가 검출되어, sucrose를 효율적으로 이용하는 것이 필요하다고 판단되었다. 한편 열수 침출액의 유리 아미노산을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 대두 열수 침출액의 유리아미노산은 lys, his, pro, 및 cys이 검출되지 않았으나 전반적으로 생 대두의 30%, 자연발효 시킨 시판 청국장 90% 수준의 높은 유리아미노산 함량을 나타내었다. 따라서 대두 열수 침출액은 영양적으로도 우수한 부산물임을 알 수 있었으며, 이를

**Table 2. Comparison of amino acids content among raw soybean, soybean boiling-waste liquor and commercial chungkook-jiang.**

Amino acid	Raw soybean	*SBWL	**Chungkook-jiang
Lys	5.84	-	0.62
His	1.46	-	0.40
Arg	2.32	4.55	0.76
Asp	4.36	1.34	1.36
Thr	0.64	0.12	0.55
Ser	2.31	0.21	0.59
Glu	6.48	1.29	2.16
Pro	2.11	-	0.55
Gly	1.52	0.16	0.56
Ala	2.01	0.59	0.67
Val	1.57	0.65	0.74
Met	0.64	0.12	0.10
Ile	1.46	0.11	0.63
Leu	2.79	0.10	1.03
Tyr	1.46	0.52	0.51
Phe	1.78	0.60	0.72
Try	1.74	0.52	-
Cys	-	-	0.11
Total	36.13	10.88	12.06

\*SBWL: Soybean boiling-waste liquor, \*\*Chungkook-jiang: Naturally fermented commercial Chungkook-jiang.

이용한 식품소재로의 적극적인 이용 검토도 필요하다고 판단된다.

#### 대두 열수 침출액을 이용한 *B. pumilus* JB-1 배양조건 의 최적화

1/10 농도로 희석된 대두 열수 침출액은 pH 5.7±0.1, 총당 농도 1%(환원당 0.12~0.15%)를 나타내어, 별도 조정없이 기본배지로 사용하였으며, 플라스크 배양을 통해 생육 최적조건 및 배지조성의 최적화를 시도하였다(Fig. 1). 먼저 균체 생육에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과, 37~43°C에서 우수한 생육을 나타내었으나, 40시간 이상의 배양 후기에는 37°C 배양이 더욱 우수하였다(Fig. 1a). 배양온도 37°C에서 초기 pH의 영향검토 결과, pH 4에서는 생육이 인정되지 않았으나, pH 6~10에서는 정상적인 생육이 나타나, 기본배지의 pH 조정은 불필요 하였다(Fig. 1b). 포도당 가당 효과 검토 결과, 3% 포도당 첨가를 제외하고는 0~2% 첨가시 유사한 생육을 나타내어 별도의 가당이 필요 없음을 확인하였다(Fig. 1c). 질소원 첨가의 경우에는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1~0.2%를 첨가했을 때 생육이 가장 유리함을 볼 수 있었다(Fig. 1d). 교반효과의 경우 교반속도가 증가할수록 생육속도는 증가하였으나, 최종적으로 120 rpm이상의 교반으로 충분함을 확인하였다(Fig. 1e). 접종량의 검토 결과, 전배양한 *B. pumilus* JB-1 0.5~2% 접종시 유사한 생육정도를 나타내어(Fig. 1f), 최종적으로 37°C, pH 무조정, 무가당, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1% 첨가, 120 rpm 교반조건에서 0.5% 접종하여 48시간 배양을

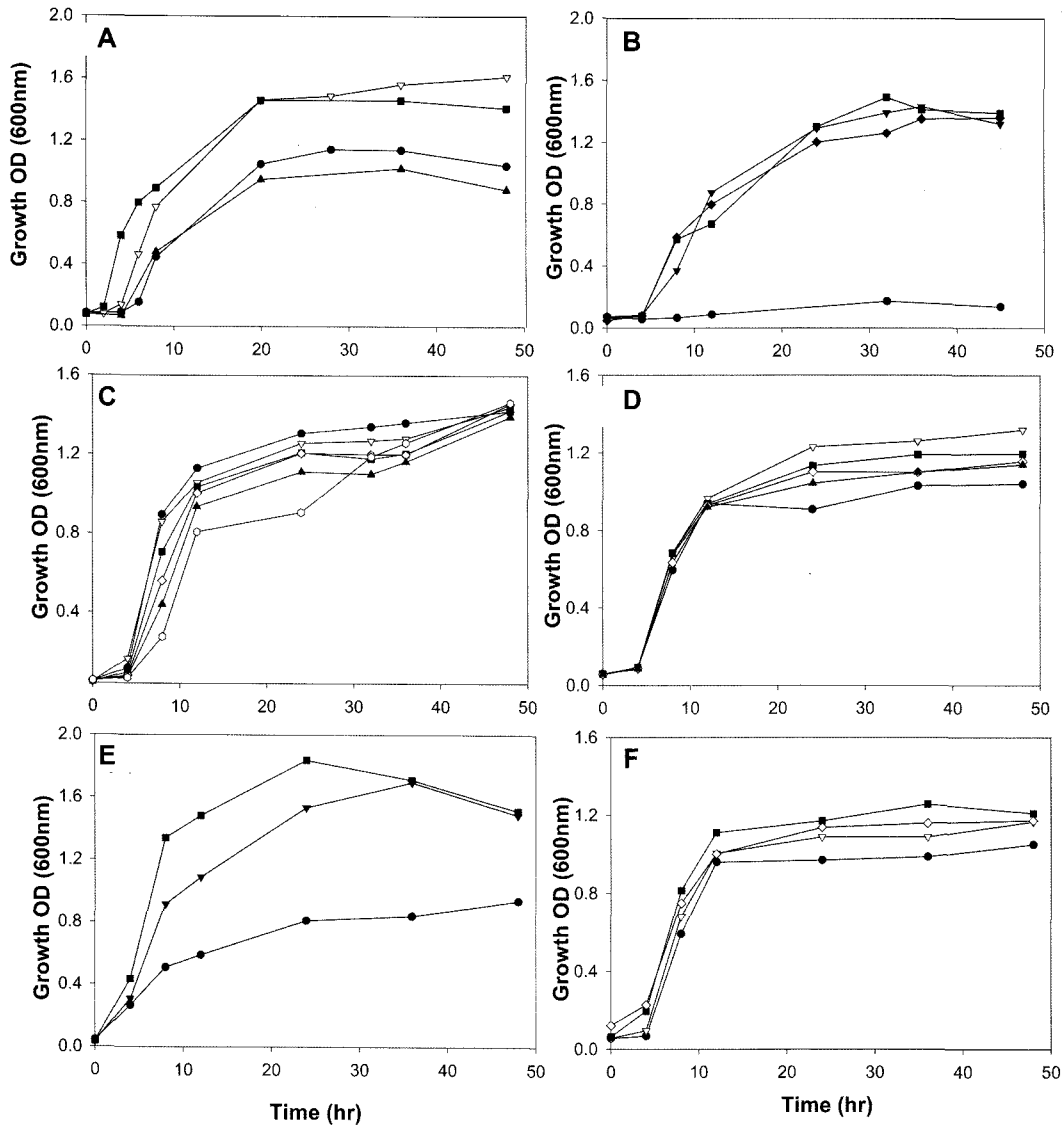


Fig. 1. Effect of (A) temperature, (B) initial pH, (C) addition of glucose, (D) addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (E) agitation speed, and (F) seed volume on cell growth of *B. pumilus* JB-1 in 1/10 diluted soybean boiling-waste liquor medium. Symbols, (A) ●, 30°C; ▽, 37°C; ■, 43°C; ▲, 45°C, (B) ●, pH 4; ▼, pH 6; ■, pH 8; ◆, pH 10, (C) ●, 0%; ▽, 0.5%; ■, 1%; ◇, 1.5%; ▲, 2%; ○, 3%, (D) ●, 0%; ▽, 0.1%; ■, 0.2%; ◇, 0.3%; ▲, 0.4%, (E) ●, 60 rpm; ▼, 120 rpm; ■, 240 rpm, and (F) ●, 0.2%; ▽, 0.5%; ■, 1.0%; ◇, 2.0%, respectively.

결정하였다.

대두 열수 침출액을 이용한 *B. pumilus* JB-1의 대량배양 플라스크 실험을 통해 결정된 최적생육 조건하에서 5리터 Jar fermentor를 이용한 대량배양을 실시하였다. 대량배양시의 차이 검토를 위해 72시간 배양하면서 pH, 세포증식도 및 총당을 측정하였다(Fig. 2). 균체 생육은 6시간 이후 급격하게 증가되었으며, 24시간 배양시 최고에 도달한 후 서서히 감소되었다. pH의 경우 초기 5.8에서 12시간 배양시 5.7로 미미하게 감소되었으나, 이후 빠르게 증가되어 48시간 경과 후 7.5를 나타내었다. 총당의 경우, 초기 1.3% 농도에서 빠르게 감소하여 24시간 경과시 0.54%까지 감소하였으나, 이

후 천천히 감소되어 48시간 배양시 0.5%를 나타내었다. 따라서 배양시간은 48시간이 효율적이며, 대두 올리고당의 분해는 나타나지 않는 것으로 추측되었다. 이를 확인하기 위해 배양액의 당 소모 패턴을 TLC로 분석한 결과(Fig. 3), 배양 초기 6시간 이내에는 주로 glucose를 이용하며, 24시간 배양시까지 지속적으로 sucrose를 이용하는 것을 확인하였다. 이후 24시간 배양 이후에는 sucrose가 거의 검출되지 않고, 올리고당이 주로 남아 균체생육이 더 이상 이루어지지 않음을 추측할 수 있었다. 따라서 대두 열수 침출액을 이용하여 면역증강활성이 우수한 *B. pumilus* JB-1을 배양하는 경우 대두 올리고당의 손실 없이 단당 및 이당류인 sucrose 이용을 통해 효율적인 균체 생산이 가능하며, 배양액은 대두

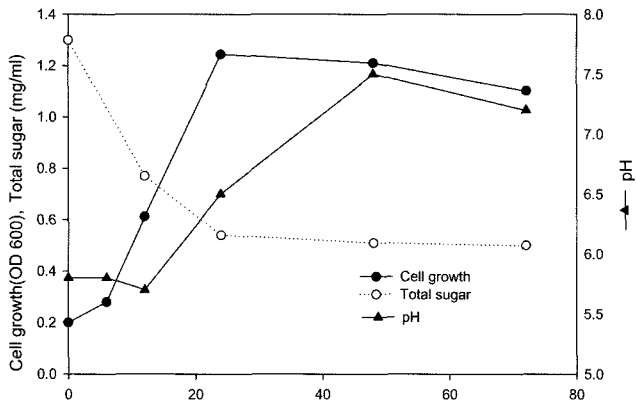


Fig. 2. Changes of cell growth, pH and the content of total sugar during *B. pumilus* JB-1 cultivation using 1/10-diluted soybean boiling-waste liquor medium in 5-L Jar-fermentor scale.

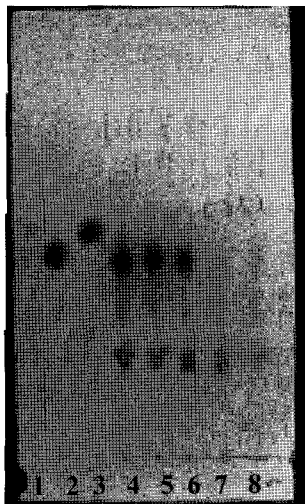


Fig. 3. TLC chromatogram of culture broth of *B. pumilus* JB-1. (1) xylooligosaccharide, (2) glucose, (3) sucrose, and the culture broths of (4) 0 h, (5) 6 h, (6) 12 h, (7) 24 h, and (8) 48 h cultivation, respectively.

올리고당 및 발효산물에 의해 다양한 생리활성을 나타내리라 추측된다.

### 요 약

생 대두는 설사, 체중감소 등의 농도 의존적 독성을 나타내므로, 가열처리 및 발효과정이 필요하며, 이 과정 중에 대두 열수 침출액이 부산물로 발생한다. 본 연구에서는, 현재 대부분이 폐기되고 있는 대두 열수 침출액을 저 이취, 면역증강 활성이 강력한 청국장 발효균주 *Bacillus pumilus* JB-1의 대량생산을 위한 배지로 사용하고, 대두 열수 침출액의 성분을 검토하고 이에 따른 최적 배양조건을 검토하였다. 대두 열수 침출액은 88% 수분함량, 9.5% 총당, 1.6% 조단백, 0.3% 조지방, 0.1% 조섬유와 2.1%의 회분을 포함하

였으며, total polyphenol, total flavonoids 및 유리아미노산 함량은 각각 생 대두의 55%, 76%, 및 30% 수준을 나타내어 영양적으로 매우 우수함을 확인하였다. 검토된 *B. pumilus* JB-1 균주 최적배양조건은 1/10 희석한 침출액에 pH 무조정, 무가당,  $(NH_4)_2SO_4$  0.1% 첨가한 후, 균주를 0.5% 접종하여 37°C, 120 rpm 교반조건에서 48시간 배양이었다. 최종적으로 5리터 Jar fermentor를 이용한 대량발효에서 효율적인 청국장 스타터 균주생산 및 대두 열수 침출액의 기능성소재 이용 가능성을 확인하였다.

### REFERENCES

- Ahn, Y. S., Y. S. Kim, and D. H. Shin.. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional cheonggukjang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**: 82-87.
- Choi, K. S., C. Choi, M. H. Im, J. D. Choi, H. C. Chung, Y. H. Kim, and C. W. Lee. 1998. The effects of soybean boiling waste liquor on the enhancement of lactic acid fermentation during korean traditional kanjang mash maturing. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**: 201-207.
- Choi, K. S., Y. G. Chung, C. Choi, H. C. Chung, M. H. Im, J. D. Choi, and C. W. Lee. 1998. Lactic acid and alcoholic fermentation of low-salted raw kanjang digestion liquor made from *Bacillus subtilis* var. *globigii* and *Scopulariopsis brevicaulis* inoculated meju. *Agri. Chem. Biotechnol.* **41**: 405-409.
- 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.
- Duranti, M., A. Barbiroli, A. Scarafoni, G. Tedeschi, and P. Morazzoni. 2003. One-step purification of Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Protein Expr. Purif.* **30**: 167-170.
- Grant, G., P. M. Dorward, W. C., Buchan, J. C. Armour, and A. Prszta. 1995. Consumption of diets containing raw soya beans, kidney beans, cowpeas or lupin seeds by rat for up to 700 days: effect of body composition and organ weights. *Br. J. Nutr.* **73**: 17-29.
- 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.
- Jo. S. W., C. S. Choi, and J. S. Rhee. 1989. Separation of soybean trypsin inhibitor using reverse micellar system. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 123-127.
- Kim J. I., M. J. Kang and T. W. Kwon. 2003. Antidiabetic Effect of Soybean and *Chongkukjang*. *Kor. Soybean Digest.* **20**: 44-52.
- Kim, S. H., J. L. Yang, and Y. S. Song. 1999. Physiological functions of chungkukjang. *Food Ind. Nutr.* **4**: 40-46.
- Kim Y. S., H. J. Jung, Y. S. Park and T. S. Yu. 2003. Characteristics of Flavor and Functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *Chungkukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 475-478.

12. Kwak, C. S., M. Y. Kim, S. A. Kim, and M. S. Lee. 2006. Cytotoxicity on human cancer cells and antitumorigenesis of chungkookjang, a fermented soybean product, in DMBA-treated rats. *Kor. J. Nutr.* **39**: 347-356.
13. Kwon, H. Y., Y. S. Kim, G. S. Kwon, C. S. Kwon, and H. Y. Sohn. 2004. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from chungkook-jang and fermentational characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 291-296.
14. Lafont, J., J. M. Rouanet, J. Gabrion, J. L. Assouad, I. J. L. Zambonino, and P. Resancon. 1988. Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat: An integrative assay. *Digestion* **41**: 83-93.
15. Lee, K. A. 2006. Quality characteristics of castella with chungkukjang. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **22**: 244-249.
16. Lee, K. H., S. H. Ryu, Y. S. Lee, Y. M. Kim, and G. S. Moon. Changes of antioxidant activity and related compounds on the chungkukjang preparation by adding drained boiling water. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**: 163-170.
17. Lyu, S. Y., J. Y. Rhim, Y. H. Park, K. B. Suh, and W. B. Park. 2002. Changes of lectin activity of kidney beans by heating and fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 1-6.
18. Ryu, H. Y., Y. K. Kim, I. S. Kwun, C. S. Kwon, I. N. Jin, and H. Y. Sohn. 2007. Thrombin inhibitory activity of fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *J. Life Sci.* **17**: 535-539.
19. Shin, M. K., and S. H. Han. 1999. Effect of soybean extract on serum lipid contents in Fed fat Diet Rats. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **31**: 809-814.
20. Shon, M. Y., 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. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **32**: 936-941.
21. Sohn, H. Y., C. S. Kwon, K. H. Son, G. S. Kwon, H. Y. Ryu, and E. J. Kum. 2006. Antithrombin and thrombosis prevention activity of buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 132-138.
22. Sung, M. K. and M. Y. Park, 2002. Cytotoxic and apoptotic effects of soybean and brown rice extracts on hormone dependent/independent breast cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 521-526.
23. 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.
24. Ye, X. Y., T. B. Ng, and R. F. Rao. 2001. A bowman-birk-type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 91-96..
25. Yoo, J. Y. 1997. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. *The Microorganism and Industry* **23**: 13-30.
26. Yoo. Y. J., H. G. Chang, and Y. S. Choi. 2005. Effect of defatted soy flour on the bread making properties of wheat flour. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**: 301-310.
27. 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.

(Received Oct. 9, 2007/Accepted Nov. 16, 2007)