

검정콩 청국장 제조를 위한 *Bacillus megaterium* SMY-212의 분리 및 균학적 특성

손미예¹ · 권선화¹ · 성찬기¹ · 이상원^{1,2} · 박석규^{1,3*}

¹한국전통발효식품연구소
²진주산업대학교 미생물공학과
³순천대학교 식품영양학과

Isolation and Microbiological Characteristics of *Bacillus megaterium* SMY-212 for Preparation of Black Bean *Chungkugjang*

Mi-Yae Shon¹, Sun-Hwa Kwon¹, Chan-Ki Sung¹, Sang-Won Lee^{1,2} and Seok-Kyu Park^{1,3*}

¹Korea Fermented Food Research Institute, Sancheong 666-962, Korea
²Dept. of Microbiological Engineering, Chonju National University, Chonju 660-158, Korea
³Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

In order to produce a high quality and functional black bean *chungkugjang*, a bacterium which has potent enzyme activities (protease: 124.8 U/ml, α -amylase: 78.2 U/ml, glucoamylase: 13.9 U/ml), was isolated by using the halo zone method and identified by morphological, cultural and biochemical properties, and then finally confirmed by GP-microplate identification system as *Bacillus megaterium* SMY-212. The isolated SMY-212 strain was also high in the formation of mucoid material and fibrinolytic activity.

Key words – Black bean *chungkugjang*, *Bacillus megaterium* SMY-212, enzyme activity, fibrinolytic activity

서 론

청국장은 우리 나라 전통장류 중의 하나로 담금 시간과 방법이 짧고 간단한 속성 콩 발효식품으로서 곡류와 채소류를 상식하는 조상들의 부족하기 쉬운 단백질과 지방질 급원식품으로 중요한 역할을 담당하여 왔다. 전통 청국장은 건조한 벧짚이나 콩의 종피에 많이 서식하고 있는 고초

균(*Bacillus subtilis*)을 포함한 *Bacillus*속 세균들이 원료 콩의 단백질과 당질을 주도적으로 발효시켜 소화흡수율을 증진시키고, 독특한 풍미와 점질물을 형성하며 각종 효소와 박테리오신을 포함한 기능성 물질을 생산하게 된다. 이들 자연발효균에 의하여 전통적으로 제조되는 청국장은 지방이나 가정마다 맛과 향기가 다른데, 그 이유로는 자연 발효균의 종류와 분포, 콩의 종류와 저장상태, 발효온도와 습도, 발효기간 등이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

청국장에 대한 연구는 대두를 원료로 한 발효과정 중 성분변화[5,16,17], 물성변화[13], 점질물의 생산[12], 제조방법

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

과 이용실태조사[2], 혈전용해효소 균주와 물질의 분리 및 특성[7,8,10], 항고혈압성 펩타이드의 생산 및 분리[1] 등에 관한 것이 있다. 최근에는 청국장의 발효율을 높이고 새로운 기능성을 강화하기 위하여 여러 가지의 고초균[3,14,15]과 *Bacillus*속 균주[9,18] 스타트를 증자대두에 첨가하여 청국장 제조 및 그 품질특성에 관한 연구들이 있다.

검정콩은 대두에 비하여 종피가 두껍고 육질에 견고하게 부착되어 있으며, 내부조직이 약간 단단하므로 증자할 때 팽윤도와 발효할 때 콩단백질의 분해율이 낮을 뿐만 아니라, 검정콩의 종피로부터 항균성 물질이 존재하여 발효도가 낮다. 종피의 수용성 색소 누출로 인한 식품 고유의 색깔이나 품질변화를 초래하기 때문에, 주로 쌀·보리·잡곡과 혼합하여 밥밀콩으로 이용되거나 자반용 콩으로 사용되었고, 일부는 떡소, 제과용, 약콩으로 이용되고 있지만, 간장, 된장, 청국장 등의 장류제조에는 많이 이용되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 청국장의 고유한 맛을 재현하면서 우수한 기능성을 갖는 고품질의 검정콩 청국장을 제조하기 위하여 우선 민간에서 약용으로 알려져 있는 검정콩을 주재료로 이용하여 청국장 발효에 적합한 균주를 분리하여 몇 가지 균학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

검정콩, 시판 및 가정용 청국장, 전통된장 등의 분리원 1g을 멸균 생리식염수 10 ml에 첨가하여 잘 현탁시켜 10분 동안 방치한 다음, 그것의 0.1 ml씩을 2% milk casein을 첨가한 LB(yeast extract 0.5%, tryptone 1%, NaCl 1%)평판배지(CM)와 2% 가용성전분을 첨가한 LB평판배지(SM)에 각각 도말하여 30℃, 2일간 배양하였다. 두 배지상에서 나타난 colony 중에서 halo zone의 크기가 크고, 명확하며 성장속도가 빠른 단일 colony만을 1차 선별하였다. LB배지에 각각 접종하여 2일간 진탕배양한 후, 각 분리균에 대한 protease와 amylase 활성을 측정한 다음, 효소활성이 비교적 높은 균주를 2차 선별하였다.

최종 선정

Halo zone의 크기가 크고 각 효소활성이 높은 균으로 2차 선별된 각 균주들을 LB배지상에서 액체 배양하여 배양

액 1 ml를 effendorf tube에 넣고 8,000 rpm, 5분 동안 원심 분리한 후, 상정액을 약 2/3정도 버리고 멸균수 1 ml가하여 균체를 재현탁시킨 다음, 100 μ l를 fibrin 배지상에 접종하여 경시적으로 halo zone의 크기를 관찰하여 혈전용해능을 측정하였다. 또한 남은 배양액은 멸균 생리식염수로 세척·집균한 다음, 일정한 농도로 희석하여 증자된 검정콩에 접종한 후, 40℃에서 72시간 발효시키면서 방향성, 점질물의 생성능력 및 전향의 혈전 용해능이 가장 우수한 것을 최종 공시균주로 선정하였다.

최종균주의 동정

최종적으로 선정된 공시균주의 동정은 형태학적, 배양학적, 생리 및 생화학적 특성과 탄소원 자화성을 조사한 다음, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 확인하였다[11].

공시균주의 형태적 특성은 NB(Nutrient broth)배지에 1.5% agar를 함유시킨 NA(Nutrient agar)배지상에서 성장한 colony의 모양을 관찰하였고, 내생포자 형성은 균주를 Bartholomew와 Wittwer에 의한 Wirtz변법으로 염색하여 광학현미경(Nikon, Labophot형)으로 관찰하였다[4]. 표면 형태는 균주를 3% glutaraldehyde-phosphate(pH 7.2)에 3시간 전 고정하고 같은 농도의 완충액으로 세척한 후 2% OsO₄-phosphate buffer에 2시간 동안 후 고정하여 알코올 50, 70, 85, 90, 95, 99, 100%의 상승 농도 순으로 탈수하고 아세톤으로 재 탈수시킨 다음 시료대에 접착하여 Au로 coating(200 Å, 진공증착)하여 주사전자현미경(SEM, Akasi SX-40)으로 관찰하였다[21].

배양조건 및 배양상의 특징은 NB배지에 공시균주를 접종하여 여러 범위의 온도(25, 30, 35, 40, 45℃)와 초기 pH(5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5)에서 20시간 진탕배양(220 rpm)한 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 검토하였다. 생리 및 생화학적 특성은 casein·gelatin·starch의 가수분해, H₂S 생성, 질산염 환원, 효소생성 등에 대하여 조사하였다[19].

탄소원의 자화성은 α -cyclodextrin을 포함한 95가지의 탄소원으로 구성된 GP microplate (MicroStationTM, BIOLOG, Inc., U.S.A.)를 이용하여 조사하였다. 각 분리균주를 첨가하여 발효시킨 청국장의 불쾌취 발생은 훈련된 패널원 5명을 통하여 발효된 청국장의 불쾌취 강도를 확인하였다(+: 매우 약함, ++: 약함, +++: 강함, ++++: 매우 강함).

효소활성 측정

Protease 활성도의 측정은 LB배지에서 2일 배양한 균체액을 원심분리하여 조효소액을 조제하였으며, 기질액은 milk casein 1.8 g을 sodium phosphate buffer (pH 7.2) 300 ml에 녹여 0.6% casein용액으로 조제하였다. 효소활성 측정은 기질용액 1 ml와 증류수 1 ml를 시험관에 넣고 항온수조에서 전처리한 후, 조효소액 1 ml를 가하여 35°C, 30분간 반응시킨 다음, 0.4 M trichloro acetic acid (TCA) 3 ml를 가하고 35°C에서 30분간 방치하여 반응을 중지시켰다. 반응중지액을 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 상징액 2 ml에 0.5 M Na₂CO₃ 5 ml와 3배 희석한 Folin phenol 시약 1 ml를 가하여 35°C 항온수조에서 30분간 발색시킨 후 실온으로 냉각시킨 다음, UV/Vis spectrophotometer로서 660 nm에서 optical density (OD)를 측정하여 tyrosine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 양으로 환산하여 protease활성을 나타내었다. Protease의 1 unit는 조효소액 1 ml가 1분간에 1 μg 의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

α -Amylase 활성 측정[6]은 수용성 전분을 기질로 하여 다음과 같이 측정하였다. 조효소액 1 ml에 1% 수용성 전분을 함유한 0.1 M acetate buffer (pH 4.8) 10 ml를 가하고 30°C에서 반응시킨다. 10분 후에 반응액 1 ml를 취하고 여기에 0.1 N HCl 10 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 그 액 0.5 ml에 0.005% iodine과 0.05% potassium iodine을 함유한 발색액 10 ml를 가한 후 660 nm에서 OD를 측정하였다. α -Amylase의 1 unit는 amylose-iodine complex의 blue color가 10% 감소되는 효소량으로 하였다.

Glucoamylase 활성 측정은 생전분을 기질로 하여 다음과 같이 측정하였다. 1%의 생전분을 함유한 0.05 M acetate buffer (pH 4.8) 5 ml에 동일한 완충액 2 ml를 가하고, 30°C에서 수분간 보온하였다. 여기에 조효소액 1 ml를 가하고 30분간 반응시킨 후, 그 액 1 ml를 취하여 DNS법에 따라 반응 전후 액 중의 환원당 양을 측정하고, 양자의 차이로부터 효소반응에서 생산된 환원당 양을 산출하였다. Glucoamylase의 1 unit는 1시간에 1 μmole 의 glucose를 생산하는 효소 양으로 하였다.

혈전용해능 측정

청국장의 혈전용해능 측정을 위한 시료용액은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)에 0.85% NaCl을 용해한 용액

100 ml를 마쇄한 청국장 5 g에 첨가하고 5°C에서 24시간 추출한 후 여과(Whatman No. 2)하여 제조하였다. Fibrin plate는 0.01 M NaCl이 함유된 0.17 M 붕산염을 동일 완충용액(pH 7.5)중에 용해시킨 용액 중에 fibrinogen의 농도가 0.15%로 되게 한 다음, 이 용액 10 ml를 직경이 90 mm인 멸균된 사래에 분주하고 thrombin (20 unit/ml) 0.5 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 덮개를 덮어 실온에서 1시간 방치하여 제조하였다[8].

Fibrinolytic activity의 측정[20]은 시료용액과 fibrin plate를 35°C에서 30분간 각각 보온한 후, fibrin plate에 시료용액 10 μl 를 적가하고 35°C에서 일정시간 반응시켜 형성된 fibrin용해 투명환의 장축 지름(mm)를 측정하여 비교하였다. 표준 plasmin용액을 1.0 unit/ml로 되도록 tris-NaCl 완충용액으로 조제한 후, fibrin plate에 10 μl 씩 적가하여 형성된 장축 지름을 측정한 다음 시료용액의 활성과 비교하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선정

검정콩 청국장의 생리활성 기능을 강화하고 발효를 촉진시킬 균주를 분리할 목적으로 검정콩, 시판 및 가정용 청국장 및 전통된장을 수거하여 균주의 분리를 행하였다. 특히 청국장 발효과정 중에서는 단백질 및 전분의 분해속도가 가장 중요한 인자로 생각되기 때문에 protease와 amylase의 활성을 중심으로 균주의 분리를 행하였다.

균원시료를 멸균 생리식염수에 현탁시켜 100 μl 를 CM 배지와 SM배지상에 도말한 후, 각각의 배지에서 clear zone을 형성하는 437개의 균주를 1차 선별하였다. 1차 분리된 각 균주를 CM 및 SM배지에 도말하여 2종류의 배지 상에서 동시에 halo zone의 크기가 비교적 크고 뚜렷하며, 성장속도가 빠른 균주를 2차 선별하여 LB배지상에서 2일간 진탕배양하였다. 그 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min)시켜 얻은 상징액에 대한 protease, α -amylase 및 glucoamylase 효소활성을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Halo zone의 크기는 분리균에서 뚜렷하고 비교적 크게 나타났으나, 효소활성에서는 균주에 따라 많은 차이를 보였다. Protease 활성은 SMY-212, 117, 38균주가 비교적 높

Table 1. Characteristics of potent α -amylase and protease-producing bacteria isolated from various sources

Strain No.	Halo zone		Enzyme activity (U/ml)		
	CM*	SM**	Protease	α -Amylase	Glucosylase
SMY-026	+++	++	108.6	34.9	11.2
SMY-029	++	+++	77.2	89.2	14.2
SMY-038	+++	++	113.1	76.0	10.4
SMY-061	++	++	87.2	53.4	9.2
SMY-066	+++	++	98.6	18.2	5.6
SMY-086	++	++	45.7	45.1	8.7
SMY-094	++	++	69.2	56.9	7.4
SMY-095	++	+++	54.6	54.2	14.9
SMY-096	++	++	85.4	97.6	10.2
SMY-117	+++	++	115.7	54.2	7.2
SMY-164	++	++	76.3	46.2	8.3
SMY-212	+++	+++	124.8	78.4	13.9
SMY-216	++	++	67.0	66.4	12.3
SMY-283	++	++	87.8	78.2	8.2
SMY-285	++	++	64.2	83.1	7.6
SMY-311	+++	++	90.1	99.2	9.7
SMY-320	++	+++	76.2	45.7	11.4
SMY-409	++	+++	83.2	72.1	14.5

Halo size: +, Low; ++, Medium; +++, High
*CM: Casein medium, **SM: Starch medium

았고, α -amylase는 SMY-311, 96 및 29균주가 높았으며, glucoamylase활성은 각 균주간의 큰 차이는 보이지 않았으나 SMY-95, 409, 29 및 212균주에서 높게 나타났다.

2차 분리된 균주에 대한 혈전용해능, 점질물 형성능 및 불쾌취 발생 정도를 조사한 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 SMY-212 (180%, plasmin 1 unit에 대한 상대활성), 117 (147%), 38 (147%) 및 94 균주(134%)가 다른 균주에 비하여 halo zone의 크기가 크게 나타났다. 분리균주를 증자·냉각시킨 검정콩에 접종하여 청국장을 제조하였을 때, 점질물의 형성능은 SMY-212균주가 가장 우수하였으며, 이때 불쾌취의 발생정도를 폐닐원을 통하여 검토한 결과, SMY-212, 409와 285균주를 접종한 시험구에서는 비교적 약하게 청국장의 불쾌취를 느낄 수 있었다.

앞의 결과를 기본으로 하여 protease활성과 혈전용해능이 비교적 강하고 점질물의 형성능이 우수하면서 불쾌취의 정도가 약하게 나타난 SMY-26, 38, 117 및 212균주와 pro-

Table 2. Off-odor, viscosity and fibrinolytic activity of bacteria isolated from various sources

Strain No.	Off-odor	Viscosity	Fibrinolytic activity	
			Clear zone (mm)*	%**
SMY-026	++	+++	9.9	130
SMY-029	+++	+	6.2	82
SMY-038	++	+++	11.2	147
SMY-061	++	+++	5.2	68
SMY-066	++++	+++	7.5	99
SMY-086	++	++	5.6	74
SMY-094	+++	+	10.2	134
SMY-095	++	++	6.8	90
SMY-096	+++	++	8.7	115
SMY-117	++	++	11.2	147
SMY-164	+++	++	7.1	93
SMY-212	++	++++	13.7	180
SMY-216	+++	+	6.0	79
SMY-283	+++	++	4.6	61
SMY-285	+	++	9.4	124
SMY-311	++++	++	8.5	112
SMY-320	++	+++	6.4	84
SMY-409	+	++	7.1	93

*Clear zone was measured at 35°C for 5 hours.

**Relative activity(%) = Clear zone(mm) of strain / Clear zone of plasmin (1 unit)

+: Poor, ++: Weak, +++: Strong, ++++: Very strong

tease 및 혈전용해능이 비교적 약하지만 불쾌취가 적게 나타나는 SMY-86, 95균주를 동일 fibrin plate에 접종하여 경시적으로 혈전 용해능을 관찰한 결과(미제시), protease 활성이 낮은 SMY-86과 95균주에서는 시간이 경과하여도 halo zone의 크기가 크게 변화하지 않았지만, SMY-26, 38, 117, 212균주에서는 시간이 경과함에 따라 halo zone의 크기가 매우 뚜렷하게 커짐을 관찰할 수 있었다.

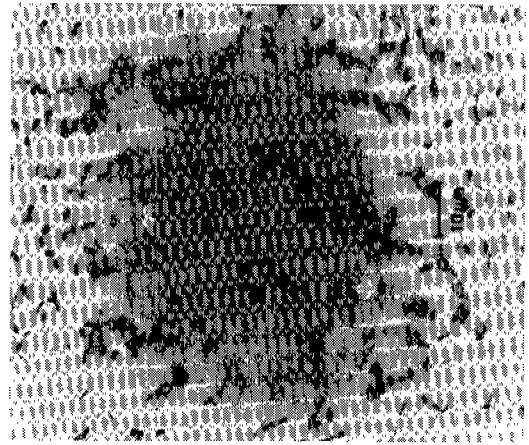
이상의 결과를 종합하여 CM 및 SM배지상에서 halo zone의 크기가 크고, 액체배양에서 protease, α -amylase 및 glucoamylase 활성이 높게 나타남과 동시에 청국장의 제조시에 점질물의 형성이 우수하고 불쾌취가 비교적 적은 SMY-212균주를 최종 선정하여 이하의 실험에 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

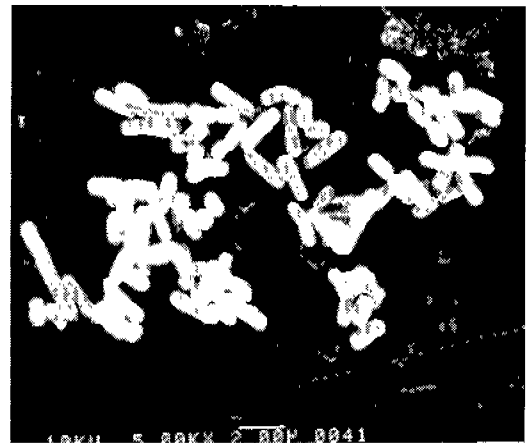
최종 선별한 SMY-212균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 검토하였다(Table 3). 이 분리균주는 간균(1.0~1.2 × 5.2~6.3 μm)이며, 내생포자를 형성하였다(Fig. 1). 또한 운동성을 가진 호기성 세균으로서 starch, casein, gelatin을 가수분해하였고, H₂S 가스는 생성하지 않았다. 성장 pH범위는 5~8정도의 중성부근이며, 성장온도는 25~45℃로서 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의하여 *Bacillus*속의 특성을 가지고 있었다(Table 3). 그리고 균체의 GP microplate상의 탄소원을 조사한 결과(Table 4), 아주 잘 이용하는 당류로서는 dextrin, glycogen, cellobiose, fructose, α-D-glucose, maltose, mannose, 3-methyl glucose, palatinose, sucrose, furanose였으며, 유기산으로는 methyl pyruvate, pyruvic acid였다. 부분적으로 이용하는 당류로서는 gentiobiose, maltotriose,

Table 3. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the strain SMY-212 isolated from chungkugjang

Morphological characteristics	
Form	Rods, 1.0~1.2×5.2~6.3μm
Motility	Positive
Gram stain	Positive
Spore	Positive, round to elongate
Cultural characteristics	
Aerobic growth	Positive
Growth on nutrient agar	Positive reproduction
Growth pH	pH 5~8
Growth temperature	25~45℃
Biochemical characteristics	
Hydrolysis of	
Starch	Quickly hydrolyzed
Casein	Quickly hydrolyzed
Gelatin	Slowly hydrolyzed
H ₂ S production	Negative
NaCl tolerance	8% below
Catalase production	Positive
Protease production	Positive
Amylase production	Positive
Oxidase	Positive
Nitrate reduction	Negative



(A)



(B)

Fig. 1. Photo micrograph (A) and scanning electronic micrograph (B) of a potent protease and α-amylase-producing strain SMY-212 isolated from chungkugjang.

This strain was cultivated on LB agar medium at 40℃ for 24 hrs.

V: vegetative cell, ES: endospore

psicose였으며, 유기산으로는 L-malic acid였으며, 그 외의 당과 유기산, 아미노산 등은 잘 이용하지 못하는 특성을 나타내었다. 결론적으로 95가지 탄소원의 이용과 각종 균주 특성을 종합하여 볼 때, 분리된 공시균주는 *Bacillus megaterium*과 아주 유사한 균종으로 확인되었다.

균주의 생육특성

분리한 SMY-212 공시균주의 생육곡선을 검토한 결과,

Table 4. Utilization of carbon sources of the strain SMY-212 isolated from *chungkugjang*

Sugars	
dextrin	++
glycogen	++
cellobiose	++
fructose	++
α -D-glucose	++
maltose	++
mannose	++
3-methyl glucose	++
palatinose	++
sucrose	++
furanose	++
gentiobiose	+
maltotriose	+
psicose	+
Organic acid	
methyl pyruvate	++
pyruvic acid	++
L-malic acid	+

--: not utilized, +: utilized, ++: very utilized

접종 후 2.5시간의 유도기를 지나 대수증식기에서 균의 증식이 왕성해지면서 α -amylase 및 protease의 효소활성이 급격히 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 배양온도를 25, 30, 35, 40, 45 $^{\circ}$ C로 조정하여 진탕배양기(220 rpm)에서 2일간 배

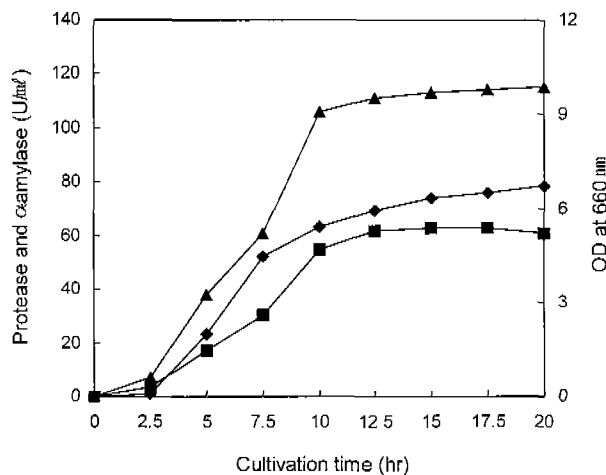


Fig. 2. Effect of cultivation time on growth, protease and α -amylase activities of the strain SMY-212 isolated from *chungkugjang*.

—◆—: α -Amylase; —■—: OD at 660 nm; —▲—: Protease

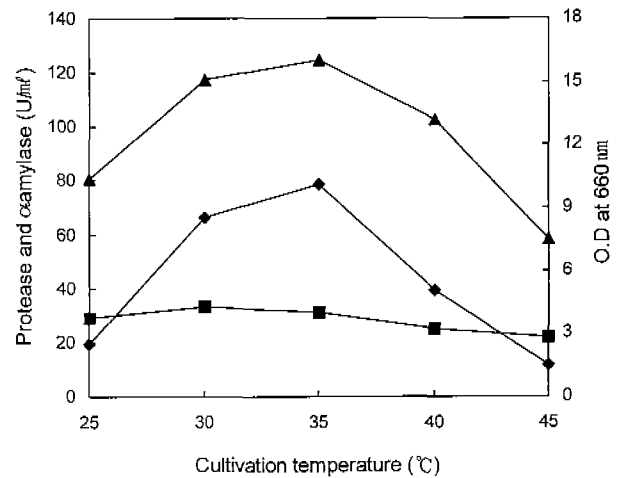


Fig. 3. Effect of cultivation temperature on growth, protease and α -amylase activities of the strain SMY-212 isolated from *chungkugjang*.

—◆—: α -Amylase; —■—: OD at 660 nm; —▲—: Protease

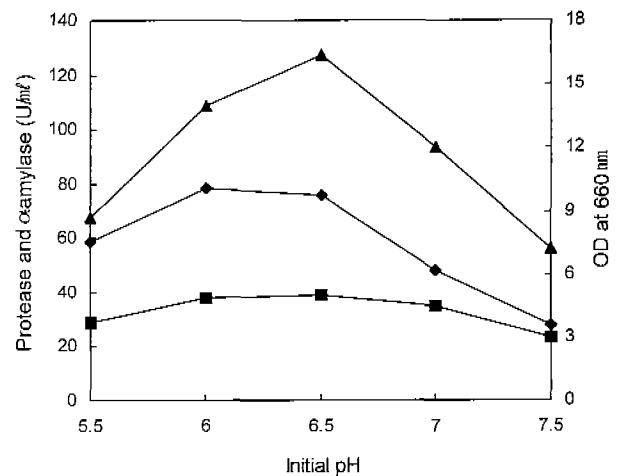


Fig. 4. Effect of initial pH on growth, protease and α -amylase activities of the strain SMY-212 isolated from *chungkugjang*.

—◆—: α -Amylase; —■—: OD at 660 nm; —▲—: Protease

양하여 생육 및 효소생성능을 측정하여 35 $^{\circ}$ C에서 생육 및 효소활성이 왕성하였다(Fig. 3). 배지의 초기 pH를 5.5~7.5까지 각 구간별로 조정하여 배양한 결과, 생육 및 효소생성의 최적 pH는 6.5 부근으로 나타났다(Fig. 4).

요 약

고품질의 기능성 검정콩 청국장을 제조하기 위하여 여

러 가지 균원시료로부터 halo zone법에 의하여 437균주를 1차 분리하고 최종적으로 SMY-212를 검정콩 청국장 발효 균으로 선정하였다. 최종 분리균주는 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성과 GP-microplate 동정 시스템에 의하여 *Bacillus megaterium*과 유사한 균주로 확인하였고, 효소활성 (protease : 124.8 U/ml, α -amylase : 78.2 U/ml, glucoamylase : 13.9 U/ml)은 매우 높았으며, 점질물 형성과 혈전용해능도 우수하였다.

참 고 문 헌

1. Cho, Y. J., W. S. Cha, S. K. Bok, M. U. Kim, S. S. Chun and U. K. Choi. 2000. Production and separation of anti-hypertensive peptide during chungkugjang fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. *J. Korean Agric. Chem. Biotech.* **43**, 247-252.
2. 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 chungkukjang. *Korea Soybean Digest.* **13**, 29-43.
3. Chung, Y. G., M. H. Im, J. D. Choi, U. K. Choi, D. H. Son and W. D. Ji. 2000. Changes of taste components and palatability during chungkugjang fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 840-845.
4. Joo, H. K., B. K. Ahn and H. H. Lee. 1997. *Laboratory Guide of Microbiological Genetics.* p. 88-89. Munundang, Seoul.
5. Joo, H. K. 1971. Studies on the manufacturing of chungkukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **3**, 64-67.
6. Joo, H. K., N. D. Kim and K. S. Yoon. 1989. Changes of enzymatic activities during the fermentation of soybean - soypaste by *Aspergillus* spp. *J. Korean Agric. Chem. Biotech.* **32**, 295-103.
7. Kil, J. O., G. N. Kim and I. S. Park. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from chungkookjang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 51-56.
8. Kim, J. S. 1996. Current research trends on bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest.* **13**, 17-24.
9. Kim, K. J., M. K. Ryu and S. S. Kim. 1982. Chungkookjang koji fermentation with rice straw. *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**, 301-308.
10. Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. T. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkookjang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488.
11. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* pp. 140-219, Vol. 1, Williams & Wilkins. Baltimore/London.
12. Lee, B. Y., D. M. Kim and K. H. Kim. 1991. Physicochemical properties of viscous substance extracted from chungkookjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 599-604.
13. Lee, B. Y., D. M. Kim and K. H. Kim. 1991. Studies on the change in rheological properties of chungkookjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 478-484.
14. Lee, H. J. and J. S. Suh. 1981. Effect of *Bacillus* strains on the chungkookjang processing (1). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 97-104.
15. Lee, S. K., S. Heo, D. H. Bae and K. H. Choi. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional chungkookjang. *Korean J. Appl. Microbiol.* **26**, 226-231.
16. Park, K. I. 1972. Studies on the N-compounds during chungkookjang meju fermentation (1). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **15**, 93-109.
17. Park, K. I. 1972. Studies on the N-compounds during chungkookjang meju fermentation (2). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **15**, 111-142.
18. 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. Korean Agric. Chem. Biotech.* **37**, 65-71.
19. 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.*
20. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 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.
21. 天兒和暢, 小池聖淳, 1980, 微生物における電子顕微鏡技術(上). pp. 3-12. 講談社. 東京.

(Received June 11, 2001; Accepted July 12, 2001)