

β-Glucosidase 활성이 있는 균주 *Bacillus* Strains를 접종해 제조한 Soy Grits 청국장의 품질 특성

이경하 · 최혜선 · 황경아 · 송진

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과

Changes in Biological Qualities of Soy Grits *Cheonggukjang* by Fermentation with β-Glucosidase-Producing *Bacillus* Strains

Kyung Ha Lee, Hye Sun Choi, Kyung A Hwang, and Jin Song

Functional Food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science, RDA

ABSTRACT The bioactivity of soy grits *cheonggukjang* was enhanced by fermentation using three β-glucosidase-producing *Bacillus subtilis* strains (HJ 18-9, HJ 25-8, and HJ 18-9+HJ 25-8) for 48 h at 37°C. The results indicate that protease, cellulase, and α-amylase activities significantly increased ($P<0.05$) with increasing fermentation time. In addition, the amino-type nitrogen content of *B. subtilis*-fermented soy grits *cheonggukjang* increased to 91.0~168.0 mg% after 48 h of fermentation. Among the isoflavones in soy grits *cheonggukjang*, contents of β-glucosides or acetyl-glucosides were reduced while aglycone content increased upon fermentation. In particular, soy grits *cheonggukjang* fermented with *B. subtilis* HJ18-9 and HJ25-8 showed the largest increases in aglycone content compared to complex treatment. These results provide useful information for development starter (single and complex) as well as for production of high quality fermented soybean food.

Key words: soybean, soy grits, isoflavone, *Bacillus*

서론

대두에 함유된 isoflavone은 여성 호르몬인 estrogen과 구조와 기능이 유사하여 phytoestrogen으로 불린다. 이는 혈중 콜레스테롤을 낮추고 심혈관질환, 골다공증을 예방할 뿐만 아니라 폐경기 이후의 각종 증후군을 완화하고, 유방암, 전립선암, 난소암, 대장암 등의 예방 효과를 보이는 등 isoflavone의 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다(1). Isoflavone은 식품 중에서 배당체 형태로 존재하므로 체내에 흡수되기 위해서는 장내 균총에 의해 대사가 된 후 체내에 흡수되지만, 체내 흡수율이 매우 낮아 이를 보완하기 위해 배당체 형태의 isoflavone을 비배당체 형태로 전환하는 생물전환(bioconversion) 공정기술 및 가공기술이 절실히 필요한 상태이다(2). 또한 배당체 형태의 isoflavone은 용해도가 비배당체에 비하여 높으나 nonionic passive diffusion 기작에 의하여 흡수되므로 비배당체 형태가 이러한 흡수 메커니즘에 유리하다고 보고되었다(3). 배당체는 발효, 산 가수분해, 발아, 열처리 등에 의해 aglycone으로 일

부 전환된다(4,5). 또한 대두에는 β-glucosidase가 함유되어 있어 대부분의 대두 가공식품 제조 중 행해지는 침지과정에서 이 효소에 의해 genistin이나 daidzin이 가수분해되어 당이 제거된 aglycone의 함량이 증가한다고 보고되어 있다(6). β-Glucosidase는 대두 자체에도 존재하지만, 된장과 청국장과 같은 발효식품 제조 시 미생물(*Aspergillus oryzae*, *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis*)에 의해 생산된다(7,8).

청국장은 삶은 콩을 벗질에 깔아 벗질에 붙어있는 *Bacillus* 속 미생물에 의해 40~42°C에서 2~3일간 발효시킨 것으로, 발효과정 중 미생물이 생산하는 효소에 의해 그 특유의 맛과 향, 점질물질이 생성된다(9). 최근에 항산화 효과(10), 혈전 용해(11,12), 항균 효과(13) 등의 유용한 생리활성 기능이 보고됨에 따라 기능성 식품으로 관심이 증가하고 있다. 청국장의 품질은 발효에 관여하는 미생물의 종류에 따라 다르며, 청국장 제조는 벗질을 이용한 자연발효법과 일부 청국장 제조용 미생물을 이용하는 방법이 통용되고 있으나 균일한 품질을 갖는 청국장을 제조하기란 매우 어려운 실정이다.

청국장 발효는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Bacillus megaterium*과 같은 *Bacillus* 속의 균주를 단독(14) 또는 두 균주를 혼합(15)하여 사용한 예가 보고되고 있다. 청국장은 *Bacillus* 발효균에 의해, 된장은 주로 메주

Received 14 December 2015; Accepted 15 February 2016

Corresponding author: Jin Song, Functional Food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea
E-mail: songjin@korea.kr, Phone: +82-63-238-3671

중의 *Aspergillus*와 *Bacillus* 발효균의 효소에 의해 발효되어 각종 생리활성물질이 만들어진다. 이들 생리활성물질 중 isoflavone은 존재 형태에 따라 생물학적 활성이 다르며, 배당체 형태보다 흡수가 빠르고 생리활성도 높은(6,16) aglycone을 많이 함유한 발효대두식품은 비발효 대두식품보다 여러 생리활성이 강하여 질병 예방에 더 효과적이지만 사용하는 균주에 따라 성분의 함량이나 생리활성에서 차이가 날 수 있다(17). 이처럼 기능성을 가지고 있는 청국장, 된장 등의 발효식품을 균일하게 제조하기 위해 스타터의 기능성을 검증하는 것은 중요하다.

콩을 3~4등분한 soybean grit으로 청국장을 제조하였을 때 콩보다 미생물의 다양한 활성을 용이하게 하여 더 좋은 효과가 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 β -glucosidase 활성을 지니는 *Bacillus subtilis*를 스타터로 사용하여 단일 혹은 복합균주를 접종하여 soy grits 청국장을 제조하고 품질 특성과 isoflavone 함량을 규명하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 대원콩(*Glycine max*)은 2013년산을 재배농가에서 구입하여 사용하였다. 스타터로 사용된 *B. subtilis* HJ18-9, HJ25-8은 선행연구를 통해 메밀 속성장으로 부터 분리된 균으로 β -glucosidase 활성이 있으며 amylase, cellulase 등의 세포 효소 분비능이 우수한 균주이다. 또한 *B. subtilis* HJ18-9는 *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus aureus* 그리고 *B. subtilis*, HJ25-8은 *C. albicans*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica*, *Escherichia coli* 등의 항균 활성이 있는 균이다(18).

제조

장류콩인 대원콩을 재료로 사용하였으며, 대원콩은 씻어 분쇄기(HMF-3250s, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 3~4등분으로 분쇄한 후 표준망체(4.75 mm, CISA, Madrid, Spain)에 걸러진 콩을 선별하여 사용하였다. 실온에서 침지(25°C, 24 h)하고 Autoclave를 이용하여 증자(121°C, 30 min)하였다. 콩이 40°C 이하로 냉각되었을 때 각 분리 균주의 배양액을 접종하여 37°C에서 48시간 발효하였다.

실험은 *B. subtilis* HJ18-9와 *B. subtilis* HJ25-8, *B. subtilis* HJ18-9+HJ25-8을 첨가한 균으로 나누어 진행하였다. 각 균주를 10^6 CFU/g 이상의 농도가 되도록 배양하여 시료량의 1%(w/w)가 되도록 첨가하였다.

추출물 제조

청국장 시료 20 g에 증류수를 가하여 100 mL로 정용하고 균질화한 후 이를 원심분리(8,000 rpm, 10 min) 하여 상등액을 분석 시료로 사용하였다.

α -Amylase 활성 측정

α -Amylase 활성 측정은 D.U.N.(Dextrinogenic Unit of Nagase)법(19)에 따라 측정하였다. 1% 전분 기질액(0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) 3 mL에 시료추출액 1 mL를 넣고 반응(40°C, 10 min)시킨 후 반응액 1 mL에 0.1 M HCl 10 mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응을 정지시킨 용액 1 mL에 0.005% I_2 -0.05% KI 용액 10 mL를 넣어 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험의 경우 1 M HCl 10 mL를 넣어 반응을 중지한 후 시료추출액을 넣어 반응 및 발색한 다음 측정하였다. 조효소액 1 mL가 1분 동안 전분 0.1 mg을 분해한 양을 1 unit으로 계산하였다.

중성 protease 활성 측정

중성 protease 활성 측정은 Lee 등(20)의 방법에 따라 측정하였다. 0.2 M phosphate buffer에 0.6% casein을 용해한 후 pH 7.0으로 보정하여 기질 용액을 제조하였다. 이 기질 용액 1.5 mL에 시료추출액 0.5 mL를 넣어 반응(37°C, 10 min)시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 25분간 37°C water bath에서 방치시킨 후 여과(Whatman No. 2, Whatman, Clifton, NJ, USA)하였다. 여액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 용액 5 mL를 첨가한 후 Folin 시약 1 mL를 첨가하여 발색(37°C, 20 min)시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 후 분해물의 tyrosine 양은 tyrosine 표준 곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g에 의해 1분간 tyrosine 1 μ g을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

Cellulase 활성 측정

Cellulase 활성 측정은 carboxymethyl cellulose sodium salt(CMC)를 기질로 하여 효소와 반응시킨 후 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 1% CMC(pH 7.0) 용액 0.5 mL와 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.25 mL를 넣은 후 시료추출액 0.25 mL를 첨가하여 50°C에서 15분간 반응시킨 다음, DNS를 3 mL 가하여 반응을 정지시키고 5분간 끓는 물에 중탕시켜 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 반응정지를 먼저 시킨 다음 위와 같은 방법으로 측정하였다. 효소 활성을 시료 1 g에 의해 1분간 1 μ g glucose를 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

β -Glucosidase 활성 측정

β -Glucosidase 활성 측정을 위한 시료 전처리는 된장 시료 20 g에 80 mL(w/v)의 증류수를 첨가하고 1분간 균질화(400 rpm, POLYTRON® PT 2100 Homogenizers, Kinematica AG, Luzern, Switzerland)한 후 이를 원심분리(8,000×g, 10 min) 하였다. 그 상등액을 취하여 Choi 등(21)의 방법에 따라 측정하였다. 기질 용액은 0.2 M sodium

phosphate buffer(pH 7.0)에 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)가 되도록 제조하였다. 이 기질 용액 0.6 mL에 시료추출액 0.2 mL를 넣어 반응(37°C, 20 min)시키고 2 M sodium carbonate 용액 0.5 mL를 첨가한 후 원심분리(15,000×g, 5 min) 하여 상등액을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 후 분해물의 양은 *p*-nitrophenol 표준 곡선으로부터 계산하였으며, 효소 활성은 시료 1 g에 의해 1분간 *p*-nitrophenol 1 μ g을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다. germany

환원당 함량 측정

환원당은 Chae 등(22)의 방법에 기초한 DNS 방법에 의하여 측정하였다. 시료추출액 1 mL에 DNS 3 mL를 혼합하여 5분 동안 중탕 가열하고 냉각한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose를 이용한 표준 곡선으로부터 환원당 함량을 산출하였다.

아미노태(NO_3^- -N) 질소 함량 측정물 제조

아미노태 질소 함량은 Weatherburn(23)의 방법에 따라 시료추출액 5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL를 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액 2~3방울을 가한 후 0.1 N NaOH로 미홍색이 될 때까지의 적정량과 blank test의 적정량을 이용하여 산출하였다.

암모니아태(NH_4^+ -N) 질소 함량 측정

암모니아태 질소 함량은 아미노태 질소 함량 측정 때와 같은 시료액 0.1 mL를 취한 후 phenol-hypochloride 반응으로 시료추출액 0.1 mL에 A 용액(phenol 10 g과 sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g/distilled water 1 L)과 B 용액($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g, NaOH 6 g과 NaOCl 10 mL/distilled water 1 L)을 각각 2 mL씩 넣고 37°C에서 20분간 반응시켜 630 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 곡선은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하여 암모니아태 질소 함량을 측정하였다(24).

Isoflavone 분석

Isoflavone 분석은 Wang(25)의 방법을 사용하였다. 청국장은 동결건조 시킨 후 분쇄하여 40 mesh 체를 통과시켜 분말로 제조하고, 동결건조 분말 2 g에 acetonitrile 24 mL와 1 mol HCl 6 mL로 실온에서 1시간 추출하였으며 filtration(Whatman No. 2) 시켜 3차 증류수로 2배 희석하여 0.2 μ M membrane filter로 filtration 시켜 UPLC(Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다. UPLC는 Waters Acquity system을 사용하였으며, column은 Acquity UPLC[®] HSS C18(1.8 μ m×2.1×75 mm) column, 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 10% MeOH(용매A)와 0.1% acetic acid를 함유한 MeOH(용매B)를 사용하였다. 용매 gradient는 용매 B의 농도를 17분간 26%에서 50%로 증가시켰고, 유속은

0.3 mL/min, injection volume은 0.8 μ L, UV detector 파장은 254 nm로 분석하였다.

유리아미노산 및 유기산 함량 분석

유리아미노산 함량은 Lee 등(20)의 방법에 따라 측정하였다(20). 시료 3 g을 취하여 70% 에탄올 30 mL를 가하고 1시간 동안 균질화한 후 21,000×g, 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 70% 에탄올 25 mL로 2회 반복 추출하고, 추출액을 합하여 rotary evaporator(EYELA A-3S, Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 감압 농축하였다. 이 농축물을 0.02 N HCl 20 mL에 녹이고 10배 희석하여 0.45 μ m membrane filter(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)로 여과한 후 아미노산 자동분석기(Blochrom 30, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다.

유기산 함량 분석을 위한 시료 3 g을 50 mL volumetric flask에 넣고 증류수 30 mL를 첨가한 후 1시간 동안 sonication 하였다. 실온으로 식힌 후 증류수를 표선까지 채우고 filter paper(Whatman No.2)로 여과한 다음 0.45 μ m membrane filter(Merck Millipore)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 유기산 표준물질은 시료와 같이 처리한 후 검량선 작성의 시료로 사용하였다. 유기산 분석을 위한 기기는 HPLC(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), column은 cap cell pak C18-AQ, detector는 UV 210 nm, mobile phase는 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 2.5)를 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min의 조건으로 분석하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 자료 처리는 SPSS program 12.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 실시하였으며, 각 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 각 청국장 간 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA를 실시하였으며, Duncan's multiple range test로 그 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

α -Amylase 활성

청국장 발효 과정 중에 α -amylase의 경우 당분의 감미성 분 등에 관여하여 청국장의 품질 면에서 중요한 효소라고 할 수 있다(26). 발효시간에 따른 균주를 달리하여 제조한 soy grits(SG) 청국장에서 α -amylase 활성 변화를 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 각 SG 청국장의 α -amylase 활성은 발효초기 0~3.35 unit/mL에서 발효종료 시점인 48 시간 후에는 6.79~12.07 unit/mL 범위를 나타내어 SG의 발효가 진행됨에 따라 α -amylase 활성이 점차 증가하였다. HJ25-8과 HJ18-9+HJ25-8을 집중해 발효한 SG의 α -amylase 활성이 각각 10.41 ± 0.20 , 12.07 ± 0.20 unit/mL

Table 1. Change in enzyme activities during soy grits *cheonggukjang* fermentation by the three strains of *Bacillus subtilis* (unit/mL)

Enzymes	Strains	Fermentation time (h)		
		0	24	48
Cellulase	HJ 18-9	13.33±7.30 ^{Ba}	287.77±117.38 ^{Aa}	257.20±58.36 ^{Aa}
	HJ 25-8	32.77±10.81 ^{Ba}	318.33±79.36 ^{Aa}	333.87±68.30 ^{Aa}
	HJ 18-9+25-8	25.53±12.51 ^{Ba}	281.10±48.15 ^{Aa}	285.00±59.16 ^{Aa}
α -Amylase	HJ 18-9	0.00±0.00 ^{Cb}	3.85±0.35 ^{Ba}	6.79±0.91 ^{Ac}
	HJ 25-8	0.00±0.00 ^{Cb}	4.22±0.33 ^{Ba}	10.41±0.20 ^{Ab}
	HJ 18-9+25-8	3.35±0.38 ^{Ca}	4.75±0.59 ^{Ba}	12.07±0.20 ^{Aa}
β -Glucosidase	HJ 18-9	91.10±6.97 ^{Ca}	304.43±18.33 ^{Ab}	202.20±10.18 ^{Bb}
	HJ 25-8	97.80±10.18 ^{Ca}	290.00±18.57 ^{Bb}	442.20±40.05 ^{Aa}
	HJ 18-9+25-8	83.37±15.28 ^{Ca}	340.00±8.83 ^{Aa}	216.67±3.35 ^{Bb}

Means in the same row (A-C) and column (a-c) followed by different letters are significantly different ($P<0.05$).

로 HJ18-9를 접종해 발효한 SG 6.79±0.91 unit/mL보다 높은 결과를 나타내었다. Oh와 Eom(27)의 연구에서는 발아콩 벗겨진 청국장의 경우 발효 24시간에 12.5 units/g으로 최대 활성을 나타내고 그 이후부터 발효종료까지 감소하는 경향을 보였다고 하였으나 본 실험에서는 발효시간이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Lee 등(28)은 다양한 스타터로 발효하였을 때 스타터에 따라 그 값의 차이가 1.06~1.78배로 나타난다고 하였다. 이처럼 스타터의 종류와 발효조건에 따라 효소들의 활성에 차이가 있는 것으로 보아 SG 청국장의 품질 및 관능적인 특성을 향상하는 데에는 스타터의 선택과 발효조건이 매우 중요한 것으로 생각한다.

중성 protease 활성

대두 단백질을 가수분해하여 구수한 맛 성분인 아미노산, polypeptide 등을 생성하는 protease는 청국장 제조 시 맛을 결정짓는 중요한 인자이다. 균주를 달리하여 제조한 SG 청국장의 protease 활성 변화는 Fig. 1에 나타내었다. HJ 18-9, HJ25-8, HJ18-9+HJ25-8 균주를 각각 이용한 SG 청국장의 protease 활성은 발효 시간 동안 활성이 점차 증가함을 보였으며, 그중 높은 활성을 나타내는 것은 HJ25-8 균주로 288.47±1.44 unit/g의 활성을 보였으며, HJ18-9, HJ18-9+HJ25-8은 각각 207.20±5.94 unit/g, 216.27±

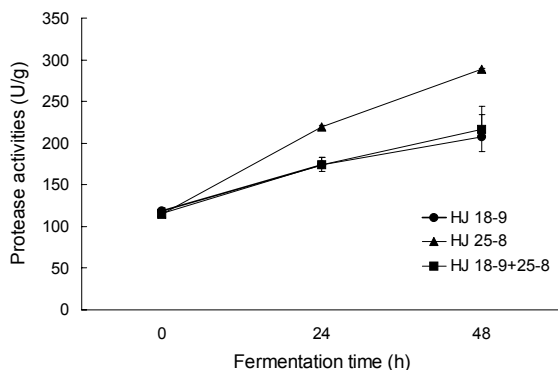


Fig. 1. Change of protease activity during soy grits *cheonggukjang* fermentation by the three strains of *Bacillus subtilis*.

27.11 unit/g의 활성이 나타났다. Song 등(29)은 같은 스타터를 이용하여 품종별 청국장을 발효하였을 때 protease 활성이 콩의 종류에 따라 다르게 나타났다고 보고하였다. 이는 높은 protease 활성을 기대하기 위해서는 품종의 선택도 중요한 것으로 생각한다. Lee 등(30)은 재래청국장에서 분리한 균주를 이용하여 제조한 청국장의 protease 활성이 균주에 따라 다르며, 그 범위는 32~110 unit이라고 보고하여 본 실험에서 약간 높은 경향을 나타내었다.

Cellulase 활성

발효 균주를 달리하여 제조한 SG의 cellulase 효소 활성은 Table 1과 같다. Cellulase 중 특히 CMCase(carboxymethyl cellulase, endo β -1,4-glucanase)는 exo- β -glucanase, β -glucanase와 함께 cellulase계 구성효소에서 식물세포벽 구성성분 중 대부분을 차지하고 있는 cellulose를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 장내 이용성 증진을 위해 널리 사용되는 효소이다. 본 실험에서는 Table 1의 결과와 같이 HJ25-8에서 HJ18-9+HJ25-8, HJ18-9보다 높은 결과를 나타내었다. 전통 장류인 된장이나 간장은 발효과정에서 미생물의 다양한 효소(amylase, protease, cellulase 및 lipase)에 의해 콩에 함유된 단백질, 올리고당류, 이소플라본, 지질 등이 소화되기 쉬운 형태의 아미노산, 유리당, 이소플라본 aglycone, 지방산 등으로 분해되어 향산화 및 혈전용해 기능을 갖는 2차 산물이 생성된다(31-33). Lee 등(34)의 보고에 따르면 균별로 제조한 팽화미 된장의 cellulase 활성을 살펴본 결과 접종 균주에 따라 그 값이 3.55~5.36배 차이난다고 보고하였다. 이처럼 스타터의 선택이 매우 중요한 것으로 생각한다. 아직 전통장류인 청국장에서 cellulase 활성에 대한 연구는 미비한 시점이다. 따라서 본 실험의 결과가 청국장뿐 아니라 이들 균이 전통장류의 스타터로 사용되는 데 있어 참고자료가 될 수 있을 것으로 생각한다.

β -Glucosidase 활성

발효 시간에 따른 균주를 달리하여 제조한 청국장의 β -glucosidase 활성 변화를 조사한 결과는 Table 1에 나타내

었다. 각 시료의 β -glucosidase 활성은 HJ18-9와 HJ18-9+HJ25-8이 발효 24시간째 가장 높은 효소 활성을 나타내었으며, HJ25-8은 발효종료 시점인 48시간까지 효소 활성이 증가하는 경향을 보였고 다른 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높은 효소 활성을 나타내었다. β -Glucosidase는 isoflavone의 β -glucosidic bond 형태를 체내 이용률이 높은 비배당체 형태로 전환해주는 역할을 한다는 연구 결과가 보고되었다(35,36). Kim과 Chun(37)에 따르면 식물, 곰팡이, 효모, 세균과 동물조직에 분포해 있는 β -glucosidase는 하나의 cellulase compound로서 cellulose를 최초로 endo-glucanase가 절단하고 그다음 cellobiohydrazase가 작용하며 마지막에 β -glucosidase가 작용하여 최종산물인 glucose를 생성한다고 하였다. 또한 Yang 등(38)은 천연물 유래의 β -glucosidase 효소를 활용하는 경우 반응산물의 선택성을 증가시킬 수 있으며 고온이나 강산 등의 유해한 유기용매의 사용을 감소시킬 수 있다고 하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 β -glucosidase 활성이 있는 균주를 접종하여 청국장을 제조하였을 때 체내 이용률이 높은 기능성 장류를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

아미노태 질소 함량

콩 발효식품의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소는 SG 청국장의 발효속성 중 미생물이 생산하는 protease 활성에 의해 생성된 아미노산에 기인한다. 아미노태 질소의 함량은 장류 발효의 품질 지표로서 중요하기 때문에 그 함량을 측정하였다(Fig. 2). 아미노태 질소 함량은 protease 활성과 유사한 경향을 나타내는데 본 연구에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. HJ25-8을 접종한 SG 청국장장에서 168.00 ± 2.42 mg%로 높은 함량을 나타냈고, HJ18-9+HJ25-8, HJ18-9 순으로 101.73 ± 3.23 , 91.00 ± 3.70 mg% 함량을 나타내었다. 모든 SG 청국장은 48시간에서 아미노태 질소 함량이 가장 높게 나타났다. Hong 등(39)은 다양한 균주로 청국장을 발효하여 아미노태 질소 함량을 살펴보았는데 그 값이 220~571 mg%로 균주에 따라 다양한 값이 나타났다고 하였으며, 이는 본 연구 결과보다 높은 아미노태 질소 함량을 나타내었다. 또한 Ko 등(40)은 청국장의 제조방법에 따른 향미 증진 효과에서 제조방법에 관계없이 청국장의 아미노태 질소 함량은 숙성이 진행됨에 따라 증가한다고 하여, 본

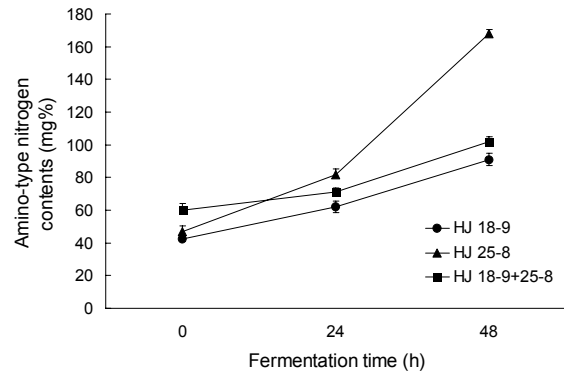


Fig. 2. Change of amino-type nitrogen (mg%) during soy grits *cheonggukjang* fermentation by the three strains of *Bacillus subtilis*.

실험에서 발효 기간을 더 늘렸을 때 아미노태 질소 함량의 증가를 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

암모니아태 질소 함량

암모니아태 질소는 단백질 분해과정에서 deamination에 의하여 생성되며 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표로 사용된다. 따라서 SG 청국장 발효과정에 장류의 소비 기피를 유발하는 물질인 암모니아태 질소 함량을 측정하였다(Table 2). SG의 암모니아태 질소의 함량은 발효시간에 따라 점차 증가하며, 48시간에 HJ25-8을 접종한 SG 청국장장에서 117.47 ± 2.83 mg%로 높은 함량을 나타내었고 HJ18-9, HJ18-9+HJ25-8에서 83.60 ± 2.72 mg% 98.63 ± 3.00 mg%의 함량을 나타냈다. 암모니아태 질소 함량만을 고려할 때 HJ18-9로 발효한 SG가 불쾌치가 적으므로 소비에 유리할 것으로 판단된다. Kim 등(41)은 균주에 따른 청국장 시료의 암모니아태 질소의 양은 전반적으로 숙성일이 증가하면서 증가하는 경향을 나타내었다고 보고하여 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타냈다. Choi(42)의 연구에서는 *B. subtilis*를 이용한 청국장을 40°C에서 숙성 시 아미노태 질소 함량이 숙성 60시간에 575 mg%까지 증가하였다고 하여 본 실험에서 암모니아태 질소 함량이 적은 것으로 나타났다. 이는 숙성온도와 숙성시간 등의 조건에 의해 다른 것으로 생각한다.

Table 2. Change in ammonia-type nitrogen, reducing sugar contents during soy grits *cheonggukjang* fermentation by different *Bacillus subtilis* strains (mean \pm SD)

Type	Strains	Fermentation time (h)		
		0	24	48
Ammonia-type nitrogen (mg%)	HJ 18-9	55.80 \pm 1.08 ^{Ba}	47.73 \pm 1.23 ^{Ca}	83.60 \pm 2.72 ^{Ac}
	HJ 25-8	52.63 \pm 2.42 ^{Ba}	38.37 \pm 0.35 ^{Cb}	117.47 \pm 2.83 ^{Aa}
	HJ 18-9+25-8	57.20 \pm 3.93 ^{Ba}	35.10 \pm 0.87 ^{Cc}	98.63 \pm 3.00 ^{Ab}
Reducing sugar (%)	HJ 18-9	0.45 \pm 0.01 ^{Ca}	2.73 \pm 0.04 ^{Aa}	1.45 \pm 0.07 ^{Ba}
	HJ 25-8	0.45 \pm 0.00 ^{Ca}	2.24 \pm 0.04 ^{Ab}	1.36 \pm 0.07 ^{Ba}
	HJ 18-9+25-8	0.43 \pm 0.02 ^{Ca}	2.06 \pm 0.03 ^{Ac}	1.37 \pm 0.17 ^{Ba}

Means in the same row (A-C) and column (a-c) followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

환원당 함량

발효시간에 따라 균주를 달리하여 제조한 SG 청국장의 환원당 함량의 변화를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 발효 24시간에 HJ18-9 균주를 이용한 SG 청국장의 환원당이 2.73±0.04%로 가장 높았고, HJ25-8, HJ18-9+HJ25-8의 발효 24시간의 환원당이 각각 2.24±0.04%, 2.06±0.03%를 나타냈다. 발효 48시간의 SG 환원당 함량은 HJ18-9, HJ25-8, HJ18-9+HJ25-8 균주가 각각 1.45±0.07%, 1.36±0.07%, 1.37±0.17%를 나타내어, 모든 SG 청국장 시료의 환원당은 24시간의 발효 기간에 증가하다가 48시간에 감소하는 경향을 보였다. Shon 등(43)의 보고에서는 잔존 환원당의 함량이 24시간에서 가장 많이 나타났으며 이것은 콩의 다당류들이 24시간까지는 저분자의 환원당으로 많이 생성되었다가 24시간 이후부터는 발효 미생물의 증식에 필요한 영양원과 화학적 반응 등에 이용된다고 하였다. 본 연구에서도 발효시간은 48시간으로 발효 24시간에 더 높은 환원당

값을 나타내었고, 24시간 이후에는 발효 미생물에 의해 환원당이 소비되어 발효 48시간에는 환원당이 감소하는 것으로 생각한다.

Isoflavone 함량

37°C에서 48시간 동안 발효시킨 SG 청국장의 isoflavone 함량은 Fig. 3에 나타내었다. HJ18-9, HJ25-8, HJ18-9+HJ25-8의 isoflavone 비배당체 형태인 daidzein과 genistein, glycitein을 합한 함량은 각각 697.03±9.46, 683.10±2.05, 272.40±2.04 µg/g으로 나타났다. 이는 초기 raw SG의 aglycone 함량이 78.83±12.21, 124.47±0.76, 102.17±0.21 µg/g인 것에 비하여 2~10배 전환율을 보인다. 하지만 두 가지 균주 혼합 시 오히려 aglycone 함량이 낮아졌다. Lee 등(28)의 연구에서는 청국장 발아 시 물리적 힘을 가하지 않은 온전한 대원콩에 HJ18-9와 HJ25-5 균주를 접종하여 발효하였을 때 그 값이 각각 187.00±2.85, 210.77±

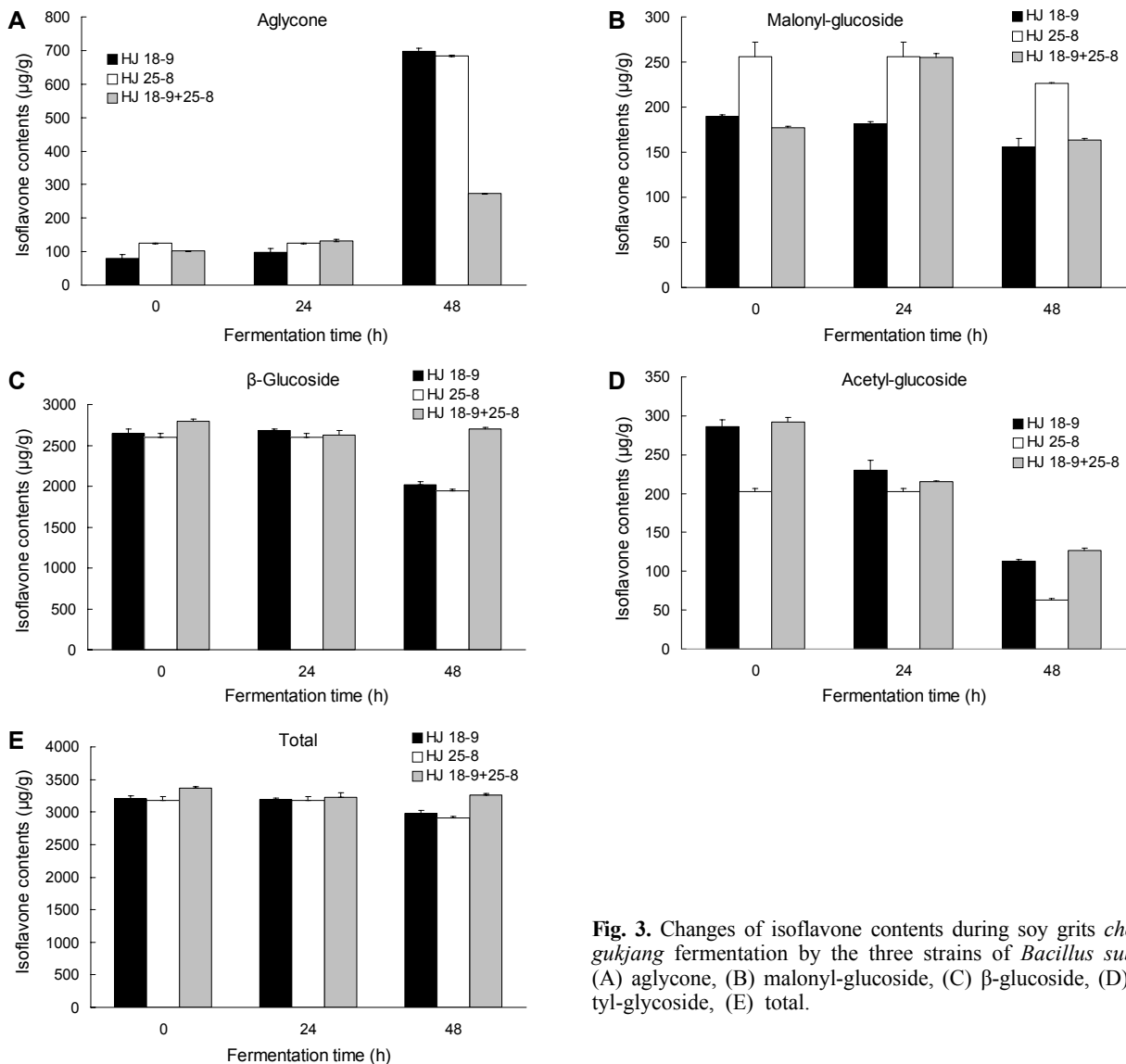


Fig. 3. Changes of isoflavone contents during soy grits *cheong-gukjang* fermentation by the three strains of *Bacillus subtilis*. (A) aglycone, (B) malonyl-glucoside, (C) β-glucoside, (D) acetyl-glycoside, (E) total.

11.75 µg/g으로 나타나 SG 청국장을 제조한 본 실험에서 각각 3.73, 3.24배 더 높게 나타내었다. 이는 서론에서 언급하였듯이 콩을 3~4등분한 soybean grit은 미생물의 다양한 활성을 용이하게 하여 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 생각한다. 일반적으로 대두의 isoflavone은 glycosided conjugate(malonyl-glycoside, β-glycosides 및 acetyl-glycosides 형태)의 isoflavone isomer와 aglycone 형태로 존재하는데 대두의 수침이나 가열 등의 가공처리를 하면 용출된 β-glycosidase의 작용에 의해 aglycone으로 전환되는 것으로 알려졌다.

Coward 등(44)은 온도 변화에 의한 isoflavone 함량 변화 시 80°C에서 isoflavone 6"-O-malonyl-β-glucoside와 6"-O-acetyl-β-glucoside 형태가 β-glucoside로 전환되는 intra-conversion을 보고하였다. 이러한 inter-conversion, intra-conversion의 변화를 통해 12가지 형태의 isoflavone 함량이 변화한 것으로 생각한다. 또한 β-glucosidase 활성을 가지고 있는 균을 접종하여 발효하였을 때 isoflavone aglycone 전환율은 증가하게 된다. Uzzan과 Labuza(24)는 isoflavone이 일상적인 조리 가열처리 조건에서 상대적으로 안정하여 전체 함량의 변화가 적은 것으로 알려졌으나 각각의 화학구조는 여러 가지 조건에 따라 변화한다고 하였다.

본 연구에서는 대두를 수침, 증자 후 β-glucosidase 활성을 가지고 있는 *B. subtilis*를 접종하여 SG 청국장을 제조함으로써 isoflavone 비배당체 함량을 유의적으로 증가시키는 결과를 얻었다.

유리아미노산과 유기산의 함량

37°C에서 48시간 동안 *B. subtilis*로 발효시킨 SG 청국장의 유기산과 유리아미노산 함량을 측정하였고, 그 결과는 Table 3 및 4와 같다. 유리아미노산 분석 결과 glutamic acid를 비롯하여 17종의 유리아미노산이 검출되었는데, 구수한 맛을 내는 glutamic acid(125.10~292.23 mg%), 쓴맛을 내는 leucine(111.63~287.43 mg%), phenylalanine(100.97~247.88 mg%), valine(93.82~187.69 mg%), 또한 단맛을 내는 lysine(28.43~102.57 mg%) 함량이 가장 많이 검출되었다. 총유리아미노산 함량은 HJ25-8과 HJ18-9를 접종한 SG 청국장에서 높은 함량을 나타냈다.

Eom 등(45)은 *Bacillus natto*를 접종하여 제조한 발아대두 청국장에서 glutamic acid, isoleucine, phenylalanine 함량이 높게 나왔다고 하였으며, Lee 등(20)은 glutamic acid가 함량이 가장 많이 검출되었고, aspartic acid, leucine, lysine이 많이 검출되었다고 하여 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이처럼 콩 발효과정 중에 *Bacillus* sp. 유래 다양한 효소에 의해 단백질이 분해되어 구수한 맛을 내는 glutamic acid, aspartic acid, 쓴맛을 지닌 valine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, 단맛을 내는 alanine, glycine, lysine 등의 유리아미노산이 생성되

Table 3. Change in free amino acid contents during soy grits *cheonggukjang* fermentation by different *Bacillus subtilis* strains (mg%)

	Strains		
	HJ 18-9	HJ 25-8	HJ 18-9+25-8
Aspartic acid	18.12	40.97	23.40
Threonine	18.60	40.89	13.98
Serine	6.52	14.91	6.45
Glutamic acid	137.80	292.23	125.10
Glycine	0.00	0.00	0.00
Alanine	18.99	30.90	17.63
Valine	114.78	187.69	93.82
Cystine	0.00	0.00	0.00
Methionine	37.08	66.41	12.72
Isoleucine	69.95	134.51	49.59
Leucine	171.40	287.43	111.63
Tyrosine	19.97	11.71	6.46
Phenylalanine	140.65	247.88	100.97
Tryptophan	5.46	9.49	2.85
Lysine	45.66	102.57	28.43
Histidine	23.04	34.01	13.60
Arginine	0.00	32.68	0.00
Total	828.02	1,534.28	606.63

Table 4. Change in organic acid contents during soy grits *cheonggukjang* fermentation by different *Bacillus subtilis* strains (mg%)

	Strains		
	HJ 18-9	HJ 25-8	HJ 18-9+25-8
Oxalic acid	201.22	196.38	160.75
Citric acid	1,022.69	1,072.49	1,108.85
Tartaric acid	0.0	0.0	0.0
Malic acid	0.0	0.0	0.0
Succinic acid	56.09	59.09	25.70
Fumaric acid	0.0	0.0	8.13
Lactic acid	939.81	1,046.29	1,183.90
Formic acid	0.0	0.0	0.0
Acetic acid	286.75	384.24	179.09
Pyroglutamic acid	0.0	6.62	0.0
Total	2,506.56	2,765.11	2,666.42

고 어우러져 콩 발효물의 특유의 맛과 향미를 갖게 해준다(46).

An 등(47)의 *Bacillus* 속 메주로 담금한 된장의 총유리아미노산에 대한 결과와 비슷한 경향이 있었으나, 각각의 유리아미노산 함량에서는 차이를 보여주었다. 이는 담금 원료조성, 배합비율, 사용 균주의 효소 활성, 숙성기간의 차이가 원인으로 생각한다(48,49).

유기산은 citric acid, lactic acid, succinic acid, fumaric acid 및 malic acid가 동정되었으며, citric acid와 lactic acid, acetic acid의 함량이 각각 1,022.69~1,108.85 및 939.81~1,183.90, 179.09~384.24 mg% 순으로 가장 높았다. Choi 등(50)은 *B. subtilis*를 접종하여 발효한 청국장의 유기산 함량은 lactic acid가 가장 많았고 그다음으로 oxalic acid와 citric acid였다고 하여 본 실험 결과와 경향

은 유사하였으나 그 값에서 차이를 보였다. Joo 등(51)은 사용한 균주를 달리한 된장에서 citrate, oxalate, lactic acid 순으로 함량이 가장 높았으며, 이는 본 연구의 결과와 유사하였다.

요 약

본 연구는 β -glucosidase 활성이 있는 *Bacillus subtilis* HJ18-9와 HJ25-8, 두 가지 균주를 혼합한 HJ18-9+HJ25-8의 3가지 균주를 스타터로 접종하여 발효시킨 soy grits 청국장의 품질 특성과 isoflavone의 함량을 측정하였다. 환원당을 유리하는 데 관여하는 α -amylase 효소 활성의 경우 두 가지 균주를 혼합한 HJ18-9+HJ25-8을 접종해 발효한 시료에서 다른 시료와 비교하였을 때 높은 활성을 보였다. 청국장의 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분을 유리하는 protease 활성의 경우 HJ25-8, HJ18-9+HJ25-8, HJ18-9의 순으로 높은 활성을 나타내었다. 또한 아미노태 질소와 암모니아태질소의 함량은 HJ25-8을 접종해 발효한 SG 청국장에서 높았으며, 청국장 isoflavone 비배당체 함량은 HJ18-9+HJ25-8의 $272.40 \pm 2.04 \mu\text{g/g}$ 에 비해 HJ18-9와 HJ25-8 접종구에서 697.03 ± 9.46 , $683.10 \pm 2.05 \mu\text{g/g}$ 으로 높았다. β -Glucosidase 활성이 있는 두 가지 균의 혼합으로 isoflavone aglycone 함량의 전환율을 더 높일 수 있는 시너지 효과를 기대했으나 단일 균주로 접종하여 발효했을 때 더 높은 aglycone 함량을 얻을 수 있었다. 본 연구를 통해 청국장 제조에 알맞은 균주를 개발·평가하여 청국장 가공품 개발의 기초연구가 되고자 하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술사업(과제번호: PJ011695)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim DH, Lim DW, Bai S, Chun SB. 1997. Fermentation characteristics of whole soybean meju model system inoculated with 4 *Bacillus* strains. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1006-1015.
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the chungkook-jang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 201-210.
- Brouns F. 2002. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. *Food Res Int* 35: 187-193.
- Setchell KDR, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. 1984. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 40: 569-578.
- Kim IB, Shin S, Lim BL, Seong G, Lee YE. 2010. Bioconversion of soybean isoflavone by *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 214-219.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. 2001. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131: 1362S-1375S.
- Yeo KE, Kim WJ. 2002. Effects of acid hydrolysis on isoflavone of defatted soybean flour. *Korean J Food Sci Technol* 34: 916-918.
- Choi YB, Woo JG, Noh WS. 1999. Hydrolysis of β -glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J Food Sci Technol* 31: 189-195.
- Son DH, Kwon OJ, Ji WD, Choi UK, Kwon OJ, Lee EJ, Cho YJ, Cha WS, Chung YG. 2000. The quality changes of chunggugjang prepared with *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 1-6.
- Hwang JS, Kim SJ, Kim HB. 2009. Antioxidant and blood-pressure reduction effects of fermented soybean, Chungkookjang. *Kor J Microbiol* 45: 54-57.
- Ko JA, Koo SY, Park HJ. 2008. Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. *Food Chem* 111: 921-924.
- Sohn BH, Song YJ, Oh KH. 2008. Fibrinolytic activity and characterization of *Bacillus licheniformis* HK-12 isolated from Chungkook-jang. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 251-256.
- Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. 2000. Biological activities of chungkugjang prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 936-941.
- Lee BY, Kim DM, Kim KH. 1991. Studies on the change in rheological properties of chungkook-jang. *Korean J Food Sci Technol* 23: 478-484.
- Seok YR, Kim YH, Kim S, Woo HS, Kim TW, Lee SH, Choi C. 1994. Change of protein and amino acid composition during chungkook-jang fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *Agric Chem Biotechnol* 37: 65-71.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130: 1695-1699.
- Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. 2001. Some biological activities and isoflavone content of chungkugjang prepared with black beans and *Bacillus* strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 662-667.
- Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, Choi HS. 2011. Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat sok-seongjang. *Korean J Food Sci Technol* 43: 735-741.
- Yoon KS. 1998. Changes of enzymatic activities during the fermentation food soybean-soypaste by *Aspergillus* spp. MS Thesis. Konkuk University, Seoul, Korea.
- Lee SY, Eom JS, Choi HS. 2014. Quality characteristics of fermented soybean products by *Bacillus* sp. isolated from traditional soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 756-762.
- Choi YB, Kim KS, Rhee JS. 2002. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria. *Biotechnol Lett* 24: 2113-2116.
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KY, Oh MH, Oh SH. 2000. *Standard food analytics*. Jigu Publishing Co., Seoul,

- Korea. p 299-301.
23. Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39: 971-974.
 24. Uzzan M, Labuza TP. 2004. Critical issue in R&D of soy isoflavone-enriched foods and dietary supplements. *J Food Sci* 69: 77-86.
 25. Wang G, Kuan SS, Francis OJ, Ware GM, Carman AS. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J Agric Food Chem* 38: 185-190.
 26. Park JS, Lee MY, Lee TS. 1995. Compositions of sugars and fatty acids in soybean paste (*Doenjang*) prepared with different microbial sources. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 917-924.
 27. Oh HI, Eom SM. 2008. Changes in microflora and enzyme activities of *cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 40: 56-62.
 28. Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J. 2015. Changes in isoflavone content and quality characteristics of *Cheonggukjang* prepared by some different strains. *Korean J Int Agric* 27: 481-488.
 29. Song J, Lee KH, Choi HS, Hwang KA. 2015. Bioactive compounds of *Cheonggukjang* prepared by different soybean cultivars with *Bacillus subtilis* HJ18-9. *Korean J Food Preserv* 22: 535-544.
 30. Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY, Kim SD. 2005. Quality and functional characteristics of chungkukjang prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional chungkukjang. *J Food Sci* 70: M191-M196.
 31. Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suh HJ. 2004. Isolation of fibrinolytic enzyme and β -glucosidase producing strains from *Doenjang* and optimum conditions of enzyme production. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 439-442.
 32. Ryu BH. 2003. Development of functional doenjang for antioxidative and fibrinolytic activity. *J Life Sci* 13: 559-568.
 33. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 113-117.
 34. Lee KH, Kim EJ, Choi HS, Park SY, Kim JH, Song J. 2015. Quality characteristics of popped rice *Doenjang* prepared with *Bacillus subtilis* strains. *Korean J Food Preserv* 22: 545-552.
 35. Ewe JA, Wan-Abdullah WN, Alias AK, Liong MT. 2013. Ultraviolet radiation enhanced growth of lactobacilli and their bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk. *LWT-Food Sci Technol* 50: 25-31.
 36. Marazza JA, Nazareno MA, de Giori GS, Garro MS. 2013. Bioactive action of β -glucosidase enzyme of *Bifidobacterium longum* upon isoflavone glucosides present in soymilk. *Int J Food Sci Technol* 48: 2480-2489.
 37. Kim KW, Chun BS. 2001. Optimum conversion to the aglycone form using β -glucosidase and isoflavone extraction from soybean. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 174-178.
 38. Yang S, Wang L, Yan Q, Jiang Z, Li L. 2009. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chem* 115: 1247-1252.
 39. Hong SW, Kim JY, Lee BK, Chung KS. 2006. The bacterial biological response modifier enriched *Chungkookjang* fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 38: 548-553.
 40. Ko TG, Kim JD, Bae SH, Han YK, Han IK. 2000. Study for the development of antibiotics-free diet for weanling pigs. *Kor J Anim Sci* 42: 37-44.
 41. Kim YT, Kim WK, Oh HI. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkookjang*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 1-5.
 42. Choi BD. 1997. Studies on the changes of the quality and chemical compositions in the aging of the Chungkookjang prepared with frozen soybeans. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul, Korea.
 43. Shon MY, Kwon SH, Sung CK, Park SK, Choi SD. 2001. Changes in chemical components of *chungkugjang* prepared with small black bean. *J Korean Life Sci* 11: 284-290.
 44. Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. 1998. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* 68: 1486S-1491S.
 45. Eom SM, Jung BY, Oh HI. 2009. Changes in chemical components of *Cheonggukjang* prepared with germinated soybeans during fermentation. *J Appl Biol Chem* 52: 133-141.
 46. Rozan P, Kuo YH, Lambein F. 2000. Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *J Agric Food Chem* 48: 716-723.
 47. An HS, Bae JS, Lee TS. 1987. Comparison of free amino acids, sugars, and organic acids soy bean paste prepared with various organisms. *J Korean Agric Chem Soc* 30: 345-350.
 48. Jeong JH, Kim JS, Lee SD, Choi SH, Oh MJ. 1998. Studies on the contents of free amino acids, organic acids and isoflavones in commercial soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 10-15.
 49. Jung BM, Roh SB. 2004. Physicochemical quality comparison of commercial *doenjang* and traditional green tea *doenjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 132-139.
 50. Choi UK, Son DH, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung YG. 1998. Changes of taste components and palatability during *chunggugjang* fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 840-845.
 51. Joo HK, Kim DH, Oh KT. 1992. Chemical composition changes in fermented Doenjang depend on Doenjang koji and its mixture. *J Korean Agric Chem Soc* 35: 351-360.