

대두 Bowman-Birk형 Protease Inhibitor들의 품종간 비교

노범섭 · 이홍석* · 김수일

서울대학교 농화학과, 서울대학교 농학과*

Variation in Bowman-Birk type Protease Inhibitors of Soybeans

Beom-Seop Rho, Hong-Suk Lee* and Su-Il Kim

Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

*Department of Agronomy, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Bowman-Birk type protease inhibitors of soybeans were purified with gel filtration on Sephadex G-75. Significant differences were found in the content and in the electrophoretic patterns of the purified protease inhibitors. Ten among fourteen electrophoretic bands appeared as protease inhibitors. The chymotrypsin and trypsin inhibiting activities in soybeans showed three and four fold variation respectively. And the cultivars with higher chymotrypsin inhibiting activities seemed to have higher cysteine contents.

서 론

대두는 단백질 공급원으로서 식용이나 사료용으로 널리 이용되고 있으나, 이용상 영양학적 측면의 문제점으로는 항영양인자들이 존재한다는 것과¹⁾ 황함유 아미노산이 부족한 점이다^{2,3)}.

1965년의 FAO 기준에 의한 whole egg protein의 황함유아미노산 함량은 총 필수아미노산 함량의 약 10.7%인 반면 대두는 약 7.4%로서 황함유아미노산 함량이 영양학적 균형의 제일 문제점으로 제시되고 있다⁴⁾. 대두의 황함유아미노산 함량은 종실 전단백질의 약 2%인데^{5,6)} 이는 주 저장단백질인 glycinin, conglycinin에서 유래된 것보다는 종실 전단백질의 약 6%밖에 차지하지 않는다^{7,8)} protease inhibitor에 포함된 것으로 이 inhibitor 단백질은 총 황함유아미노산의 약 50%를 차지하고 있다⁷⁾. 대두의 protease inhibitor는 최초로 발견된 Kunitz inhibitor⁹⁾ 외에도 Bowman-Birk inhibitor 등^{10,11)} 7~10가지의 iso inhibitor가 발견

되었다^{12,13)}. 이러한 protease inhibitor 외에도 Bowman-Birk inhibitor의 추출 및 정제시 이와함께 발견되는 다른 iso inhibitor가 있으며¹⁴⁾ 이들을 Bowman-Birk형 protease inhibitor로 명명하고 있다. Kunitz inhibitor와 Bowman-Birk inhibitor의 차이점은 분자량이 다른 이외에도 열이나 산, 알칼리 처리의 영향을 보면 Bowman-Birk inhibitor가 더 안정하게 나타나고 있으며^{15,16)} trypsin 저해활성도에 대한 chymotrypsin 저해활성도의 비도 Kunitz inhibitor의 경우 0.12인 반면 Bowman-Birk inhibitor에서는 0.73으로 보고되고 있어¹⁷⁾ Bowman-Birk inhibitor가 훨씬 높게 나타나고 있다. 또한 cysteine 함량에 있어서도 현저한 차이를 나타내는데 Bowman-Birk inhibitor에서는 mole당 14 residues를 함유하고 있어 Kunitz inhibitor의 mole당 4 residues보다 3배 이상이 높다. Bowman-Birk형의 다른 iso inhibitor의 경우 분자량은 7,000~8,000으로 발표되고 있으나 Bowman-Birk inhibitor에서 높게 나타나는 chymotrypsin 저해활성도에 대하여는 보고된 바 없고 cysteine 함량은 mole당 10~14 residues로서 Kunitz inhibitor 보다는 훨씬 높은 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾.

1989년 2월 10일 수리

Corresponding author : S.I. Kim

이상의 발표를 종합하여 보면 대두에서 부족되는 황함유아미노산중 cysteine 함량은 protease inhibitor 중에서도 Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량에 많은 영향을 받는다고 생각할 수 있다. 또한 Bowman-Birk형 protease inhibitor가 많은 품종이라면 일차적으로 chymotrypsin 저해활성도가 높을 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 대두의 황함유 아미노산중 cysteine 함량이 많은 품종을 선별하기 위한 간단한 방법을 찾아보기 위하여 우선 chymotrypsin 저해활성도의 품종간 차이 및 8가지 품종에서 Bowman-Birk형 protease inhibitor들의 전기영동양상과 함량을 조사하였으며 각 품종의 cysteine 함량을 분석하여 이들의 상관관계를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

대두시료

서울대학교 농과대학 농학과에서 수집, 보관중인 품종중에서 Kunitz형 protease inhibitor가 없는 금두¹⁾를 포함하여 장려품종, 재래종 및 외국도입품종 등 30품종을 선별하여 1986년에 수확한 종자를 실험실에 보관하면서 분석시료로 사용하였다.

품종별 protease 저해활성도 측정을 위한 추출

대두시료 분말 0.2g에 0.092M Tris-HCl buffer (pH 8.1) 1.2ml를 넣고 10시간 교반후 2,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 상등액을 저해활성도 측정의 추출액으로 하였다.

Protease 저해활성도 측정

Trypsin 저해활성도는 Kakade²⁾의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 시료용액에 0.092M Tris-HCl buffer(pH 8.1)를 가하여 1ml로 하고 0.005% trypsin용액 1ml를 가한 다음 37°C에서 기질로 0.03% Na-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA) 용액 4ml를 첨가하여 10분간 유지하고 30% acetic acid 용액 1ml를 가하여 반응을 중지시켰다. Trypsin에 의한 BAPNA의 분해정도는 유리된 p-nitroaniline의 양을 410nm에서 흡광도로 측정하였고 trypsin 저해활성도는 protease inhibitor가 없는 reference 용액의 흡광도를 기준으로 하여 % trypsin inhibiting activities(% T.I.A.)로 나타내었으며 이는 다음과 같이 산출하였다.

$$\% \text{ T.I.A.} = \frac{(\text{A reference} - \text{A sample})}{\text{A reference}} \times 100$$

A : 410nm에서의 흡광도

Chymotrypsin 저해활성도는 Obara³⁾의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 시료용액에 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)를 가하여 1ml로 하고 0.003% chymotrypsin용액 1ml를 가한 다음 37°C에서 1% casein용액 2ml를 첨가해서 20분간 반응시킨 후 6% TCA용액 5ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 1시간 동안 정치시켜 침전물을 가라앉힌 후 여과하여 280nm에서 여액의 흡광도를 측정하였다. Chymotrypsin 저해활성도 역시 trypsin 저해활성도와 같은 방법인 % chymotrypsin inhibiting activities(% C.I.A.)로 표시하였다.

Crude Bowman-Birk형 protease inhibitor의 제조

Frattali⁴⁾ 방법을 일부 수정한 본 실험실의 방법²⁰⁾에 따라 다음과 같이 제조하였다. 즉, 대두시료를 0.25% H₂SO₄ 용액으로 2차 추출한 후 상등액에 ethanol을 첨가하여 60% 용액으로 하고 원심분리후 상등액을 acetone으로 70%가 되게 가하여 생성되는 침전물을 crude Bowman-Birk형 protease inhibitor로 하였다.

Bowman-Birk형 protease inhibitor의 정제

Crude Bowman-Birk형 protease inhibitor 1g을 0.076M Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹여 상법에 따라 준비한 Sephadex G-75 column(2×100cm)에 주입하였으며 30ml/hr의 속도로 용출시켜 5ml씩 받은 후 280nm에서의 흡광도와 protease 저해활성도를 측정하였다²¹⁾. Protease 저해활성도를 기준으로 한 각 분획은 서로 모아 증류수에서 투석후 냉동건조하였으며 Bowman-Birk형 protease inhibitor함량은 각 peak의 면적을 산출하여 그 비율로써 계산하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

전기영동은 acrylamide의 농도를 10%로 하고 vertical type의 slab gel(16×17×0.2cm)을 사용하여 Payne²²⁾ 방법을 일부 수정하여 행하였다. 전기영동후 각 band의 함량은 Toyo사의 Digital Densitrol DMU-33C densitometer를 이용하여 측정하였으며 integrator에 나타난 각 peak의 면적

미로 그 함량을 계산하였다. 각 band의 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도는 gel을 2mm씩 잘라서 0.092M Tris-HCl buffer(pH 8.1) 5ml가 든 시험관에 넣고 마쇄한 후 4°C에서 12시간 이상 방치하여 gel속에 있는 단백질을 추출하고 추출액을 시료로 하여 검정하였다.

Cysteine 함량측정²³⁾

Cysteine함량은 LKB사의 LKB 4150 Alpha 아미노산 분석기를 이용하여 측정하였다. 전처리 과정으로서 대두시료 40mg에 performic acid mixture 2ml를 넣고 4°C에서 16시간 방치한 다음 0.3 g NaHSO₃를 넣어 과잉의 performic acid를 제거하고 3ml의 6N HCl을 넣은 다음 110°C oven에서 18시간 동안 가수분해하였다. 실온으로 냉각후 0.2N sodium citrate buffer(pH 2.2)로 10ml까지 희석한 다음 0.2μm membrane filter로 여과한 여액 40μl를 column에 주입하였다.

결과 및 고찰

품종별 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도

대두 30품종의 chymotrypsin 저해활성도와 trypsin 저해활성도 및 이들 저해활성도의 비율은 Table 1에 나타내었다. 종실 g당 chymotrypsin 저해활성도는 52,000~15,225로 품종간에 약 3배의 차이를 보였고, trypsin 저해활성도는 164,700~37,500으로 약 4배의 차이를 보였다. Chymotrypsin 저해활성도가 높은 품종이 반드시 trypsin 저해활성도 또한 높은 것은 없어서 trypsin 저해활성도에 대한 chymotrypsin 저해활성도의 비로(C.I.A./T.I.A.) 나타내면 chymotrypsin 저해활성도 순서와 같은 경향을 보이지는 않았다. 이는 chymotrypsin 저해활성도나 trypsin 저해활성도가 다른 여러 종류의 protease inhibitor가 대두 품종마다 다르게 존재하는 것을 의미하며 이들의 함량도 차이가 나는 것에 기인한다고 추정된다.

Chymotrypsin 저해활성도를 기준으로 하여 30 품종중 상대적으로 높은 활성도를 갖는 것, 중간 활성도를 갖는 것, 낮은 활성도를 갖는 품종 각각 2개와 금두 및 금산종을 비교시료로 하여 총 8 품종의 단백질 함량을 측정하여 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도를 단백질 g당으로 환산한 값은 Table 2에 나타내었다. Chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도를 단백질 g당으로 환산하여 본

결과 chymotrypsin 저해활성도는 158,662~40,033으로, trypsin 저해활성도는 500,608~120,347로 계산되었다. 단백질 함량은 31~39%로 품종간 차이가 크게 나타났으나 단백질 g당 chymotrypsin 저해활성도의 순서는 종실 g당으로 계산한 순서와 동일하게 나타나서 3배 이상의 차이를 보이고 있다.

Bowman-Birk형 protease inhibitor의 추출

8 품종의 대두로부터 Bowman-Birk형 protease inhibitor를 추출한 후 acetone으로 침전, 건조한 다음 수율을 측정한 결과 종실 30g으로부터 1.64~2.08g의 crude Bowman-Birk형 protease inhibitor를 얻었다(Table 3). 이들의 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도를 측정한 결과 crude Bowman-Birk형 protease mg당 chymotrypsin 저해활성도는 48.72~86.74, trypsin 저해활성도는 152.96~341.16으로 품종간에 차이를 보였으나 단백질 g당 chymotrypsin이나 trypsin 저해활성도와는 상관관계가 없었다(Table 4).

Bowman-Birk형 protease inhibitor의 정제 및 함량비교

8 품종의 crude Bowman-Birk형 protease inhibitor를 Sephadex G-75를 사용, gel-filtration한 결과는 8 품종 모두 세계의 peak를 나타내었으며 이중 fraction II에서만 protease 저해활성도가 나타났다(Fig. 1). 따라서 fraction II를 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor로 하였다. Sephadex column에 주입된 시료 1g당 총 peak면적을 구하고 또한 각 fraction의 peak면적을 구하여 이들의 면적비로써 crude Bowman-Birk형 protease inhibitor내에 존재하는 fraction I, II, III의 함유량을 계산한 결과는 Table 5에 나타내었다. 단백질 100g당 fraction I은 0.06~2.53g, fraction II는 6.69~11.55g으로 품종간에 큰 차이를 보이고 있으나 품종간 chymotrypsin 저해활성도의 순서와는 상관관계가 없었다. 반면 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor인 fraction II는 chymotrypsin 저해활성도와 같은 경향을 보였다. 즉, chymotrypsin 저해활성도가 가장 높은 LC 7712가 단백질 100g당 9.36g으로 가장 많았고, chymotrypsin 저해활성도가 낮아지는 순서로 점차 줄어 chymotrypsin 저해활성도가 낮은 LC 7812는 6.67g으로 가장 적었다.

Table 1. Chymotrypsin and trypsin inhibiting activities of soybean cultivars

	Ti ^a	Ti ^b	% C.I.A.** g seed	% T.I.A.*** g seed	% C.I.A. % T.I.A.
LC 7712*	0		52,200	164,700	0.316
LC 7607	0		45,900	154,200	0.298
LC 7603	0		45,750	147,900	0.309
LC 7616	0		44,700	131,100	0.341
LC 7822	0	0	43,350	159,900	0.271
LC 7614	0		39,975	102,300	0.391
LC 7703	0		36,675	116,400	0.315
LC 7876	0		34,425	109,200	0.315
LC 7701	0		34,425	107,100	0.321
LC 7758	0		33,075	90,300	0.366
LC 8101	0		30,525	105,000	0.291
Hwanggeum	0		29,475	70,800	0.416
LC 7863	0		26,700	79,200	0.337
LC 7801	0		24,975	74,400	0.336
LC 7865	0	0	24,975	73,500	0.340
LC 7857	0		24,675	93,300	0.264
LC 7821	0		24,675	112,800	0.213
LC 7609	0		23,925	67,350	0.310
Backwhadaeyujin	0		23,925	77,100	0.310
Baegun	0		22,425	86,100	0.260
LC 7859	0		22,200	77,700	0.286
Paldal	0		21,900	75,600	0.290
LC 7815	0	0	21,675	80,700	0.269
LC 7825	0	0	21,675	91,800	0.236
LC 7812	0		18,300	77,700	0.236
LC 7828	0		15,525	77,100	0.201
Geumdn	·	·	15,225	37,500	0.406
Geumsanjong	0	0	28,885	79,200	0.365

*LC : Local culture
 **C.I.A. : Chymotrypsin inhibiting activities
 ***T.I.A. : Trypsin inhibiting activities
 Ti^a, Ti^b : Kunitz type iso inhibitors

정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor의 저해활성도

정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor mg 당 chymotrypsin 저해활성도는 단백질 g 당 저해활성도가 높은 LC 7712, LC 7607 품종에서 높게 나타나 각각 1629와 1726이었고 저해활성도가 낮은 LC 7812 품종에서는 1054로 가장 낮아 단백질

g 당 chymotrypsin 저해활성도와 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor의 저해활성도 순서가 동일하였다(Table 6).

그러나, trypsin 저해활성도의 경우 단백질 g 당 trypsin 저해활성도와 마찬가지로 chymotrypsin 저해활성도와 같은 경향을 보이지 않고 있어 C.I.A./T.I.A.도 chymotrypsin 저해활성도 순서와 같은 경향이 아님을 알 수 있다.

Table 2. Protein content and protease inhibiting activities of 8 soybean cultivars

Soybeans	Protein* content(%)	% C.I.A. g protein	% T.I.A. g protein	% C.I.A. % T.I.A.
LC 7712	32.90	158,662	500,608	0.316
LC 7607	37.07	123,820	415,969	0.298
LC 7758	35.72	92,595	252,799	0.366
LC 7101	36.37	83,929	288,699	0.291
LC 7812	34.37	52,480	222,827	0.236
LC 7828	38.78	40,033	198,913	0.201
Geumdu	31.16	48,882	120,347	0.406
Geumsanjong	34.84	82,908	227,324	0.365

* Nitrogen to protein conversion factor : 5.63
Nitrogen contents were determined by Kjeldahl method

Table 3. Content of crude Bowman-Birk type protease inhibitors in 8 soybean cultivars

g/30g seed							
LC 7712	LC 7607	LC 7758	LC 8101	LC 7812	LC 7828	Geumdu	Geumsanjong
2.01	2.04	1.99	1.85	1.64	2.08	1.77	1.70

Table 4. Chymotrypsin and trypsin inhibiting activities of crude Bowman-Birk type protease inhibitors

	% C.I.A. mg sample	% T.I.A. mg sample	% C.I.A. % T.I.A.
LC 7712	57.02	243.12	0.235
LC 7607	71.28	278.44	0.256
LC 7758	48.72	215.68	0.226
LC 8110	83.50	278.44	0.300
LC 7812	85.03	341.16	0.249
LC 7828	62.59	152.96	0.409
Geumdu	82.48	274.52	0.300
Geumsanjong	86.74	333.32	0.260

Table 5. Content of purified Bowman-Birk type protease inhibitors in 8 soybean cultivars

g/100g protein								
	LC 7712	LC 7607	LC 7758	LC 8101	LC 7812	LC 7828	Geumdu	Geumsanjong
I	0.52	0.35	1.06	0.60	2.53	0.75	0.06	0.23
II*	9.36	8.07	7.78	7.86	6.67	7.71	7.35	7.69
III	10.49	9.93	9.69	8.47	6.69	9.41	11.55	8.32
Total	20.37	18.35	18.53	16.93	15.89	17.87	18.96	16.24

* : Purified Bowman-Birk type protease inhibitors(fraction II on Sephadex G-75)

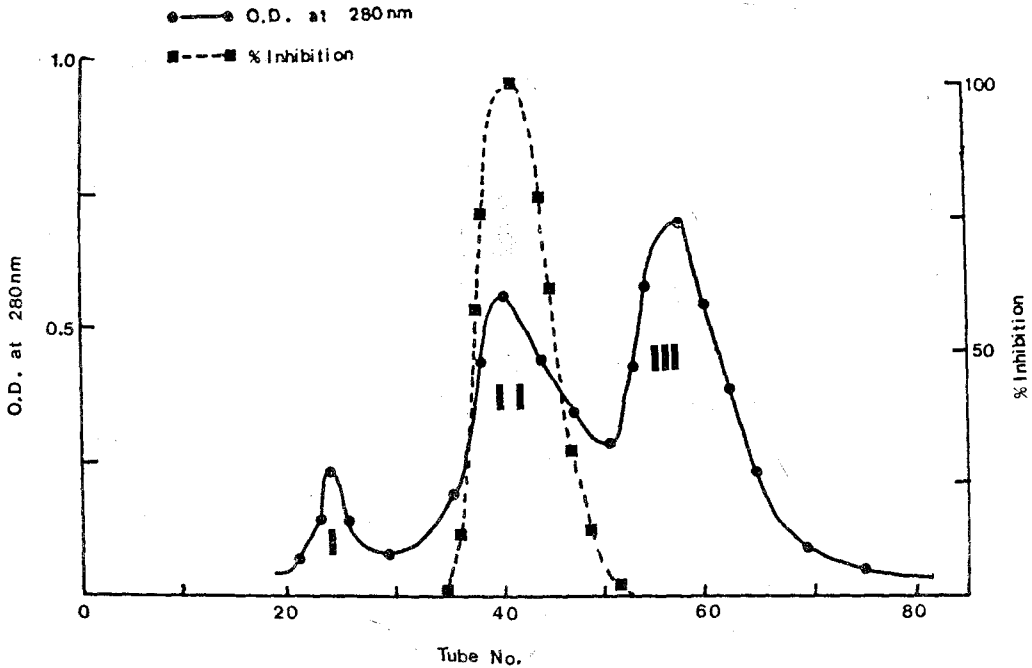


Fig. 1. Sephadex G-75 gel filtration of crude Bowman-Birk type protease inhibitors from Geum-du

Table 6. Chymotrypsin and trypsin inhibiting activities of purified Bowman-Birk type protease inhibitors

Soybean	% C.I.A. mg sample	% T.I.A. mg sample	% C.I.A. % T.I.A.
LC 7712	1629	3294	0.495
LC 7607	1726	2850	0.606
LC 7758	1364	1819	0.750
LC 8101	1393	3710	0.375
LC 7812	1054	986	1.069
LC 7828	1425	2642	0.539
Geumdu	1184	1610	0.735
Geumsanjong	1319	2588	0.510

품종별 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor의 전기영동양상

8 품종의 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor의 전기영동양상에 대한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 전기영동결과 8 품종에서 총 14개의 이동속도가 다른 band가 나타났으며 1~8번까지의 major band는 LC 7828 품종을 제외한 7 품종에서 볼 수 있었으나 그들의 함량은 착색정도로 보아 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 8 품종중 특

특한 것은 LC 7828 품종으로 5번 band가 없고 대신 4번과 5번 band 사이에 다른 품종에는 없는 band가 존재하였으며(4'') minor band의 경우 1' band는 금산중, LC 7712, LC 7607, LC 7758, LC 7812에서, 2' band는 금산중, LC 7758, LC 7828, LC 8101, 금두에서, 4' band는 금산중, LC 7712, LC 7828, 금두에서만 나타났고, 7' band는 8 품종 모두에서 보유하는 등 품종간에 전기영동양상이 차이가 있음을 보여주고 있다.

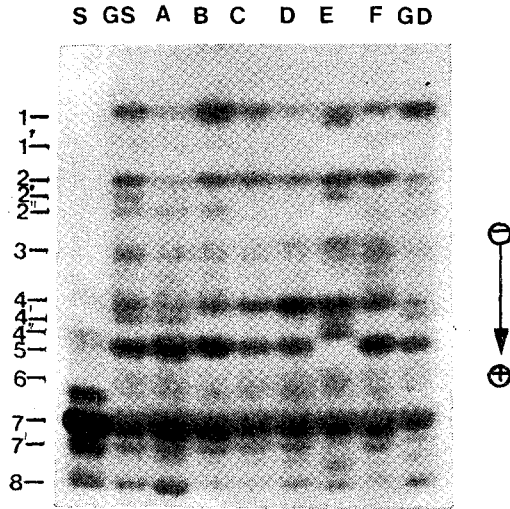


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoregram of fraction II on Sephadex G-75

S : Standard Kunitz trypsin inhibitor
 A : LC 7712 B : LC 7607
 C : LC 7758 D : LC 8101
 E : LC 7828 F : LC 7812
 GD : Geumdu GS : Geumsanjong

전기영동 band의 protease 저해활성도 검정

8 품종의 각 band중에서 어떤 band가 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도를 보유하는지 알기 위해서 전기영동후 gel을 2mm씩 자른 다음 단백질을 추출하고 이들의 protease 저해활성도를 측정 한 결과는 Table 7에 나타내었다. 총 14개의 band 중 1, 2, 2', 2'', 3, 4, 4'', 5, 6, 7의 10개 band가 protease 저해활성도를 가지고 있어 이들을 isoINHIBITOR로 명명하였으며 나머지 1', 4', 7', 8은 저해활성도가 없었다. 10개의 isoINHIBITOR 중 LC 7712는 band 2, 3, 4, 5, 6, 7을, LC 7607은 1, 2, 2', 3, 4, 5, 6, 7을, LC 7758 및 LC 8101은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7을, LC 7812는 2, 4, 5, 6, 7을, LC 7828은 1, 2, 2', 3, 4, 4'', 6, 7을, 금두는 2, 3, 4, 6, 7을, 금산중은 1, 2, 2', 3, 4, 5, 6, 7을 보유하는 등 품종간에 많은 차이를 보였다. 10개의 isoINHIBITOR 중 chymotrypsin 저해활성도가 있는 것은 2, 2', 3, 4', 6, 7이었으며 band 7의 경우 다른 band에 비해 chymotrypsin 저해활성도가 훨씬 높기 때문에 이 band의 함량이 대두 종실의 전체 chymotrypsin 저해활성도에 영향을

Table 7. Protease inhibiting activities of the electrophoretic bands of purified Bowman-Birk type protease inhibitors in 8 soybean cultivars

		1	1'	2	2'	2''	3	4	4'	4''	5	6	7	7'	8
LC 7712	C	○	○	○	·	○	○	○	○	·	○	+	≡	○	○
	T	○	○	≡	·	○	≡	≡	○	·	≡	≡	≡	○	○
LC 7607	C	○	○	○	·	+	+	○	·	·	○	+	≡	○	○
	T	+	○	≡	·	+	+	≡	·	·	≡	≡	≡	○	○
LC 7758	C	○	○	○	○	·	+	○	·	·	○	+	≡	○	○
	T	≡	○	≡	○	·	≡	≡	·	·	≡	≡	≡	○	○
LC 8101	C	○	·	○	○	·	+	○	·	·	○	+	≡	○	○
	T	+	·	≡	○	·	+	≡	·	·	≡	≡	≡	○	○
LC 7812	C	○	○	+	·	○	○	○	·	·	○	+	≡	○	○
	T	○	○	≡	·	○	○	≡	·	·	≡	≡	≡	○	○
LC 7828	C	○	·	○	○	·	○	○	○	≡	·	+	≡	○	○
	T	≡	·	≡	≡	·	≡	≡	○	≡	·	≡	≡	○	○
Geumdu	C	○	·	+	○	○	+	○	○	·	○	+	≡	○	○
	T	○	·	+	○	○	○	≡	○	·	≡	≡	≡	○	○
Geumsanjong	C	○	○	○	+	○	+	○	○	·	○	+	≡	○	○
	T	≡	○	≡	≡	○	≡	≡	○	·	≡	≡	≡	○	○

C : Chymotrypsin inhibiting activities
 T : Trypsin inhibiting activities
 ○ : Band is present, but no inhibiting activities were found
 + : Degree of inhibiting activities

Table 8. Content of isoinhibitors in 8 soybean cultivars

Soybean	g/100g protein										
	1	2	2'	2''	3	4	4''	5	6	7	Total
LC 7712	·	0.505	·	·	0.532	0.571	·	1.100	0.502	1.271	4.481
LC 7607	0.858	0.496	·	0.397	0.523	0.723	·	0.836	0.553	0.979	5.365
LC 7758	0.504	0.445	·	·	0.554	0.745	·	0.669	0.588	0.960	4.465
LC 8101	0.388	0.462	·	·	0.509	0.841	·	0.668	0.638	0.932	4.438
LC 7812	·	0.562	·	·	·	0.599	·	0.698	0.544	0.768	3.171
LC 7828	0.596	0.542	0.280	·	0.753	0.838	0.495	·	0.591	1.086	5.676
Geumdu	·	0.446	·	·	0.417	0.568	·	0.623	0.459	0.732	3.245
Geumsanjong	0.649	0.399	0.208	·	0.614	0.525	·	0.720	0.537	0.838	4.490

미칠 것으로 추정된다.

Isoinhibitor의 함량

앞서 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도로 확인된 10개 isoinhibitor의 함량을 densitometer로 측정하여 단백질 100g당 함유량으로 환산한 결과는 Table 8에 나타내었다. 단백질 100g당 함유량이 band 1은 0.388~0.858g, band 2는 0.399~0.562g, band 3은 0.509~0.753g, band 4는 0.525~0.841g, band 5는 0.623~1.100g, band 6는 0.459~0.638g으로 품종간에 차이를 보이고 있으나 단백질 g당 chymotrypsin 저해활성도와는 상관관계가 없었다. 반면 chymotrypsin 저해활성도가 높은 band 7의 경우 단백질 g당 chymotrypsin 저해활성도의 순서와 같은 경향을 보였으며, 그 함량은 0.768~1.271g이었다. 즉, 단백질 g당 chymotrypsin 저해활성도가 가장 높은 LC 7712 품종이 단백질 100g당 1.271g으로 가장 많았고 그 경향은 chymotrypsin 저해활성도가 낮아짐에 따라 점차 감소하여 단백질 g당 chymotrypsin 저해활성도가 낮은 LC 7812 품종은 단백질 100g당

0.768g이었다. 이는 종실전체의 chymotrypsin 저해활성도가 높은 품종이 여러 isoinhibitor 중에서 chymotrypsin 저해활성도가 높은 isoinhibitor를 많이 함유하고 chymotrypsin 저해활성도가 낮은 품종은 chymotrypsin 저해활성도가 높은 isoinhibitor가 적다는 것을 의미한다.

대두 품종별 chymotrypsin 저해활성도와 Bowman-Birk형 protease inhibitor 및 cysteine 함량과의 관계

Chymotrypsin 저해활성도의 차이가 나는 3품종 대두의 Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량과 cysteine 함량에 대한 결과는 Table 9에 나타내었다. Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량은 LC 7712 품종이 단백질 100g당 9.36g으로 가장 많았고 또한 cysteine 함량도 단백질 100g당 0.1258mmoles로서 가장 높았다. LC 7828 품종의 경우 Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량은 단백질 100g당 7.71g으로 가장 작았고 cysteine 함량 또한 단백질 g당 0.0763mmoles로서 가장 작았다. 이는 chymotrypsin 저해활성도가 높은 품종이

Table 9. Cysteine content and protease inhibiting activities of 3 soybean cultivars

	% C.I.A.* g protein	% T.I.A.** g protein	% C.I.A. % T.I.A.	II*** (g/100g protein)	cystein**** content
LC 7712	158,662	500,608	0.316	9.36	0.1258
LC 7758	92,595	252,799	0.366	7.78	0.0859
LC 7828	40,033	198,813	0.201	7.71	0.0763

* : Chymotrypsin inhibiting activities

** : Trypsin inhibiting activities

*** : Purified Bowman-Birk type protease inhibitors(fraction II on Sephadex G-75)

**** : mmoles/g protein

Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량이 높고 또한 cysteine 함량도 높으며, chymotrypsin 저해 활성도가 낮은 품종은 Bowman-Birk형 protease inhibitor 함량도 낮고 cysteine 함량도 낮을 것이라는 처음의 추정과 일치하는 결과라 하겠다. 이상의 결과로 볼 때 대두 품종간 chymotrypsin 저해활성도와 cysteine 함량간에는 정의 상관관계가 있음을 알 수 있었고 종실 총 chymotrypsin 저해 활성도가 높은 품종은 chymotrypsin 저해활성도가 높은 isoinhibitor를 많이 함유하고 있음이 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 일차적으로 대두 품종간 chymotrypsin 저해활성도를 비교함으로써 cysteine 함량을 간접적으로 추정할 수 있었다. 그러나 이러한 상관관계는 더 많은 품종의 chymotrypsin 저해활성도와 각 품종의 cysteine 함량을 측정, 보다 많은 결과를 비교함으로써 더 명확히 밝혀질 수 있을 것이다.

요 약

대두로부터 추출, 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor 들의 함량과 전기영동양상을 비교하고 정제된 inhibitor내에 존재하는 각 isoinhibitor 들의 함량을 조사하였으며 종실내 총 chymotrypsin 저해활성도와 cysteine 함량과의 관계를 알아 보았다. 8 품종의 대두로부터 Sephadex G-75를 이용하여 얻은 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor들의 함량은 단백질 100g당 6.67~9.36g 으로 품종간에 큰 차이가 있었다. 정제된 Bowman-Birk형 protease inhibitor들의 전기영동 양상은 품종간에 많은 차이를 보였으며 각 band의 함량에도 차이가 있었다. 8 품종의 정제된 inhibitor에서 나타나는 총 14개의 전기영동 band 중 10 개의 band가 protease 저해활성도를 보유하고 그중 chymotrypsin 저해활성도가 높은 것은 band 7이었으며 그 함량은 단백질 100g당 0.768~1.271g 으로 품종간에 차이를 보여 종실내 chymotrypsin 저해활성도가 높은 품종에서 함량이 많았다. 대두 품종별 chymotrypsin 및 trypsin 저해활성도는 각각 종실 g당 52,200~15,225와 164,700~37,500으로 품종간에 3배 및 4배의 차이를 보였고 단백질 g당으로 환산한 값은 158,662~40,033 및 500,608~120,347로서 종실 g당 저해활성도와 같은 경향이었으며 3배 이상의 차이를 보였다. 품종별 cysteine 함량은 단백질 g당 0.1258~0.0763-

mmoles로서 품종간에 차이를 나타내었으며 이는 실내 총 chymotrypsin 저해활성도와 정의상관관계가 있었다.

사 의

본 연구는 (주)선경합섬의 연구비지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Liener, I.E.: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, Academic Press, New York (1969)
2. Fekler, P. and Waines, G.: Anal. Biochem., 87 : 641(1978)
3. Bertagnolli, B.L. and Wedding, R.T.: J. Nutr., 107 : 2122(1977)
4. Smith, A.K. and Circle, S.J.: Soybeans: Chemistry and Technology, Vol. 1 Proteins, 2nd Ed., AVI(1978)
5. Kaizuma, N.: Japan Agricultural Research Quarterly, 13 : 230(1979).
6. Evans, R.J. and Bandemer, S.J.: J. Agr. Food Chem., 15 : 439(1967)
7. Kosuge, T., Meredith, C.P. and Hollaender, A.: Basic Life Science, Vol. 26, Genetic Engineering of Plants, An Agricultural Perspective(1983)
8. Orf, J.H. and Hymowitz, T.: Crop Science, 19 : 107(1979)
9. Kunitz, M.: J. Gen. Physiol., 29 : 149(1949)
10. Frattali, V.: J. Biol. Chem., 244 : 274(1969)
11. Birk, Y., Gertler, A. and Khalef, S.: Biochem. J., 87 : 281(1963).
12. Yamamoto, M. and Ikenaka, T.: J. Biochem., 62 : 141(1967)
13. Rackis, J.J., Sasame, H.A., Mann, R.K., Anderson, R.L. and Smith, A.K.: Arch. Biochem. Biophys., 98 : 471(1962)
14. Hwang, D.L.R., Lin, K.T.D., Yang, W.K. and Foard, D.E.: Biochem. Biophys. Acta, 495 : 369(1977)
15. Bowman, D.E.: Arch. Biochem. Biophys., 16 : 109(1948)

16. Birk, Y. and Gertler, A.: *J. Nutr.*, 75 : 379 (1961).
17. Tan, C.C.L. and Steren, F.C.: *Eur. J. Biochem.*, 18 : 515(1971)
18. Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, E. and Puski, G.: *Cereal Chem.*, 47 : 597(1970)
19. Obara, T., Kimura, M., Kobayashi, T. and Watanabe, Y.: *Cereal Chem.*, 47 : 597(1970)
20. 이홍석, 이석하, 문항식, 나지영, 김수일 : 서울대학교 농학연구, 10 : 107(1985)
21. 김수일, 이홍석 : 서울대학교 농학연구, 11 : 43(1986)
22. Payne, J.W.: *Chromatographic and electrophoretic techniques*, Vol. 2, Zone electrophoresis 4th ed., Heinemann(1976)
23. Mason, V.C., Bech-Anderson, S. and Rude-me, M.: *Proc. 3rd EAAP Symposium on Protein Metabolism and Nutrition*, Vol. 1, (1980)