

# 大豆發芽에 따른 Trypsin Inhibitor Activity와 Protein Pattern의 變化

孫 惠 淑·朴 正 隆·李 盛 雨\*  
嶺南大學校·漢陽大學校\*  
(1977년 2월 20일 수리)

## The Trypsin Inhibitor Activity and Protein Pattern of the Soybean During Germination

Hye-Sook Son, Jyung-Rewng Park, Sung-Woo Lee\*  
Jyung Nam University · Han Yang University\*  
(Received Feb. 20, 1977)

### SUMMARY

This investigation was to determine the changes in the trypsin inhibitor activity(TIA) and electrophoresis patterns of the soybean cotyledon and axis during germination.

The TIA of the cotyledon decreased slightly and that of the axis decreased rapidly to 50% activity after 7 day germination. At the 2nd, 3rd and 4th day's germination the TIA of the defatted dry axis was higher than that of cotyledon. However, the TIA of the fresh cotyledon was lower than that of the axis, due to its higher moisture content.

Results from the electrophoretic studies showed that band 1 (polymer, 15S etc.), 2 (11S), and 3(7S) which are the major reserve proteins of soybean were decreased considerably in cotyledon and axis and the fragments with Rm values between 0.5 and 1.0 were increased and band 5 showed up during germination. The band 4 of the cotyledon and band 6 of axis were not changed during germination. Generally speaking, the TIA and the reserve protein decreased as germination proceeded.

### 緒 論

우수한 식물성 단백질 원이 되는大豆에 있어서 몇가지 영양상 缺點중의 하나가 성장을 감소등 生體에 나쁜 영향을 주는 trypsin inhibitor가 있다는 점이다.

大豆의 trypsin inhibitor는 1917년 Osborne과 Mendel<sup>(24)</sup>의 연구에 의해 처음으로 관심을 모으기 시작한 이래 여러 연구자들에 의해 自然界의 分布, <sup>(10,13,23)</sup> 일반적 性質, <sup>(10,14,17,21)</sup> 分離 및 精製 <sup>(2,20,25,20)</sup> 生體에 미치는 영향 <sup>(3,9,15,22)</sup> 등이 연구되어왔다. 그러나 한국인의 기호식품인 콩나물의 原理인 大豆의 發芽에 따른 그 活性의 變化에 관한

보고는 發表되지 않았다.

그리고 Tombs<sup>(30)</sup>와 Catsimpoolas<sup>(5,6,8)</sup> 등이 大豆의 단백질을 전기영동에 의해 몇개의 bands로 분리했으며 우리나라에서는 변등<sup>(4)</sup>이 solubility에 따라 분리한 보고가 있다. 그리고 Catsimpoolas<sup>(7,8)</sup> 등은 大豆의 發芽에 따른 electrophoresis pattern을 연구했으나 자엽과 배축을 구분하지 않았다.

trypsin inhibitor가 植物生體內에서 단백질 代謝調節에 결정적인 역할을 하며 貯藏단백의 合成이 이루어지고 있는 동안에 단백질분해효소의 inhibitor로 작용한다는 발표가 있었으므로 본 실험에서는 大豆發芽에 따른 trypsin inhibitor activity와 protein pattern의 變化에 관하여 조사함과 아

올려 그 상관관계를 살펴보기 위한 목적으로 시도하였다.

### 實驗材料 및 方法

1. 실험재료 ; 1973년에 추수한 大豆를 처음 2時間 30분동안 물에 담궈서 건진 후 30°C 暗室에서 發芽시켰고 1일 6회 注水하였다. 分析에 사용된 試料는 幼根을 자른 뒤 자엽과 배측으로 구분하였다 (제 2일부부터).

2. 수분정량 ; 常法에 준해서 했다.

3. Trypsin inhibitor activity(TIA)의 측정 ;

a. Trypsin inhibitor solution의 조제 ; -50°C에서 冷凍저장한 試料를 진공감압건조기를 써서 0°~10°C에서 건조시킨 후 25 mesh sieve를 통과하도록 마쇄한 뒤 soxhlet장치를 사용하여 석유 ether로 4시간 脫脂한 후 건조시켜서 만든 defatted dry sample<sup>4</sup> 1g에 0.1M Sörensen phosphate buffer(pH 7.6) 100ml를 첨가하여 室溫에서 30분간 진탕한 뒤 2500r.p.m.으로 10분간 원심분리하여 그 상등액을 여과한 filtrate를 바로 inhibitor activity 측정에 사용하였다.

b. Trypsin inhibitor activity의 측정

Kunitz<sup>(10)</sup>의 TIA trypsin standard 측정법에 준해서 하였다. activity curve는 trypsin(Wako Pure Chemical Ind., Japan) 30mg, 90mg, 150mg, 210mg 그리고 270mg을 각각 0.0025NHCl로 녹여 100ml가 되게 채운 후 1ml를 취하여 그 activity를 測定하였다.

이때 trypsin inhibitor solution 대신에 0.1M Sörensen phosphate buffer(pH 7.6)를 썼으며 blank는 trypsin을 넣지 않은 0.0025N HCl용액을 사용했다.

4. Electrophoresis에 의한 大豆단백질의 分離 ; T.I.A. 측정時 사용한 defatted dry sample中 자엽 부위는 1g에 10ml의 buffer solution (barbiturate buffer, i.s.; 0.075, pH 8.6)을 넣은 후, 또 배측 부위는 0.5g에 동일한 buffer 10ml를 넣어 1시간 방치한 후, 각각 40분간 저어서 30분간 2500r.p.m.으로 원심분리한 상등액을 여과하여 그 filtrate를 전기영동을 위한 sample solution으로 삼았다.

자엽부위는 위의 액 0.25 $\mu$ l, 배측부위는 1.25 $\mu$ l를 cellulose acetate membrane에 적은 후 Microzone Electrophoresis Cell (Beckman Model R-101)에서 40분간 250V로 영동시켰다. 그 후 즉시 Ponceau-S fixative dye solution (0.2% ponceau-S stain, 3.0

% trichloroacetic acid 그리고 3.0% sulfosalicylic acid)에 10분간 염색한 뒤 5% acetic acid로 2~3회 세척했다. 室溫에 방치 건조한 위의 membrane을 Microzone Densitometer에서 scanning하였다.

5. 통계 처리.

Randomized block design을 사용하여 처리구간의 有意性을 검정했으며 平均值간의 有意性은 Duncan's New multiple range test에 의해서 했다. (27, 28)

### 結果 및 考察

大豆는 發芽 제 2일부부터 급격히 成長했으며 食用 適期 16일 發芽 제 7일에는 15~20cm가 되었고 이때 水分함량은 자엽은 약 70%, 배측은 약 97%에 달하였다.

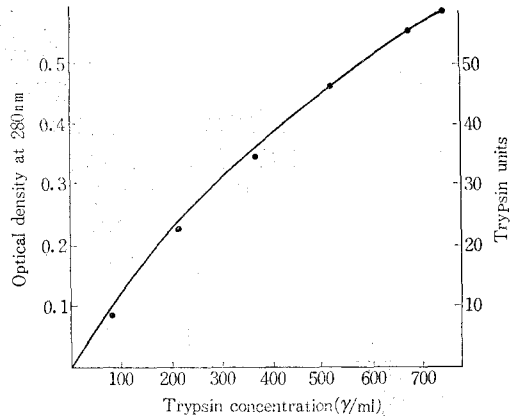


Fig. 1. Standard Trypsin Activity Curve by Kunitz Casein Digestion Method. Trypsin Units (T.U.); An increase of 0.01 absorbance units at 280nm in 20 min. per 5ml of reaction mixture. (1cm width cell)

1. Trypsin inhibitor activity의 변화 standard trypsin activity curve는 Fig. 1과 같았으며 20분간 digestion시킨 뒤 280nm에서 흡광도가 0.01 증가하는 것을 1 trypsin unit (T.U.)로 나타내었다 (10) 여기서 同一한 흡광도를 나타내게 하기 위해서 Kunitz<sup>(10)</sup>에 비해서는 아주 많은 량, Kakade<sup>(19)</sup>에 비해서는 다소 많은 량의, trypsin이 소모됐는데 그것은 본 실험에서 사용했던 trypsin의 純度가 낮기 때문이라고 思料된다. 그러나 TIA는 trypsin units inhibited (TUI)로 표시되기 때문에 trypsin의 純度와는 상관없다. (19) trypsin 濃度에 따른 trypsin의 specific activity 즉 1g의 trypsin이 나타내는 T.V.의 변화는 Fig. 2와 같다. trypsin용액의

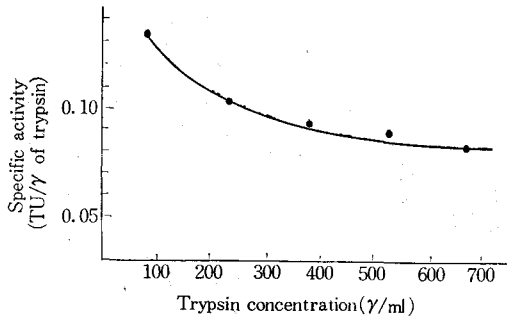


Fig. 2. The Specific Activity of Trypsin

농도가 낮은 경우에는 높은 specific activity를 보이지만 trypsin농도가 증가함에 따라 감소해서 375, 526, 675,  $\gamma$ /ml의 농도에서는 거의 일정해지는데 75 $\gamma$ /ml 농도를 기준으로 해서 볼 때 675 $\gamma$ /ml의 농도는 36%가 감소했다.

이론적으로 trypsin용액의 농도에 따른 specific activity는 일정해야하지만 實際에 있어서는 그렇지 못하며 Kakade등<sup>(10)</sup>의 실험에서는 본 실험에서와 거의 같은 범위의 흡광도를 변화시키는 trypsin의 농도에서 50%나 감소했다. 그러므로 이런 결론이 완전히 제거될 수 있는 substrate의 개발이 요구되어진다. 본 실험에서의 TUI측정은 trypsin의 농도와 상관없이 다소 일정한 specific activity를 유지하는 375와 525 $\gamma$ /ml의 농도에서 행했다.

자엽과 배측에 있어서 發芽日數에 따른 TIA의 변화는 (Table 1) 통계적으로 유의성이 있었으며 ( $p < 0.05$ ), 자엽에서 TIA는 發芽함에 따라 연속적으로 감소하지는 않았으나 發芽 前半期인 제1, 2, 3일과 發芽 後半期인 제4, 5, 6, 7일로 구분해서 봤을 때 약간 감소하는 경향을 보였으며 식용적기인 發芽 제7일에는 원료大豆의 95%의 TIA를 나타내

었다.

배측에 있어서는 發芽함에 따라 TIA가 급격히 減少하여 發芽 제7일에는 發芽 제2일의 50%이하로 떨어졌는데 이것은 Honavar등<sup>(10)</sup>이 행한 실험에서 inhibitor 농도가 young tissue에서는 높으나 older tissue에는 낮다는 관찰과 일치했다.

그리고 fresh sample의 TUI는(Fig. 3) defatted dry sample로부터 수분함량에 준해 계산된 數值인

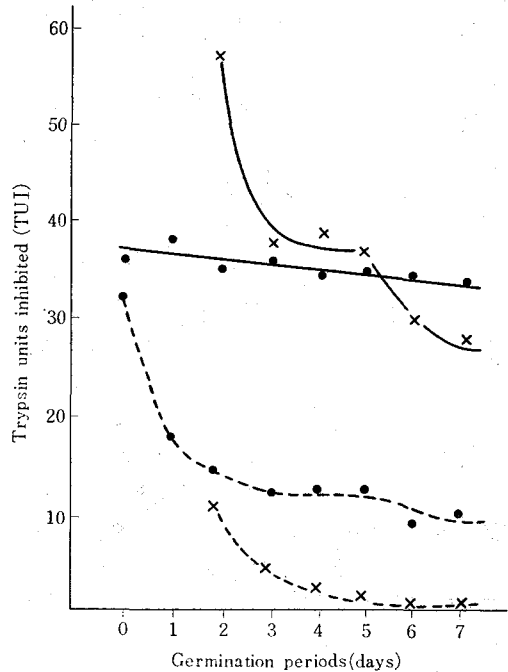


Fig. 3. Changes in the Trypsin Inhibitor Activity of the Defatted Dry Sample and the Fresh Sample of Cotyledon and Axis of the Soybean During its Germination

Table 1. Changes in the Trypsin Inhibitor Activity of Cotyledon and Axis of the Soybean during its Germination.<sup>1,2)</sup>

Germination periods	Cotyledon		Axis	
	375 $\gamma$ /ml	525 $\gamma$ /ml	375 $\gamma$ /ml	525 $\gamma$ /ml
0	31.0 <sup>b</sup>	41.7 <sup>b</sup>	—	—
1	32.4 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	—	—
2	30.7 <sup>b,c</sup>	41.4 <sup>b,c,d</sup>	49.3 <sup>a</sup>	67.8 <sup>a</sup>
3	31.8 <sup>a</sup>	40.6 <sup>a,f</sup>	32.2 <sup>c</sup>	43.8 <sup>c</sup>
4	29.8 <sup>d,e</sup>	40.1 <sup>a,f</sup>	33.7 <sup>b</sup>	44.5 <sup>b</sup>
5	30.2 <sup>c,d</sup>	41.6 <sup>b,c</sup>	31.1 <sup>d</sup>	42.7 <sup>d</sup>
6	30.3 <sup>c,d</sup>	40.7 <sup>d,e</sup>	23.7 <sup>e</sup>	32.3 <sup>e</sup>
7	30.0 <sup>c,d</sup>	40.6 <sup>a,f</sup>	26.0 <sup>f</sup>	30.7 <sup>f</sup>

1) Expressed as TUI\* per 1g defatted sample in 100ml buffer.

2) Means of three observations.

\* TUI; Trypsin Units Inhibited.

테 발아함에 따라 수분흡수가 급격히 증가하기 때문에 이에 따라 심한 減少를 보였다. 食用適期인 發芽에 함유된 제7일의 100ml buffer의 1g fresh sample TUI는 자엽에서는 11.0이었으며 배측은 수분함량이 자엽에 비해 더 높으므로 그것의 약 1/10에 해당되는 0.9였다. 그리고 defatted dry sample에서 배측은 높은 TUI를 나타냈으며 특히 발아제 2, 3, 4일에는 자엽보다 더 높은 活性을 보여줬으나 배측의 수분함량이 자엽에 비해 많기 때문에 fresh sample當 TUI는 자엽보다 낮았다.

위에서 보는 바와같이 發芽大豆의 食用適期인 발아 제7일에도 TIA가 높은 량 잔존하기 때문에 콩나물의 加熱 및 調理方法이 문제시된다고 생각된다.

## 2. 大豆發芽에 따른 단백질의 Electrophoresis Pattern의 변화.

예비실험에서 phosphate buffer<sup>(4)</sup> (i.s.; 0.075, pH 7.6)로 展開시킨 결과는 barbiturate buffer<sup>(1)</sup> (i.s.; 0.075, pH 8.6)로 실시한 것에 비하여 오히려 분리가 좋지않아 barbiturate buffer만을 사용하였다.

原料大豆와 發芽 제2일의 배측의 electrophoresis pattern와 그것의 densitometer trace (Fig. 4)에서 볼 때 start line에서 ⊕방향으로 당겨간 것에 차례로 1, 2, 3, 4, 5, 6의 band(peak) 번호를 붙이고 relative mobility(Rm)値와 함량비에 준해 문헌에 의하여<sup>(8,11,30)</sup> band (peak) 1을 15S 등의 polymer, band(peak) 2를 glycinin 즉 11S (MW 약 340,000), band peak) 3을 7S(MW 약 170,000)로 작

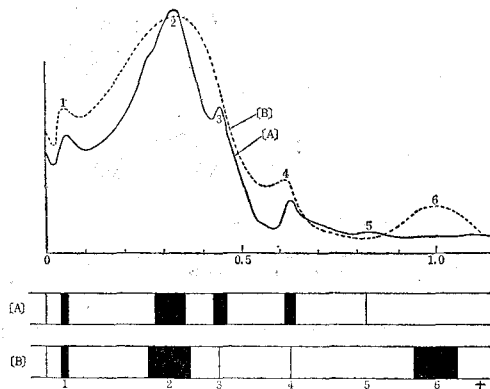


Fig. 4. Electrophoresis Pattern and its Densitometer Trace

작 추정하였다.

Fig. 5에서 보는 바와같이 大豆가 發芽함에 따라 자엽부위에서는 band 1 즉 15S 등의 polymer가 차츰 減少하여 發芽 제4일이 되었을때 없어졌으며 band 2, 즉 11S와 band 3 즉 7S 등의 大豆의 主要貯藏단백질이 차츰 감소했다. 그리고 Rm値 0.5~1.0 사이에 빨리 ⊕쪽으로 당겨가는 물질들이 生成되었으며 특히 原料大豆에서는 거의 보이지 않는 band가 점점 뚜렷해졌다. 발아 제5, 6, 7일이 되었을 때 Rm値 0.6~1.0 사이가 퍼진 것같이 염색되었는데 이것은 효소가 저장단백질을 "random"하게 분해시켰기 때문이고, 또 분해된 subunit가 "random"하게 회합되었기 때문으로 보여진다<sup>(8)</sup>

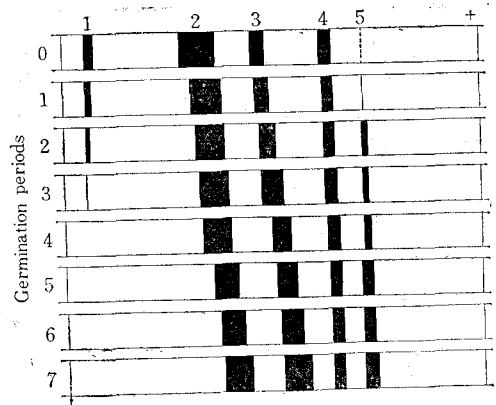


Fig. 5. Electrophoresis Pattern of the Cotyledon

배측에 있어서는 (Fig. 6) 發芽에 따라 band 1 즉 15S 등의 polymer가 차츰 감소했으며 band 2 즉 11S와 band 3 즉 7S 등도 조금 감소했고 따라서 Rm 0.1~0.4 値사이의 他部分에 비해 진하게 염색된 부위가 조금씩 ⊕방향으로 이동되었다. 그외 다른 band 특히 band 6은 거의 변하지 않았는데 아마도 biochemical role을 가진 성분인 것으로 생

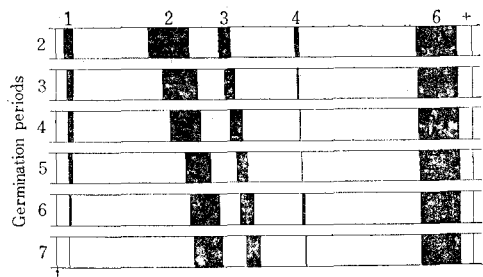


Fig. 6. Electrophoresis Pattern of the Axis

각된다. (8) 그리고 배측에서도 자엽의 發芽 제 6, 7 일에서와 같이 다소 퍼진 것같이 염색되었는데 이것도 같은 이유에 의한 것으로 보여진다.

전기영동상에서는 ⊕방향으로 빨리 당겨가는 것일수록 분자량이 작은 物質이다 (5,11,12) 그러므로 자엽과 배측에서 15S 등의 polymer와 주요저장단백질인 11S와 7S 등이 減少하고 빨리 ⊕쪽으로 이동하는 물질들이 生成되었다는 것은 大豆의 단백질이 發芽에 따라 高分子의 것이 低分子의 것으로 분해되었다고 볼 수 있다. 이것은 Catsimpoalas 등 (6)과 Cumming (11) 등의 실험에서 11S 단백질을 0.2M mercaptoethanol을 함유한 6M guanidine hydrochloride를 써서 분해시켰을 때의 pattern과 加熱에 의해 大豆단백질의 一部가 분해되었을 경우의 pattern과 類似했다.

Ryan (20) 등에 의하면 일종의 protease inhibitor인 감자의 chymotrypsin inhibitor I은 일부위에서 合成된 후 빠른 단백질 合成이 일어나고 있는 분열조직으로 이동된다고 한다. 그러므로 Kakade 등 (19)은 種子나 나른 reproductive-storage organ에 있는 inhibitor는 冬眠前 빠른 단백질 合成이 필요한 時期 즉 저장단백질이 合成되는 동안 植物生體內的 protease를 억제하여 저장단백질의 分解를 막는 것으로 추정하였다.

植物生體內에서 trypsin inhibitor가 저장 단백질 분해효소를 억제한다는 점을 보면 發芽에 따른 TIA의 감소와 단백질 pattern의 변화에는 밀접한 관련성이 있으리라 추정되었다. 즉 發芽에 따라 trypsin inhibitor activity가 감소하고 이에 따라 trypsin inhibitor에 의해 억제를 받던 植物生體內的 단백질 분해효소의 活性가 높아져서 저장단백질의 분해가 활발해지며 그 결과 작은 분자량을 가진 物質들이 生成되며 이 物質들은 급속히 자라는 成長조직에 의해 쓰여진다고 생각되었다.

본 실험에서는 發芽에 따라 TIA의 감소와 저장단백질의 감소가 있었다. 그러나 inhibitor activity의 감소량과 저장단백질의 감소량이 일치하지는 않았다. 이것은 大豆生體內에서 단백질 분해효소의 作用이 trypsin inhibitor의 다른 조건과도 복잡한 유기적 관련성을 가진다고 볼 수 있으며 이것에 관한 보다 더 깊은 生化學的 연구가 요구되어진다.

## 要 約

본 실험은 大豆의 發芽에 따른 trypsin inhibitor

activity(TIA)와 protein pattern의 변화에 관하여 조사함과 아울러 그 상관관계를 살펴보기 위한 목적으로 시도되었다. 자엽의 TIA는 發芽과정中 조금 감소하였고, 배측에서는 급격히 감소해서 發芽 제 7일에는 제 2일의 50%이하로 줄었다. 그리고 發芽 제 2, 3, 4일의 defatted dry sample에서 배측은 자엽보다 더 높은 TUI를 보여졌으나 배측의 수분 함량이 자엽에 비해 높으므로 fresh sample當 TIA는 자엽보다 더 낮았다.

그리고 protein pattern은 자엽과 배측에 있어서 분자량이 큰 15S 등의 polymer (band 1), 11S (band 2) 그리고 7S (band 3)가 감소했고 Rm值 자엽의 band 5를 비롯하여 0.5~1.0사이에 높은 mobility를 가진 물질들이 生成되었다. 자엽의 band 4와 배측의 band 6은 거의 변하지 않았다. 그리고 발아에 따라 TIA의 감소와 저장단백질의 감소는 있었으나 그 감소량이 서로 일치하지는 않았다.

## 參 考 文 獻

- 1) Bechman, Instruction Manual, 1970. Model R-101 Microzone Electrophoresis System. Calif. V.S.A.
- 2) Birk, Y. 1961. Biophys. Acta 54:378.
- 3) Bowthilet, R.I., W.L. Hunter, C.A. Luhman, D. Ambros, and S. Lipkansky. 1950. Poultry Sci. 29: 837.
- 4) 변시명, 김성곤, 이춘녕, 1966, 농화학회지, 7:85.
- 5) Catsimpoalas, N., D.A. Rogers, S.J. Circle, and E.W. Meyer. 1967. Cereal Chem. 44:631 cited from Catsimpoalas, N., T.G. Campbell, and E.W. Meyer, 1968, Plant Physiol. 43:799
- 6) Catsimpoalas, N., E. Leuthner, and E.W. Meyer. 1968. Arch. Biochem. Biophys. 127: 338.
- 7) Catsimpoalas, N., C.E. Ekenstam, D.A. Rogers, and E.W. Meyer. 1968. Biochem. Biophys. Acta. 168:122.
- 8) Catsimpoalas, N., T.G. Campbell and E.W. Meyer. 1968. Plant Physiol. 43:799.
- 9) Chernick, S.S., S. Lepkorsky, and I.L. Chai koff 1948. Amer. J. Physiol. 115:23.
- 10) Colowick, Kaplan. Methods in Enzymology II. p.32-55.

- 11) Cumming, D.B., D.W. Stanley, and J.M. DeMan. 1973. *J. Food Sci.* **38**:320.
- 12) Ewart, J.A.D., 1973. *J.Sci. Fd Agric.* **24**:685.
- 13) Frankel-Conrat, H., R.C. Bean, E.D. Dacay, and H.S. Olcott, 1952. *Arch. Biochem. Biophys.* **27**:393.
- 14) Frattali, V., and R.F. Steiner, 1969. *Anal. Biochem.* **27**:285.
- 15) Garlich, J.D., and M.C. Nelheim. 1966. *J. Nutr.* **88**:100.
- 16) 권태완. 1971 한국식품연구문헌총람, p.73, 한국식품과학회
- 17) Holm, H., K. Fossum, and Wench B. Eide. 1973 *J. Sci. Fd Agric.* **24**:333.
- 18) Honavar, P.M., K. Sohonie. 1957. *Chem. Abstro* **51**:10669.
- 19) Kakade, M.L., N. Simon, and I.E. Liner. 1969. *Cereal Chem.* **46**: 518.
- 20) Kunitz, M. 1945 *Science* **101**:668.
- 21) Kunitz, M. 1947, *J. Gen. Physiol.* **30**:311.
- 22) Kwong, E., R.H. Barnes, and E. Fiala. 1962 *J. Nutr.* **77**:312.
- 23) Laporte, P., and J. Tremoliera, 1962, *C.R. Soc. Biol.* **156**:1261, cited from Couch, J.R., and F.G. Hooper, 1972, *Newer Methods of Nutritional Biochemistry.* p. 183, Academic Press. New York
- 24) Osborne, T.B., and L.B. Mendel. 1917. *J. Biol. Chem.* **32**:369.
- 25) Rackis, J.J., and R.L. Anderson. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**:23.
- 26) Ryan, C.A., and O.C. Hvisman. 1967. *Nature* **214**:1047.
- 27) 손응용, 차중환, 박병훈, *農生物統計學* 1974. p.95. 선진문화사.
- 28) Steel, R.O.G., and J.H. Torrie. 1960. *Principle and Procedures of Statistics.* p.107, 142, McGraw-Hill Book Co., New York.
- 29) Steiner, R.F. V. Frattali. 1969 *J. Agr. Food Chem.* **17**:513.
- 30) Tombs, M.D., 1967, *Plant Physiol.* **42**:797.