

대두 품종별 트립신 인히비터에 관하여

金 炯甲 · 金 明燦 · 張 權烈 · 金 鍾奎

경상대학교 농과대학

(1981년 11월 2일 수리)

Trypsin Inhibitors from Various Soybean Varieties

Hyung-Gap Kim, Myung-Chan Kim, Kwon-Yawl Chang and Jong-Kyu Kim

College of Agriculture, Kyung-Sang National University, Jin-Ju 620

(Received November 2, 1981)

Abstract

To investigate the soybean trypsin inhibitors from seven varieties of soybeans and their twenty one F_1 -hybrids, water soluble proteins were extracted.

Trypsin inhibitors were isolated from those proteins and purified by sephadex G-75 column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. Total 16 kinds of trypsin inhibitors were isolated. From each variety of soybeans, 5~12 kinds of trypsin inhibitors could be detected and among them, 5 kinds of trypsin inhibitors were mainly distributed.

서 론

예로부터 우리나라를 비롯한 동양에서 식물성 단백질로서 널리 식용하여온 대두는 생화학적, 영양학적, 식품가공학적인 면에서 다양한 연구가 진행되어 왔다.

특히 대두에는 트립신 인히비터(trypsin inhibitor)가 존재하여 소화의 저해작용을 하여서 많은 관심을 모아 왔다. 최초로 1917년 Osborn과 Mendel⁽¹⁾의 연구에 이어서 자연계의 분포^(2,3), 일반적 성질^(4~6), 분리 및 정제^(2,7~12), 생체에 미치는 영향^(13~17) 등이 연구되어 왔으며 우리나라에서는 우레아 가수분해효소(urease)와 트립신 인히비터의 활성 변화⁽¹⁸⁾, 대두를 포함하여 녹두, 강남콩 등 16종의 한국산 두류에 대하여 트립신 저해활성^(19,20)을 측정된 보고가 있다. 또한 트립신 인히비터의 종류에 관해서는 1964년 Rackis 등⁽¹¹⁾이 DEAE-셀룰로오스 관 크로마토그래피로 4종의 트립신 인히비터를 규명한 이래 1975년 中村⁽²¹⁾ 등에 의하

여 isoelectric focusing으로 6종의 트립신 인히비터를 검출한 바 있으며, 1978년 谷村⁽¹⁰⁾ 등이 대두식물에서 7종의 트립신 인히비터를 밝힌바 있다.

본 실험에서는 트립신 인히비터를 遺傳的인 측면에서 검토하기 위한 전단계적 실험으로 대두 품종에 따른 트립신 인히비터 분포를 조사하여 얼마의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시 료

가. 공시대두

본 실험에서 사용된 대두는 Table 1에서 보는 바와 같이 본 대학 遺傳學 실험실에서 재배한 대두 7품종과 이를 二面交雜한 21품종을 합하여 모두 28종이었다.

나. 시료의 조제

대두를 박피한 후 조분으로 하여 *n*-hexane으로 저온에서 (4~5°C) 24시간 탈지한 후 용매를 제거하고 다

시 80메쉬(mesh)체로써 분말을 얻었다. 이 분말을 사용하여 수용성 단백질을 Fig. 1과 같이 추출하였다. 즉 탈지한 대두 분말에 10배량의 증류수를 가하여 3시

Table 1. Varieties of soybean

No. 1	Sunbijabikong
No. 2	Tousan No. 62
No. 3	Kyung-Nam No. 2
No. 4	Kyung-Nam No. 1
No. 5	D69-3933
No. 6	D62-7816
No. 7	D69-7816
No. 1×2	Diallel Crosses
No. 1×3	Diallel Crosses
⋮	
No. 1×7	Diallel Crosses
7+1	28

간 동안 추출하고난 다음 2 000 rpm에서 15분간 원심 분리하고 그 잔사를 다시 반복하여 추출한 후 두 액을 합쳐서 10 000 rpm에서 30분간 원심분리하고 잔사를

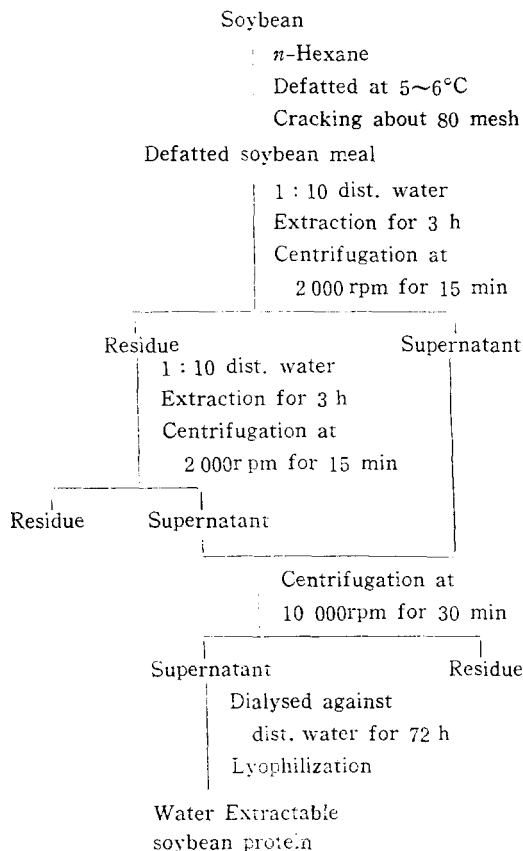


Fig. 1. Preparation of water extractable soybean protein

제거한 후 추출액을 얻었다⁽²¹⁾. 추출액은 72시간 투석한 다음 동결건조하여 시료로 하였다.

트립신 인히비터의 분리 및 정제

가. Sephadex G-75에 의한 겔여과

시료 350 mg을 pH 7.6의 인산완충액(0.00325 M K₂HPO₄, 0.0026 M KH₂PO₄, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 0.4 M NaCl, 이온강도 0.5) 5 ml에 용해시킨 후 3 000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 Sephadex G-75의 칼럼으로 겔여과하였다. 칼럼의 크기는 30×1 000 mm로 하였고 900 mm의 gel bet를 제작하였으며, 용출액은 pH 7.6의 인산완충액을 사용하여 유속 20~25 ml/h, 온도 4~6°C에서 5 ml씩 분취하고 분광광도계(Shimadzu UV-VIS spectrophotometer 139)로 280 nm에서 흡광도를 측정하고 별도로 트립신 인히비터의 활성을 측정하였다.

나. Polyacrylamide겔 전기영동

겔여과에서 분리한 트립신 인히비터의 활성이 있는획분을 합하여 4~8°C에서 48시간 투석후 동결건조한 시료를 사용하였다. 영동은 slab gel 전기영동으로 10% polyacrylamide gel을 사용하였고 영동진행을 알기 위하여 0.001% bromphenolblue를 각 시료구에 가하여 겔하단으로부터 5 mm까지 영동하였으며 영동의 정전류는 30 mA로 하고 온도는 5°C 이내로 하였다. 겔의 염색은 0.25% coomassie brilliant blue (ccomassie brilliant 1.25 g을 50% 메탄올 454 ml와 아세트산 46 ml에 녹여 Whatman No. 1에 여과한 것을 사용하였으며 탈색은 7% 아세트산을 사용하였다.

같은 시료를 2회 반복하여 영동하였으며 하나는 염색을 하여 띠의 위치를 알아보았고 다른 하나는 염색을 하지 않고 시료의 영동 부위를 차례로 일정하게 0.5 mm씩 잘라내어 트립신 인히비터 활성을 측정하였다.

트립신 인히비터의 활성 측정

Kunitz⁽⁹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 시험관에 트립신 저장용액(Grand Island Biological Co.製 트립신 30 mg을 0.0025 N HCl 100 ml에 녹인 것) 0.5 ml를 넣고 트립신 인히비터 용액 0.5 ml를 가한 다음 여기에 기질로 사용한 1% 카제인(일본 Wako Pure Chemical Industries, Ltd製) 용액 1 ml를 가하여 잘 혼합한 후 정확히 20분간 35°C에서 반응시킨 다음 5% TCA(trichloroacetic acid) 용액 3 ml를 가하여 총량이 5 ml가 되게 하고 실온에서 1시간 방치하여 여과지 No. 5C로 여과한후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 트립신 인히비터의 (TI) 역가(활성)는 다음 식에 의해 구하였고 시료 0.5 ml에 대한 저해된 트립신의 µg으로 나타내었다.

$$TI \text{ 활성} = \frac{(C - C_B) - (S - S_B)}{(C - C_B)} \times a$$

여기서 C=control, C_B=control blank, S=시료
S_B=시료 blank, a=트립신 [$\mu\text{g/ml}$]이다.

본 실험에 사용될 트립신의 농도를 결정하기 위해 Kunitz⁽⁹⁾의 카제인 소화법에 의해 트립신의 농도별 활성 표준곡선을 Fig. 2와 같이 나타 내었으며 본 실험에서는 300~400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 트립신 인히비터활

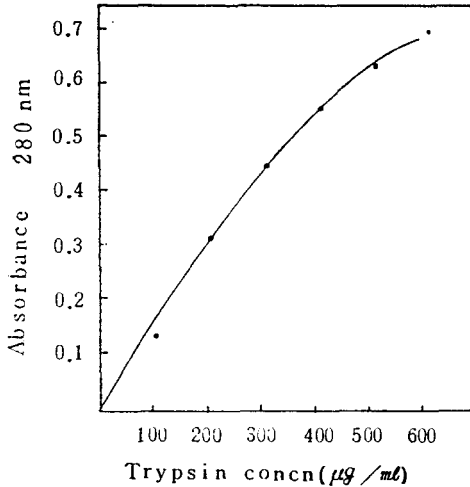


Fig. 2. Standard trypsin activity curve by Kunitz casein digestion method

성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Sephadex G-75에 의한 겔여과

각 대두의 수용성 단백질을 동결 건조하고 이것을 겔 여과하여 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과 3개의 peak를 보였는데 이것은 小原 등⁽²²⁾의 보고와 일치 하였다. 小原 등의 보고에 의하면 제 1 peak는 대두의 주요 단백질인 15S, 11S, 7S의 혼합물이며 제 3 peak는 核酸類似物質이라고 보고 하고있다. 트립신 인히비터는 제 2 peak에 집중되어 있었으며 대두에 따라 pattern이 다소 다른 양상을 나타내었다.

트립신 인히비터의 peak는 대개 劃分 No. 30~No. 70부위였으며 최고의 peak는 劃分 No. 50부근이었다. 트립신 인히비터의 활성 곡선은 단백질의 양에 비례하지 않았으며, 단백질 함량이 적은 劃分 No. 60부근에서도 상당한 활성을 나타내었다. 대부분의 대두가 2개의 트립신 인히비터 곡선을 가졌으며, Fig. 3의 (c)와 (d)와 같이 다소 다르게 나타난 것도 있었다.

Polyacrylamide겔 전기영동

Sephadex G-75겔여과에서 얻어진 28종의 트립신 인히비터 획분을 polyacrylamide겔 전기영동을 하여 Fig. 4.의 전기영동 pattern을 얻었다. 전기 영동상에

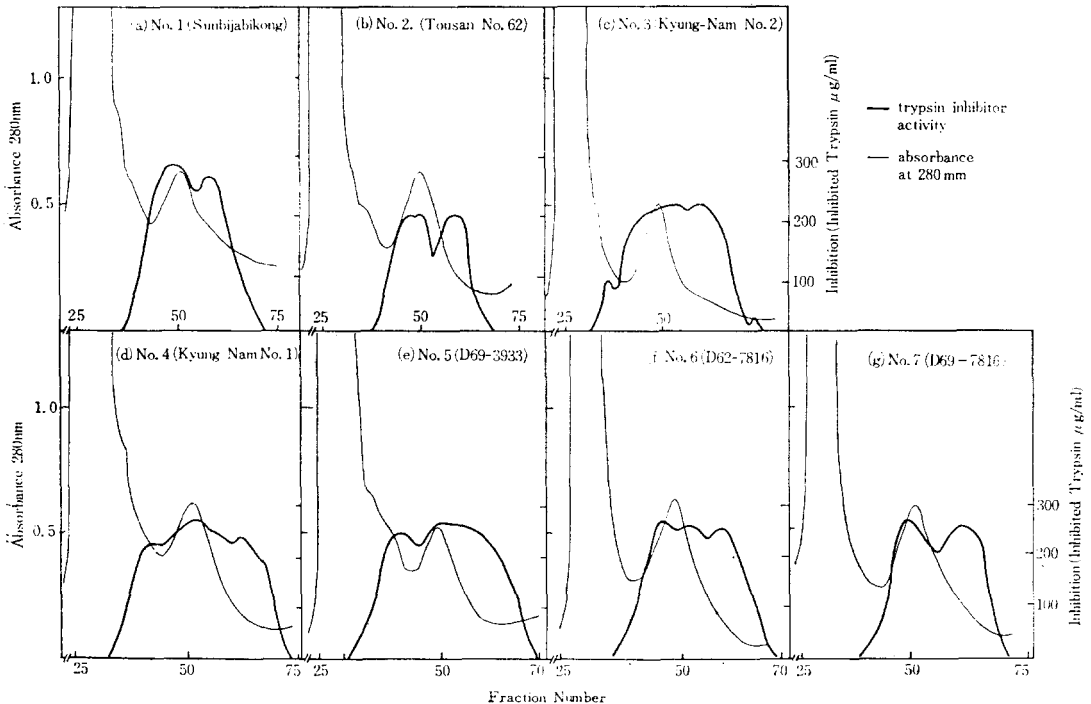
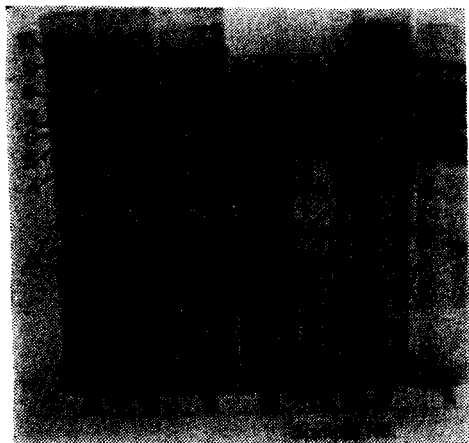


Fig. 3. Gel filtration of water soluble protein through Sephadex G-75 (30x100 mm)

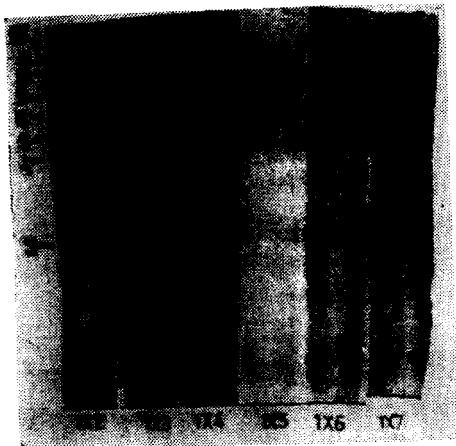
Table 2. Trypsin inhibitor activity of polyacrylamide gel electrophoretic patterns in soybeans

Sample No.	STI	1,2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		19.72	18.12	27.50	25.93	33.89	22.85	21.88								
2		21.12	16.61	16.61	18.44	57.31	34.08									
3		8.55	9.04	20.70	16.05	30.24		4.54					2.13	1.72		
4	7.38	8.85	12.43	16.07	16.45	13.03						3.24	3.00	3.31		2.64
5			3.43	8.36		78.73										
6		13.87	16.42	12.12		39.86	38.11									
7		9.51	15.08	20.50	13.94	21.90		12.65			5.21	4.81	3.06	2.18		
1×2		6.13	19.13	15.75	13.74	15.22		6.34			3.11	2.78	3.26			
1×3		1.75	17.98	20.06	24.90	32.38		11.76			0.83	0.62	0.52	0.76		
1×4	6.38	11.62	25.01	32.47	28.71	21.23	4.28	7.85			9.79	5.53	4.25	3.64		
1×5		10.26	17.53	11.74	20.30	46.15										
1×6		20.22	21.41	14.13	17.13	27.18		10.12			4.92	4.41	3.84			
1×7			17.49			32.59	18.87	12.83			6.85	5.02	5.36			
2×5		10.49	6.89	7.99	15.40	14.79	8.02									
2×7		12.83	16.97	23.79	26.50	24.53	24.28	20.46								
3×2		6.50	15.30	22.18	19.50	19.31		14.91					8.24	7.65	11.86	13.05
3×4		30.2	50.9	3.91	22.33	24.88	63.98	81.53					7.62	6.54	10.44	10.62
3×5		13.86	13.86	10.84		12.98	12.35									
3×6		16.26	10.64	19.82		22.59	87.46									
3×7		6.92	7.85	4.00	11.39	30.37	26.16					10.10		8.62	1.52	
4×2				11.71		11.83	10.53					2.14				
4×5		5.30	4.51	7.46	8.12	9.12	12.23	12.50				1.78				
4×6		2.15	3.36	4.44	14.53	18.30	14.00	9.15				6.54				
4×7		17.21	21.43	19.27	23.23	18.50						3.21				
5×6		11.95	10.45	11.23	28.27	10.91	11.03									
5×7		28.29	28.47	23.76	27.37	31.56	18.19	4.35				2.41		1.62		
6×2		10.69	16.29	9.45	8.20	13.30		12.07					2.85	2.41		
6×7			7.40	9.16	12.47	15.01	12.57	6.62					3.52	3.12		

*Inhibited trypsin, $\mu\text{g} \times 10^2 / \text{sample } 10 \text{ g}$



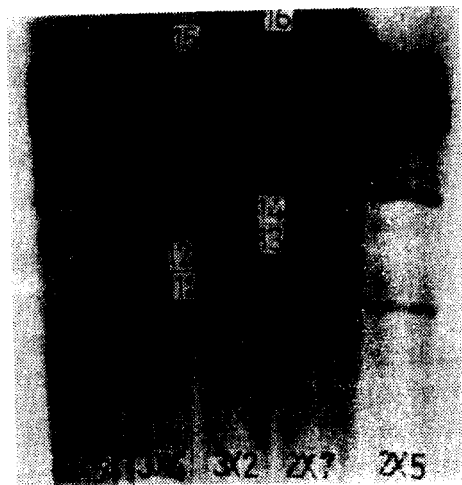
(a) Sample No. 1~No. 7



(b) Sample No. 1x2~No. 1x7



(c) Sample No. 2x5~No. 3x5



(d) Sample No. 3x6~No. 6x7

Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the fraction of trypsin inhibitor obtained by gel filtration

나타난 트립신 억제제의 띠는 Fig. 4의 (a)에서 나타난 시료 No. 4의 soybean trypsin inhibitor(이하 STI로 약기)의 띠 No. 1, No. 2를 비롯하여 시료 No. 3x2(Fig. 12)의 띠 No. 16까지 모두 16개의 띠가 검출되었다.

STI No. 11~No. 16은 흔적 상태로 나타났기 때문에 대체로 트립신 억제제 활성이 높게 나타난 STI No. 1~No. 10까지를 기준하여 보면 시료 No. 1~No. 7의 모체에서 STI의 종류가 가장 많이 존재한 것은 시료 No. 1과 No. 4였으며, 가장 적게 나타난 것은 시료 No. 5였다. 二面交雜種에서의 STI는 시료 No. 1x3, No. 4x5, No. 4x6이 8개의 band를 가져 대체로 높

은 함량이었으며 가장 함량이 적은 것은 시료 No. 4x2로 나타났다.

트립신 억제제의 활성

각 시료의 전기영동상의 STI 활성을 측정된 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 시료 No. 1~No. 7의 모체에서 가장 STI의 활성이 높게 나타난 것은 No. 3이었으며, 二面交雜種에서는 시료 No. 2x7이었다. 각 시료에서 일반적으로 활성이 높게 나타난 STI는 No. 3~No. 7이었으며 그중 No. 7이 가장 높은 활성을 보였다. STI No. 11~No. 16까지는 활성도가 매우 낮게 나타났으며 각 대두에서 대개 1~5종의 STI가 함유되어 있음을 알았다.

요 약

대두 7품종과 이를 二面交雜해서 얻은 2대 21종의 대두에서 각각 가용성 단백질을 추출하여 Sephadex G-75에 의한 겔 여과와 polyacrylamide 겔 전기영동으로 트립신 인히비터를 분획 정제한 결과 16종의 트립신 인히비터가 검출되었고 각종류의 대두마다 5~12종의 트립신 인히비터가 존재하였으며 주로 5종의 트립신 인히비터가 분포하였다.

문 헌

- Osborne, T.B. and Mendel, L.B.: *J. Biol. Chem.* **32**, 369(1917)
- Colowick, K.: *Methods in Enzymology*, II p.32
- Couch, J.R. and Hooper, F.G.: *Newer Methods of Nutritional Biochemistry*, Academic Press, New York, p.183(1972)
- Frattali, V. and Steiner, R.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 495(1969)
- Feinstein, G., Osuga, D.T. and Feeney: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 495(1966)
- Ikenoka, T., Sihmada, K. and Matsushina, Y.: *Makromol Chem.* 125-126 (1963)
- Birk, Y., Gertler, A. and Khalef, S.: *Biochem. J.*, **87**, 281 (1963)
- Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149(1946)
- Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291(1947)
- 谷村和入郎, 鴨居郁三: 日本食品工業學會誌, **22**(9), 1(1978)
- Raekis, J.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 230(1964)
- Yamamoto, M., Ikenaka, T.: *J. Biochemistry*, **62**, 141(1967)
- Barnes, R.H. and Kwong, E.: *J. Nutr.*, **86**, 245 (1965)
- Garlish, T.D. and Neshcin, M.C.: *J. Nutr.*, **88**, 100(1966)
- Kakade, M.L., Simons, N. and Liner, I.E.: *J. Nutr.*, **100**, 1003(1969)
- Khayambashi, H. and Lyman, R.L.: *Am. J. Physiol.*, **217**, 646(1969)
- Schingoethe, D.J., Aust, S.D. and Thomas, J.W.: *J. Nutr.*, **100**, 731(1970)
- 孫惠淑, 朴正陸: 한국농화학회지, **20**, 182(1977)
- 姜明喜, 金容華, 李瑞來: 한국식물과학회지, **12**, 24(1980)
- 姜明喜, 李瑞來: 한국식물과학회지, **10**, 4, 4, 15
- 中村博治, 鴨居郁三: 日本工業學會誌, **22**(9), 1 (1975)
- Obara, T., Kimura-kobayshi, M., Kabayash, T. and Wadanabe, Y.: *Creal Chem.*, **47**, 597(1971)