

한국산 곡류와 두류 중 α -Amylase 저해물질의 검색 및 특성

심 기 환** · 배 영 일 · 문 주 석

**경상대학교 식품공학과

Screening and Characterization of α -Amylase Inhibitors from Cereals and Legumes in Korea

Ki-Hwan Shim**, Young-Il Bae, Ju-Seok Moon

** Department of Food Science and Technology,
College of Agriculture, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Korea

Abstract

To investigate characterization of the α -amylase inhibitors from cereals and legumes produced in Korea, inhibitory activities against α -amylase with the inhibitor from barley (*Hordeum vulgare*), wheat (*Triticum aestivum*), black bean (*Glycine max*), bean (*Cajanus cajan*) and pea (*Pisum sativum*) were measured. Among the samples tested, inhibitors from naked barley and black bean (sabong) which showed the highest inhibitory activities of cereals and legumes, respectively, were characterized according to treatment condition. The results obtained were summarized as follows. During the germination of naked barley and black bean, α -amylase activities were gradually increased but inhibitory activities against α -amylases were decreased. Both activities were gradually decreased when naked barley and black bean were stored. More than 50% of activities of the inhibitors from naked barley and black bean were remained at 100°C for 15 min and 20 min, respectively, indicating that the inhibitor from black bean was more stable to heat than that of barley.

Key words : screening, characterization, α -amylase inhibitors, cereals, legumes

서 론

효소 α -amylase(α -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.1.)의 저해물질은 Charaszcz 등¹⁾에 의해 처음으로 보고된 이래 많은 식물체에 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 데^{2,3)}, 특히 밀^{4,5)}, 옥수수^{6,7)}, 귀리⁸⁾, 방고⁹⁾, 도토리¹⁰⁾, 감자¹¹⁾ 및 두류^{12,13)} 등에서 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 식물체 중 이들의 생리적인 역할에 대해서는 아직 규명되어 있지 않으며 종자 중의 단백질 저장체로서 작용한다는 데 대해서는 여러가지 연구결과로부터 제시

되고 있다^{14,15,16)}. 이들은 일반적인 몇가지 경우^{17,18)}를 제외하면 내재성 식물 α -amylase에 대해 영향을 받지 않으며, 전분대사의 조절이나 mobilization에 중요하지 않는 것으로 보고되어 있다^{19,20)}. 일반적으로 α -amylase 저해물질의 저해활성도는 곡류가 성숙되는 동안에 증가하고 α -amylase 활성도는 감소하는 반면에, 곡류가 발아되는 동안에는 α -amylase 저해물질의 저해활성도는 감소하고 α -amylase 활성도는 증가한다고 보고되고 있다^{21,22)}.

곡류와 두류는 가공처리한 상태로 사람의 식생활에 다양하게 이용되고 있으며, 현재 외국에서는 여

** To whom all correspondence should be addressed

러 연구자들에 의해 곡류와 두류종의 α -amylase 저해물질에 대한 연구가 계속되고 있으나 국내에서는 김 등²³⁾의 방선균에 의해 분리된 α -amylase 저해물질에 대한 연구에 불과하며, 특히 식물체로부터의 α -amylase 저해물질에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국산 곡류와 두류 중에 함유되어 있는 α -amylase 저해물질의 저해활성도를 조사하여 이들 중 저해활성도가 높은 쌀보리와 검정콩의 처리조건 중 α -amylase와 그 저해물질의 활성도를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 곡류와 두류는 경상대학교 두류육종연구실에서 보존중인 품종과 진주 근교에서 구입한 시료를 사용하였다. α -Amylase 저해물질의 검색용 곡류로서는 보리(*Hordeum vulgare*) 4품종, 밀(*Triticum aestivum*) 3품종을 사용하였으며, 두류로서는 대두(*Glycine max*)중 검정콩 9품종과 그 외 16품종, 비둘기콩(*Cajanus cajan*) 8품종 및 완두(*Pisum sativum*) 4품종을 선정하여 실험에 사용하였다.

α -Amylase 저해물질의 활성도 측정

곡류와 두류 5g에 50mM NaCl을 함유한 20mM sodium phosphate 완충액(pH 6.9) 20ml를 가하여 3시간 동안 추출한 후 원심분리(8,000rpm, 30min, 4°C)하고, 그 상침액을 α -amylase 활성도와 저해물질의 저해활성용 시료로 사용하였다. α -Amylase 저해활성도는 Bernfeld의 방법²⁴⁾에 준하여 측정하였다. 즉 porcine pancreatic α -amylase(1 unit), α -amylase 저해물질 및 50mM NaCl을 함유한 20mM sodium phosphate 완충액(pH 6.9)은 전체량을 0.63ml로 하여 30°C에서 30분간 전처리한 후 환원된 2% 가용성 전분 0.37ml를 가하고, 25°C에서 5분간 방치한 다음 dinitrosalicylic acid 1ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 반응혼합물을 끓는 수욕상

에서 10분간 가열한 후 급속히 냉각한 다음, 증류수 10ml를 가하고 490nm에서 흡광도를 측정하였으며(Fig. 1), blank test는 효소를 첨가하지 않고 상기의 방법에 준하여 행하였다. α -Amylase 활성도의 1unit는 상기 분석조건하에서 5분 이내에 maltose 1 μ M을 유리시키는 효소의 양으로 정의하였으며, α -amylase 저해물질의 활성 1unit는 상기 분석조건하의 5분 이내에 효소 10%를 저해하는 저해물질의 양으로 하였다.

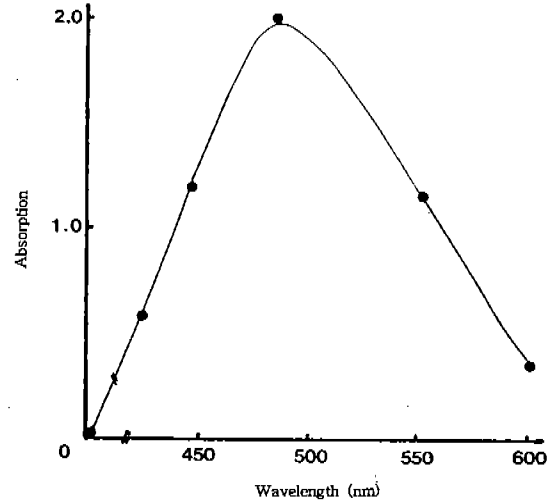


Fig. 1. Absorbance spectra of maltose measured by the Bernfeld method.

단백질의 농도 측정

α -Amylase 저해물질의 단백질 정량은 Bradford 방법²⁵⁾과 Bio-rad 단백질 정량법²⁶⁾을 병행하여 측정하였다. 즉 Bradford 시약 0.4ml, 증류수 1.6ml에 시료를 넣어 혼합한 뒤 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값은 bovine serum albumin으로 작성한 표준단백질 정량곡선을 이용하여 시료에 존재하는 단백질의 농도를 결정하였다(Fig. 2).

쌀보리와 검정콩의 일반성분

본 실험에 사용된 쌀보리와 검정콩의 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분은 상법²⁷⁾에 따라 분석하였다.

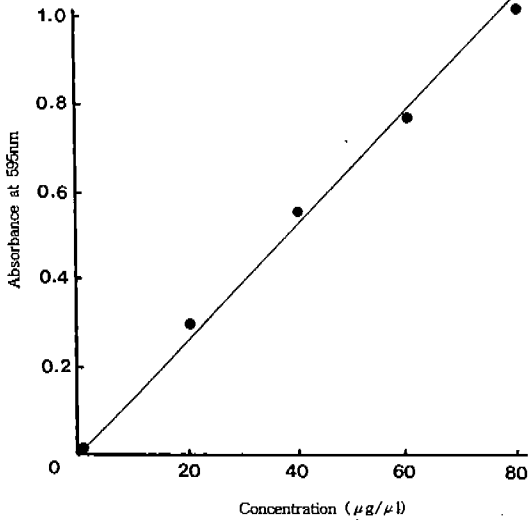


Fig. 2. Standard curve of bovine serum albumin by the Bradford method.

처리조건에 따른 α -amylase 및 저해물질의 활성도 발아기간

쌀보리와 검정콩은 입자의 형태, 색 및 크기가 정상적이고 시료를 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 발아시키면서 발아기간에 따른 α -amylase 활성도와 저해물질의 저해활성도를 각각 측정하였다. 즉 시료 2g (보리 64 및 콩 21알)을 각각 취하여 막자사발에서 분쇄한 후 20mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.9) 10ml를 가하여 3시간 동안 추출하여 원심분리 (8,000rpm, 30min, 4°C)하고, 그 상정액을 사용하여 α -amylase 활성도와 저해물질의 저해활성도를 측정하여 각각의 상대활성으로 나타내었다.

저장기간

저장기간에 따른 쌀보리와 검정콩의 α -amylase 활성도와 저해물질의 저해활성도를 각각 측정하였다. 즉 보리와 검정콩을 1, 2 및 4개월로 상온에서 저장하면서 각각 2g을 취하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

열처리

열처리시 쌀보리와 검정콩 α -amylase 저해물질의 열 안정성을 측정하기 위하여 70, 90 및 100°C

에서 5, 10, 20 및 30분간 가열한 후 냉각하여 시료 각각 20g을 취하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

분쇄도

쌀보리와 검정콩을 분쇄기에서 분쇄한 후 20, 30, 45 및 80메쉬를 연속적으로 통과한 시료 각각 2g을 취하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

곡류와 두류의 α -amylase 저해물질의 활성도

α -Amylase 저해활성도를 조사하기 위하여 보리 (*Hordeum vulgare*) 4품종과 밀 (*Triticum aestivum*) 3품종을 선정하여 저해활성도를 측정하여 본 결과 (Table 1), 보리 품종들의 저해활성도는 각각 4, 100, 3,600, 3,500 및 2,750units/g seed로 비교적 높았고, 밀 품종에서는 각각 3,500, 3,300 및 3,100units/g seed로 나타났으며, 곡류중에서는 쌀보리가 저해활성도가 가장 높았다.

두류는 대두 (*Glycine max*) 중 9품종과 그의 16품종, 비둘기콩 (*Cajanus cajan*) 8품종, 완두 (*Pisum sativum*) 4품종을 선정하여 저해활성도를 측정하여 본 결과 (Table 2), 검정콩은 1,300~7,100units/g seed로 나타났으며, 검정콩 (sabong)이 가장 저해활성도가 높았다. Frels 등²⁸⁾은 두류에서 분리한 α -amylase 저해물질의 저해활성도를 측정하였는데, 검정콩 2,500~3,000units/g seed, great northern bean 4,800units/g seed, navy bean 3,600units/g seed, pink bean 4,000units/g seed, pinto bean 5,000units/g seed, red kidney bean 4,300units/g seed 및 red mexican bean 2,600units/g seed로 나타났으나, black eyed peas, chick pea 및 lima bean은 250units/g seed 이하로 보고하였다. Marshall 등²⁹⁾도 8가지 품종의 두류에서 분리한 저해물질은 2,850~6,800units/g seed로 나타났다고 보고하였다. 반면에 Reddy 등³⁰⁾은 black gram (*Phaseolus mungo* L.) 저해물질은 씨와 떡잎에서 저해활성이 검출되지 않았다고 보고하였다. 이러한 차이는 품종간, 재배지역 및 저장기간 등에 기인한다고 추측된다.

Table 1. α -Amylase inhibitor activities of cereals produced in Korea

Varieties	α -Amylase inhibitor activity(units/g seed)
<i>Hordeum vulgare</i>	
Naked barley	4,100
Hulled barley	3,600
Malting barley # 29	3,500
malting barley # 22	2,750
<i>Triticum aestivum</i>	
Cultivar # 1	3,500
Cultivar # 2	3,300
Cultivar # 3	3,100

Table 2. α -Amylase inhibitor activities of legumes produced in Korea

Varieties	α -Amylase inhibitor activity(units/g seed)
<i>Glycine max</i>	
Sabong(collected)	7,100
Patten	5,700
Crawford	4,800
KLS-161-14	3,500
Ajukarikong	3,200
Youweoldu	2,600
Wilson	2,300
PI 209332	1,400
Kurohira	1,300
<i>Moonsankong(collected)</i>	
Kyungnam # 1	3,050
Kyungnam # 3	2,800
Chinju # 1	2,600
Seonbijabikong	2,300
Bancheongdu	1,900
Geoje # 1	1,850
Horangikong	1,800
Tousan # 62	1,600
Tousan # 53	1,450
Milyang # 8	ND
Milyangkong	ND
bangsakong	ND
Tousan # 75	ND
Century	ND
Gungnaejungsaengjido	ND
<i>Cajanus cajan</i>	
IC PL-289	3,580
IC PL- 4	2,530
IC PL-151	2,420
IC PL-316	2,390
IC PL- 87	2,320
IC 27-216	1,980
IC PL-8321	1,890
IC PL-179	1,340
<i>Pisum sativum</i>	
Chinju # 3	2,270
Chinju # 4	1,030
Sugar snap	ND
JI 1197	ND

ND : Not detected

쌀보리와 검정콩의 일반성분

쌀보리와 검정콩의 일반성분을 분석한 결과 (Table 3), 쌀보리의 조단백질은 10.3%로서 겉보리 10.6%와 유사하였으며, 검정콩의 조단백질은 26.7%로서 강남콩 20.0%, 녹두 21.2%보다 높았다³⁰⁾.

Table 3. Proximate composition of barley and black bean (Unit: %)

	Moisture	Carbohydrate	Crude Protein	Crude fat	Crude ash
Barley	13.8	72.9	10.3	1.8	1.2
Black bean	10.2	43.7	26.7	16.2	3.2

처리조건에 따른 α -amylase 및 저해물질의 활성도 발아기간

쌀보리와 검정콩의 발아기간에 따른 α -amylase 활성도와 저해물질의 저해활성도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 쌀보리 α -amylase 활성도는 2일에 70%, 4, 6일에는 각각 85, 100%로 높아졌으며, 반면에 저해활성도는 2일에 80%를 유지하였으나, 그 이후 낮아져 4, 6일에는 각각 60, 45%까지 낮아졌다.

검정콩 α -amylase 활성도는 2일에 65%, 4, 6일에는 각각 80, 100%로 높아졌고, 저해활성도는 2일에 90%를 유지하였으며, 그 이후 낮아져 4, 6일에는 각각 75, 60%까지 낮아졌다.

발아기간에 따른 쌀보리 α -amylase 활성도는 검정콩과 유사하였으며, 쌀보리 α -amylase 저해활성도는 검정콩에 비해 급격하게 떨어지는 경향을 나타내었다. Sharma 등¹⁶⁾은 *Colocasia antiquorum* tubers에서 두 개의 α -amylase 저해물질을 정제하였는데, *Colocasia antiquorum* tubers가 45일간 성정하는 동안에 α -amylase 활성도와 α -amylase 저해물질의 저해활성도를 측정된 결과, 초기(15일)에는 총 단백질량의 감소로 amylase 및 그 저해물질의 비활성도는 크게 감소하지 않았으나, 45일 후 저해물질의 저해활성도는 원래 활성의 0.4%만 존재하였다. Pace 등²²⁾도 밀 발아중 α -amylase 저해물질의 저해활성도는 감소하는 반면에 α -amylase 활성도는 증가하였다고 보고하였는데, 이는 본 실험 결과와 유사하였다.

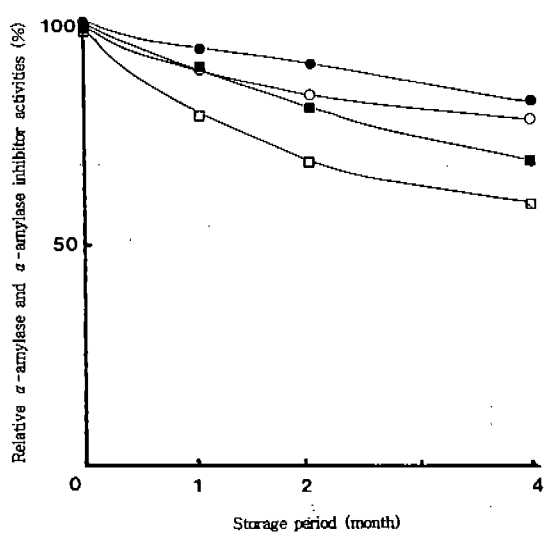
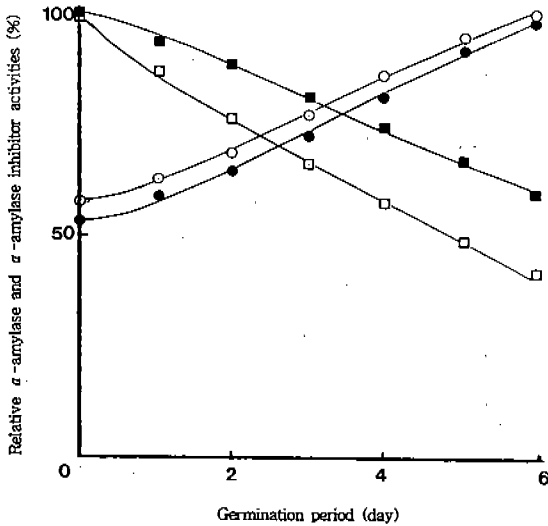


Fig. 3. Changes of α -amylase and α -amylase inhibitor activities in barley and black bean during germination.

- : Barley α -amylase
- : Barley α -amylase inhibitor
- : Balck bean α -amylase
- : Balck bean α -amylase inhibitor

Fig. 4. Changes of α -amylase and α -amylase inhibitor activities in barley and black bean during storage.

- : Barley α -amylase
- : Barley α -amylase inhibitor
- : Balck bean α -amylase
- : Balck bean α -amylase inhibitor

저장기간

저장기간에 따른 쌀보리와 검정콩의 α -amylase 활성도와 저해활성도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 쌀보리 α -amylase 활성도는 저장 1개월 후에 90%, 2, 4개월 후에 각각 85, 80%로 다소 감소하는 경향이였으며, 그 저해활성도는 각각 80, 70 및 60%로 감소하였다.

검정콩 α -amylase 활성도는 저장 1개월 후에 95%, 2, 4개월에 각각 90, 85%로 완만하게 감소하는 경향을 보였으며, 그 저해활성도는 각각 90, 80 및 70%로 감소하였다(Fig. 4). 저장기간이 경과함에 따라 쌀보리 α -amylase 활성도는 검정콩에 비해 감소하는 경향이 적었고, 저해활성도도 쌀보리가 검정콩에 비해 감소하는 폭이 컸다.

일반적으로 곡류와 두류는 저장기간이 경과할 수록 α -amylase 활성도와 저해활성도가 감소하는데 본 실험에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

열처리

α -Amylase 저해물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 70, 90 및 100°C에서 5, 10, 20, 30 및 40분간 가열한 후 저해활성도를 측정된 결과는 Fig. 5 및 6과 같다. 쌀보리 저해활성도는 70°C에서 10분 후 70%이였으며 20, 30 및 40분 후 각각 65, 60 및 55%를 유지하였고, 90°C에서 10분 후 저해활성도가 65%이였고 20, 30 및 40분후 각각 55, 45 및 35%를 유지하였다. 취반 온도와 유사한 100°C에서 10분 후 저해활성도가 60%를 유지하였으나, 그 시간 이후는 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

검정콩 α -amylase 저해활성도는 70°C에서 10분 후 80%이였으며 20, 30 및 40분 후 각각 70, 65 및 60%를 유지하였고, 90과 100°C에서 10분 후 75%를 유지하였으나, 그 시간 이후는 보리의 경우와 유사하게 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 그리고 100°C에서 쌀보리와 검정콩 α -amylase 저해물질은 각각 17, 22분 후 저해활성도가 50%를

유지하는 것으로 보아 열에 어느 정도 안정한 물질로 추측되며, 검정콩 저해물질이 쌀보리에 비해 열에 안정한 것으로 나타났다. Blanco-labra 등¹⁷⁾은 maize 저해물질은 96℃에서 5분 동안은 안정하였다고 하였으며, Kotaru 등³⁰⁾도 강남콩을 110℃에서 가열하였을 때 15분 후 저해활성도가 50% 이내로 감소하였다고 보고하였다. Marshall 등²⁹⁾은 강남콩 저해물질은 110℃에서 10분 후 저해활성도를 완전히 잃었으며, 0℃에서 2시간 동안 방치하여도 저해활성도는 회복되지 않았다고 보고하였다.

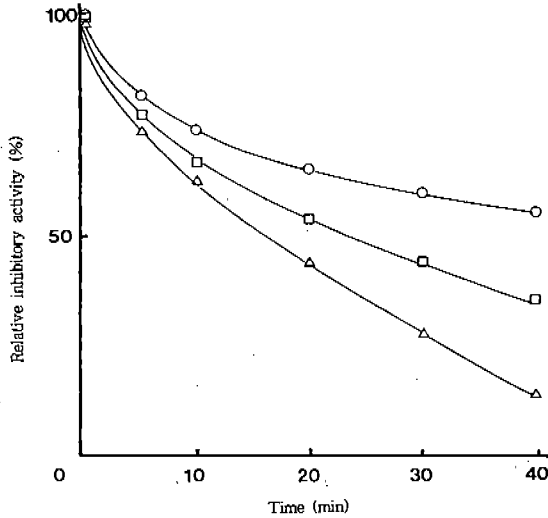


Fig. 5. Changes of α -amylase inhibitor activity in barley during heating.
 -○-:70℃, -□-:90℃, -△-:100℃

분쇄도

분쇄도에 따른 α -amylase 저해물질의 저해활성도를 조사한 결과(Table 4), 80메쉬를 통과한 쌀보리와 검정콩 저해물질의 저해활성도를 100%로 기준하였을 때 45메쉬를 통과한 것은 각각 70, 80%였고, 20메쉬를 통과한 것은 각각 30, 45%였으며, 쌀보리와 검정콩의 분쇄도가 높을수록 저해물질의 추출이 용이해져 저해활성도가 높은 것으로 추측된다.

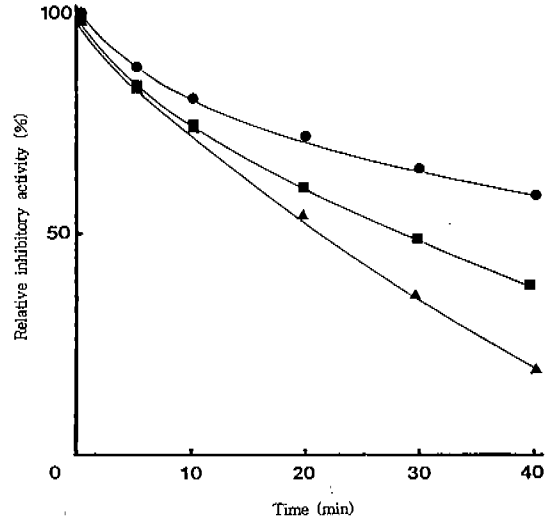


Fig. 6. Changes of α -amylase inhibitor activity in black bean during heating.
 -●-:70℃, -■-:90℃, -▲-:100℃

Table 4. Effect of pulverization on the activity of the α -amylase inhibitors from barley and black bean

Mesh	Relative inhibitory activity(%)	
	Barley	Black bean
20	35	45
30	50	65
45	70	80
80	100	100

요 약

한국산 곡류와 두류에 함유되어 있는 α -amylase 저해물질의 저해활성도를 조사하여 이들 중 저해활성도가 높은 시료로부터 α -amylase와 그 저해물질을 처리조건에 따라 특성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 보리, 밀, 비둘기콩, 완두 및 대두에서 저해활성도를 측정된 결과 곡류는 쌀보리, 두류는 검정콩이 다른 품종에 비해 높은 저해활성도를 나타내었다. 쌀보리와 검정콩은 발아됨에 따라 α -amylase 활성도는 높아졌으나 그 저해활성도는 낮아졌으며, 저장기간이 경과할 수록 α -amylase 활성

도와 저해활성도는 낮아졌다. 쌀보리와 검정콩의 분쇄도가 높을 수록 저해활성도가 높았고, 100℃ 열처리시 쌀보리는 15분, 검정콩은 20분 동안 저해활성도가 50% 이상을 유지하였으며, 검정콩 저해물질이 쌀보리에 비해 열에 안정하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비지원(901-1508-057-2)에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드린다.

참 고 문 헌

- Charzaszcz, T. and Janicki, J.(1993) "Sisto-amylase", a natural inhibitor of amylase *Chem. Abstr.*, 27, 3491.
- Abdul-Hussain, S.(1987) Proteinaceous α -amylase enzyme inhibitors in relation to preharvest sprouting of wheat.: *Diss. Abstr. Int.* 47(7), 2697.
- Wu, C. and Whitaker, J. R.(1990) Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans(*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1523.
- Kashland, N., Richardson, M.(1981) The complete amino acid sequence of a major wheat protein protein inhibitor of α -amylase. *Phytochemistry*, 20, 178.
- Warchalewski, J. R.(1977) Isolation and purification of native α -amylase inhibitors from winter wheat. *Bull. Acad. Polon Sci.*, 25, 731.
- Granum, P. E.(1978) Purification and characterization of an amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.*, 2, 103.
- Strumeyer, D. H. (1972) Protein amylase inhibitors in the fraction of wheat and rye flour: possible factors in celiac disease. *Nutr. Rep. Intern.*, 5, 45.
- Kneen, E. and Sandstedt. R. M.(1946) Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereal. *Arch. Biochem. Biophys.*, 9, 235.
- Mattoo, A. K. and Modi, V. V.(1970) partial purification and properties of enzyme inhibitors from unripe mangoes. *Enzymologia.* 39, 237.
- Stankovic, S. C. and Markovic, N. D.(1961) A study of amylase inhibitors on the acorn. *Glanik Hem Drustua, Beograd* 25-26519. *Chem. Abstr.*, 59, 3084d.
- Hemberg, T. and Larsson, I.(1961) The inhibitor beta complex from resting potato tubers as an inhibitor of α -amylase. *Physiol. Plant.*, 14, 422.
- Iguti, A. M. and Lajolo, F. M.(1991) Occurrence and purification of α -amylase isoinhibitors in bean(*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2131.
- Reddy, N. R. and Salunkhe, D. K.(1980) Alpha-amylase inhibitor and phytohemagglutinins of black bean(*Phaseolus mungo* L.). *J. Food Biochem.*, 4, 273.
- Gatehouse, A. M. R., Fenton, K. A. and Pavey, D. J.(1986) The effects of α -amylase inhibitors on insect storage pests: Inhibition of α -amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.*, 37, 727.
- Robertson, M. and Hill, R. D.(1989) Accumulation of an endogenous α -amylase inhibitor in barley during grain development. *J. Cereal Sci.*, 9 (3), 237.
- Sharma, K. K. and Pattabiraman, T. N. (1980) Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and characterisation of two α -amylase inhibitors from colocasia antiquorum tubers. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 981.
- Blanco-Labra, A. and Iturbe-Chinas, F. A. (1981) Purification and characterization of α -amylase inhibitor from maize(*Zea mays*). *J. Food Biochem.*, 5, 1.
- Mundy, J., Svendsen, I. and Hejgaard, J.(1983) Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. *Carlsberg Res. Commum.* 48, 81.

19. Lajolo, F. M., Mancini Filho, J. and Menezes, E. W.(1984) Effect of a bean *Phaseolus vulgaris*, α -amylase inhibitor on starch utilization. *Nutr. Rep.*
20. Weselake, R. J. et al.(1985b) Effect of endogenous barley α -amylase inhibitor on hydrolysis of starch under various conditions. *J. Cereal Sci.*, 3, 249.
21. Kruge, J. E. and Commission, C. G.(1972) Changes in the amylases of hard red spring wheat during germination. *Cereal Chem.*, 49, 391.
22. Pace, W., Parlamenti, R., Urrab, A., Silano, V. and Vittozzi, L.(1978) Protein α -amylase inhibitor from wheat flour. *Cereal Chem.*, 55, 244.
23. Kim, J. K., et al.(1985) Screening and classification of Actinomycetes producing α -amylase inhibitors and the isolation, their kinetic studies of α -amylase inhibitors. *Kur. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13(3), 223.
24. Bernfeld, P.(1955) Amylases, α and β *In Methods in Enzymol.* 1, 149.
25. Bradford, M. M.(1976) A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
26. Bio Rad Protein Assay(1979). *Bio Rad Laboratories Instruction Manual.*
27. A. O. A. C.(1980) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 14th ed. Washington, D. C.
28. Frels, J. M. and Rupnow, J. H.(1984) Purification and partial characterization of two α -amylase inhibitors from black bean(*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Biochem.*, 8, 281.
29. Marshall, J. J. and Laude, C. M.(1975) Purification and properties of phaselamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*, *J. Biol. Chem.*, 250(20), 8030.
30. 농촌진흥원.(1991) 식품성분표, 농촌진흥원 농촌영양개선연수원, 18.
31. Kotaru, M., Kimoto F., Yoshikawa, H., and Ikeuche, T.(1987) changes of α -amylase inhibitory activity in kidney beans during heating and germination. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 240.