KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 27, No. 5, pp. 762~767(1995)

한국산 검정콩 α-Amylase 저해물질의 분리 및 정제

문주석 · 배영일* · 심기환*
한국식품위생연구원, *경상대학교 식품공학과

Purification of α-Amylase Inhibitor from Black Bean in Korea

Ju-Seok Moon, Young-Il Bae* and Ki-Hwan Shim*
Korea Institute of Food Hygiene
**Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University*

Abstract

The α-amylase inhibitor from black bean(*Phaseolus vulgaris*) was purified to homogeneity using 70% saturated ammonium sulfate, DEAE-cellulose, Concanavalin-A sepharose chromatography and gel filtration with Superose 6. The purified α-amylase inhibitor showed a single band of 25 KD in molecular weight on the SDS-PAGE. The specific activity of the inhibitor was 544.0 units/mg and the purity was enhanced about 18-fold. The amino acids of α-amylase inhibitor from black bean was mainly glutamic acid, aspartic acid and lysine. The inhibitor was glycoproteins and its carbohydrate contents was 3.2%.

Key words: α-amylase inhibitor, black bean, specific activity, glycoprotein

서 론

α-Amylase(α-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.)의 저해물질은 Chrzaszcz와 Janicki[1]에 의해 처음으로 보고된 이래로 많은 식물체에 함유되어 있는 것으로 알려져 왔으며, 특히 두류중 강남콩[2], 검정콩[3], 완두콩[4] 등에서 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 식물체 중 이들의 생리적인 역할에 대해서는 아직 규명되어 있지 않으며 종자중의 단백질 저장체로서 작용한다는데 대해서는 여러가지 연구결과가 보고되고 있다[5,6]. 이 저해물질은 그 활성부위의 구조와 촉매반응기구의 해석에 이용되며, 다양한 생리기능에 있어서 효소의 역할 및 질병에 관여하는 효소의 해명에도 중요한 역할을 하고, 특히 α-amylase 저해물질은 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방과 치료제로서 응용이 기대되므로 임상적 의의도 크다[7].

두류중에는 Marshall과 Lauda[8]에 의해 단백질 α-amylase 저해물질이 분리된 후 그 구성성분과 구조[9], 특이성이 일부 보고되었으며[10], 결합기작[11], 동물에 대한 생화학적 활성도[12] 및 콩 자엽에서의 생리적인 특성[13]에 대한 연구가 계속 진행되고 있으나, 국내에서는 Kim 등[14]의 방선균에 의해 분리된 α-amylase 저해물질에 대한 연구와 Lee와 Yang[15]의 한국산 한약재의 α-amylase 저해물질의 검색 등이 있을 뿐, 식물체에서 분리한 α-amylase 저해물질에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국산 두류 중의 α-amylase 저해물질의 이화학적 특성에 관한 기초자료를 얻기 위하여 검정콩으로 부터 α-amylase 저해물질을 분리, 정제하여 그 저해물질의 분자량, 아미노산 함량 및 저해활성도 등을 조사하였다.

Corresponding author: Ki-Hwan Shim, Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 검정콩(*Phaseolus vulgaris*)은 진주 근교의 농가에서 구입한 시료를 사용하였다. 실험에 사용한 주요시약으로 DEAE-cellulose는 Whatman사, Concanavalin-A는 Pharmacia사, methyl-α-D-glucopyranoside와 porcine pancreatic 효소는 Sigma사 및 FPLC용 칼럼은 Pharmacia사, 전기영동에 사용한 시약은 Bio-Rad사 제품을 사용하였다.

α-Amylase 저해물질의 활성도 측정

α-Amylase 저해활성도는 Bernfeld의 방법[16]에 준하여 측정하였다. 즉 porcine pancreatic α-amylase(1 unit), α-amylase 저해물질 및 50 mM NaCl을 함유한 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.9)은 전체량을 0.63 ml로 하여 30℃에서 30분간 전처리한 후 2% 가용성 전분 0.37

ml를 가하고, 25℃에서 5분간 방치한 다음 dinitrosalicylic acid 수용액 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다시 반응혼합물을 끓는 수욕상에서 10분간 가열한 후 급속히 냉각한 다음, 증류수 10 ml를 가하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, blank test는 효소를 첨가하지 않고 상기의 방법에 준하여 행하였다. α-Amylase 활성도의 1 unit는 상기 분석조건하에서 5분이내에 maltose 1 μM을 유리시키는 효소의 양으로 하였으며, α-amylase 저해물질의 활성 1 unit는 상기 분석조건하의 5분이내에 효소 10%를 저해하는 양으로 하였다.

단백질의 농도 측정

α-Amylase 저해물질의 단백질 정량은 Bradford 방법[17]과 Bio-rad 단백질 정량법[18]을 병행하여 측정하였다. 즉 Bradford 시약 0.4 ml, 증류수 1.6 ml에 시료를 넣어 혼합한 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값은 bovine serum albumin으로 작성한 표준단백질 정량곡선을 이용하여 시료에 존재하는 단백질의 농도를 결정하였다.

저해물질의 분리 및 정제

검정콩(*Phaseolus vulgaris*) 200 g을 Waring blender로 분쇄한 후 45 mesh로 통과한 것을 diethyl ether를 이용하여 24시간 탈지하고 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.9) 1,000 ml를 가하여 3시간 교반시킨 다음 70℃ 항온수조에서 20분 가열하고 냉각한 후 원심분리(6,000×g, 30 min, 4℃)하여 상징액을 가제(gauze)로 여과하였다. 이 여과액은 황산암모늄으로 70% 포화 처리하여 얻은 침전물을 10 mM NaCl을 함유한 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 용해시킨 후, 4℃에서 24시간 투석시킨 다음 원심분리(6,000×g, 30 min, 4℃)하였다. 그 상징액을 동일 완충액으로 평형화 된 DEAE-cellulose 칼럼(2.0×30 cm)에 투입하여 세척한 후 0~1 M NaCl을 이용하여 선행기울기로 용출하였다. 이 중 저해활성도가 나타난 분획을 모아 농축한 후, Palmieri 등[19]의 방법으로 Concanavalin-A(Con-A) 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 충분히 투석한 후, Con-A 완충액으로 평형화 된 Con-A sepharose 칼럼에 시료를 투입하여 동일 완충액으로 세척하고 0.25 M methyl-α-D-glucopyranoside로 용출하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 이 중 저해활성도를 나타낸 분획을 농축한 후, 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 투석하여 fast performance liquid chromatography (FPLC, LKB LCC-50) superose 6칼럼을 사용하여 injection volume 400 μl, elution time 150 min, room temp. 4℃ 등의 조건으로 gel filtration하였다.

Capillary electrophoresis

검정콩에 황산암모늄을 포화 처리하고 이온교환 크로마토그래피로 정제과정을 거쳐 FPLC superose 6 칼럼으로 gel filtration하여 분획한 정제 α-amylase 저해물질의 순도 측정은 capillary electrophoresis(CE, Model 270A)를 사용하여 capillary column(75 μm×60 cm), injection volume 1.5 sec, detector wavelength 200 nm 등의 조건으로 분석하였다.

분자량의 측정

각 정제 단계별 전기영동 패턴과 최종 정제물질의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli의 방법[20]에 준하여 전기영동하였다. α-Amylase 저해물질과 표준단백질을 SDS-PAGE하여 Coomassie blue로 염색한 후, 각 표준단백질의 상대적인 이동거리(Rf)와 분자량에 대한 plot로써 subunit 분자량을 측정하였다. 이 때 표준단백질은 bovine albumin(66 KD), egg albumin(45 KD), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 KD), carbonic anhydrase(29 KD), trypsinogen(24 KD), trypsin inhibitor(20 KD), α-lactalbumin(14 KD)을 혼합한 MW-SDS-70 L kit를 사용하였다.

아미노산의 분석

α-Amylase 저해물질의 아미노산은 시료 300 μg을 분해용 시험관에 넣고 6 N HCl 2 ml를 가하여 질소가스로 산소를 제거한 후 밀봉하여 100±1℃에서 24시간 이상 가수분해한 저해물질을 시료 희석용 sodium citrate 완충액(pH 2.2)을 이용하여 최종용량이 500 μl되게 희석한 다음 membrane filter(pore size 0.22 μm)로 여과하였다. 이 시료를 아미노산 자동분석기(amino acid autoanalyzer, LKB-4150, England)를 이용하여 column ultrapas II cation exchange resin, flow rate buffer 400 ml/hr, ninhydrin 25 ml/hr, column temp. 50℃, reaction temp. 80℃ 등의 조건으로 분석하였다.

시료에 포함된 아미노산과 표준 아미노산의 면적은 다음의 식으로 계산하였다.

아미노산 양(mg%)=(시료의 peak 면적/표준 아미노산 peak 면적)×(아미노산 분자량/1,000)×(100/최초시료량)×(희석배수/주입용량)

정색반응

단백질 정색반응[21]은 Biuret, Ninhydrin 및 Xanthoprotein 반응으로 측정하였으며, 탄수화물 정색반응[21]은 Molish, Benedict, Barford 및 Fehling 반응으로 조사하였다.

탄수화물의 함량

검정콩 α-amylase 저해물질의 탄수화물 함량은 Dubois 등의 페놀 황산법[22]에 준하여 측정하였다.

결과 및 고찰

α-Amylase 저해물질의 정제

검정콩 α-amylase 저해물질을 DEAE-cellulose 칼럼에

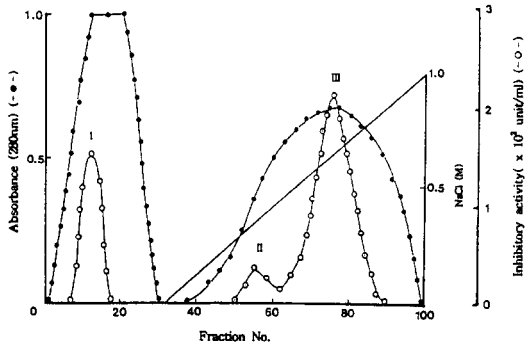

Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of the α-amylase inhibitor from black bean

Elution was carried out with a linear gradient of NaCl(0 to 1.0 M) in 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)

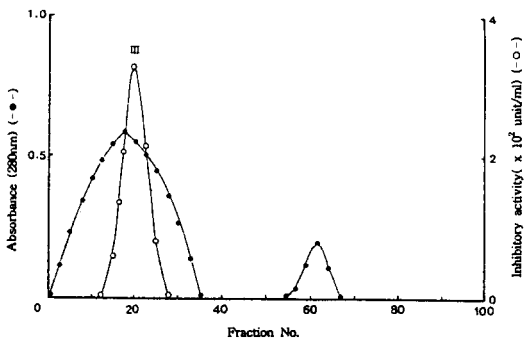

Fig. 2. Affinity chromatography of DEAE-cellulose fraction(III) on Concanavalin A-sepharose column from black bean

Elution was carried out with 0.25 M methyl-α-D-glucopyranoside in Concanavalin A-sepharose buffer(pH 7.4) Column size: 2.5×10 cm, Flow rate: 1 ml/min, Fraction: 1 ml/tube.

용출한 결과는 Fig. 1과 같다. 여기서 분획 No. 4~18, 51~61 및 63~90에서 각각 저해활성도가 나타났다(Fig. 1). 이들 분획중 No. 5~17, 52~56 및 66~82를 따로 모아 peak I, II 및 III로 명명하고 이들 중 저해활성도가 가장 높은 peak III의 분획을 모아 농축, 투석한 후 Concanavalin-A sepharose칼럼에 충진하여 0.25 M methyl-α-D-glucopyranoside로 용출한 결과, 분획 No. 12~27에서 저해활성도가 나타났다(Fig. 2). 이들 분획중 No. 14~24의 분획을 모아 농축한 후 FPLC superose 6 칼럼으로 gel filtration하여 정제하였으며(Fig. 3), 저해활성이 높은 분획 No. 17~18을 모아 농축하였다.

검정콩 α-amylase 저해물질의 정제결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 검정콩 추출액의 단백질 함량이 3,145 mg이던 것이 황산암모늄으로 70% 포화 처리시 1,100 mg으로 감소하였고, DEAE-cellulose를 통과하면서 peak

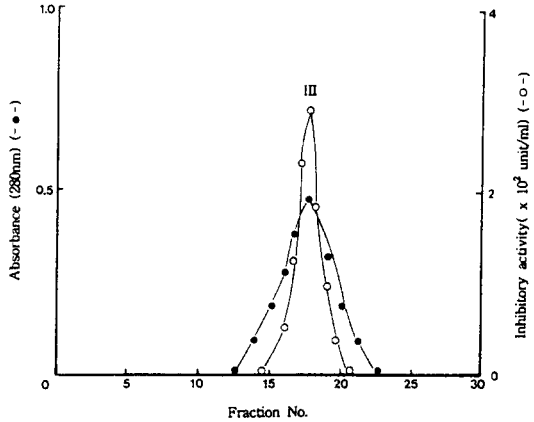

Fig. 3. Gel filtration fast performance liquid chromatography of Concanavalin A-sepharose fraction on superose 6 column from black bean

Elution was carried out with 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5). Flow rate: 0.2 ml/min, FractionL 1 ml /tube.

I, II 및 III는 각각 61.3, 12.6 및 56.7 mg으로 감소하였으며, 수율도 황산암모늄으로 70% 포화 처리시 62.0 %로 감소하였고, DEAE-cellulose 칼럼 통과시 peak I, II 및 III는 각각 10.9, 0.5 및 12.9%로 나타났다. 이중 peak III을 Con-A와 FPLC superose 6 칼럼에 통과시켰을 때 단백질량이 각각 5.5, 0.5 mg으로 감소하였으며, 수율도 1.9 및 0.3%로 감소하였다. 최초 추출액상태에서 비활성도가 30.6 units/mg이었던 것이 황산암모늄으로 70% 포화 처리시 54.2 units/mg으로 증가하였으며 정제도는 1.8이었다. DEAE-cellulose 칼럼 통과하였을 때 peak I, II 및 III의 정제도는 각각 5.6, 1.2 및 7.2였다. 이중 peak III를 Con-A 및 FPLC Superose 6 칼럼에 통과시켰을 때 비활성도가 각각 331.8, 544.0 units/mg으로 증가하였으며, 정제도도 각각 10.8, 17.8로 증가하였다.

Frels와 Rupnow[23]은 검정콩(*Phaseolus vulgaris*)에서 2종류의 α-amylase 저해물질을 정제하였는데 황산암모늄으로 포화처리, DEAE-sephadex, Phenyl-sepharose 및 Sephadex G-100 칼럼으로 정제하였을때 원 추출물의 단백질 함량이 2,200 mg이었던 것이 Phenyl-sepharose 칼럼 통과시 2종류의 저해물질 단백질 함량은 각각 3.5, 4.5 mg이였고, 수율도 20, 48%로 감소하였다. 이를 다시 Sephadex G-100 칼럼으로 정제하였을 때 수율이 각각 18, 39%로 감소하였고, 비활성도는 원 추출물이 17 units/mg이었던 것에 비해 365, 599 units/mg으로 증가하였는데 이중 비활성도가 낮은 저해물질을 다시 Phenyl-sepharose칼럼으로 정제하였을때 430 units/mg으로 증가하였다고 보고하였다.

이와같이 한국산 검정콩의 α-amylase 저해물질의 단

Table 1. Purification of α-amylase inhibitor from black bean

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	100.0	3,145	96,200	30.6	1.0	100.0
30~70% $(NH_4)_2SO_4$	40.0	1,100	59,640	54.2	1.8	62.0
Dialysis	15.0	850	56,236	66.2	2.2	58.5
DEAE-cellulosef						
Peak I	4.0	61.3	10,530	171.4	5.6	10.9
Peak II	2.0	12.6	477	37.9	1.2	0.5
Peak III	8.0	56.7	12,443	219.5	7.2	12.9
Concanavalin-A						
Peak III	2.0	5.5	1,825	331.8	10.8	1.9
FPLC (superose 6)						
Peak III	0.6	0.5	272	544.0	17.8	0.3

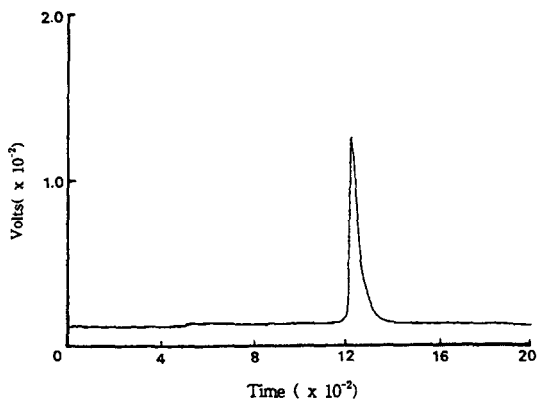

Fig. 4. Chromatogram of the purified α-amylase inhibitor on capillary electrophoresis from black bean
Injection volume was for 1.5 sec, running voltage was 20 KV and capillary column(7.5 10mm×60 cm) used.

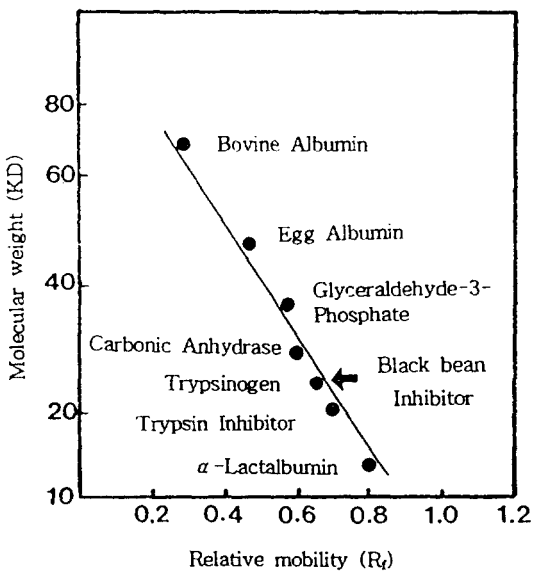

Fig. 5. Calibration curve typically obtained with proteins from the MW-SDS-Kit(10% gels)
Molecular weight marker proteins in MW-SDS-70 L; 66 KD: Bovine albumin, 45 KD: Egg albumin, 36 KD: Glyceraldehyde-3-phosphate, 29 KD: Carbonic anhydrase, 24 KD: Trypsinogen, 20 KD: Trypsin inhibitor, 14 KD: α-Lactalbumin

백질 함량, 수율 및 비활성도는 Frels와 Rupnow[23]가 보고한 검정콩α-amylase 저해물질에 비해 상당히 낮게 나타났다.

순도

FPLC superose 6 칼럼에서 gel filtration한 분획을 농축한 후 capillary electrophoresis를 이용하여 검정콩 저해물질의 순도를 측정한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 gel filtration 결과와 유사한 단일물질이었다.

분자량

검정콩 α-amylase 저해물질을 SDS-PAGE 상에서 확인한 결과는 Fig. 5와 같았으며, 분자량은 표준단백질과 비교하였을 때 25 KD로 추정되었다. 이는 Frels와 Rupnow[23]는 검정콩 α-amylase 저해물질 47 및 49 KD, Lajolo와 Filho[24]는 검정 강남콩 53 KD 및 Marshall과 Lauda[25]는 강남콩에서 정제한 phaseolamin의 49 KD보다 낮았다.

아미노산의 조성

산가수분해법으로 분석한 검정콩 α-amylase 저해물질의 아미노산 조성을 조사한 결과는 Table 2와 같이 총 16가지 아미노산이 확인되었으며, glutamic acid, aspartic acid 및 lysine이 전체의 40.92%를 차지하였고, 다음으로 glycine, leucine 및 isoleucine 순으로 함량이 많았으며, tyrosine, methionine 및 proline은 적었다. Lajolo와 Filho[24]는 검정 강남콩 α-amylase 저해물질에서는 aspartic acid, serine, glutamic acid, valine 및 threonine이 풍부한 반면 함유황 아미노산은 적었다고 보고하였으며, Po-

Table 2. Amino acid composition of α-amylase inhibitorsfrom black bean (dry basis)

Amino acid	Recovery (mg%)	%
Aspartic acid	12748	15.98
Threonine	3591	4.50
Serine	4095	5.13
Glutamic acid	13140	16.47
Proline	2345	2.94
Glycine	6543	8.20
Alanine	3132	3.92
Valine	4876	6.08
Methionine	tr	tr
Isoleucine	5175	6.49
Leucine	5180	6.49
Tyrosine	tr	tr
Phenylalanin	4248	5.32
Histidine	3807	4.77
Lysine	6759	8.47
Arginine	4181	5.24
Total	79820	100.00

Tr means Trace.

wer와 Whitaker[25]는 붉은 강남콩 저해물질에서 serine, aspartic acid, valine, glutamic acid 순으로 나타났다고 보고하였다. 또한 Saunders와 Lang[26]은 밀에서 2종류의 α-amylase 저해물질을 분리하였는데 그 저해물질의 아미노산 조성은 glutamic acid, alanine 및 leucine 순으로 함량이 많았다고 보고하였으며, Granum과 Whitaker[27]는 밀에서 3개의 저해물질을 정제하였는데 3개의 저해물질은 각각 alanine, glutamic acid 및 proline, glutamic acid, valine 및 proline과 glutamic acid, alanine 및 proline 순으로 그 함량이 많았다고 보고하였다.

이와같이 일반적으로 검정 및 붉은 강남콩 α-amylase 저해물질의 아미노산 조성은 aspartic acid, serine 및 glutamic acid 등의 순으로 많았는데 비해 본 연구의 한국산 검정콩의 저해물질 중 아미노산 조성은 glutamic acid, aspartic acid 및 lysine 순으로 이들과 다소 함량의 차이가 있었다.

정색반응

검정콩 α-amylase 저해물질은 Biuret, Ninhydrin, Xanthoprotein, Molisch 및 Fehling 반응에서 정색을 나타내는 것으로 보아 당단백질로 구성되어 있는 것으로 추측된다(Table 3). Frels와 Rupnow[23]는 검정콩에서 2개의 α-amylase 저해물질을 정제하였는데, 그 물질들은 당단백질 이었다고 보고하였으며, O'connor와 Mcgeeney[28]는 밀에서 4종류 α-amylase 저해물질을 분리하였는데 그 중 3종류가 당단백질로 구성되어 있었다고 보고하였다.

탄수화물의 함량

검정콩 α-amylase 저해물질중 탄수화물의 함량은 3.2%였다. O'Connor와 Mcgeeney[28]는 밀에서 4개의 α-amylase 저해물질을 정제하였는데, 그 물질들의 탄수화물 함량은 1.5, 2.3 및 2.0%였으며, 나머지 하나는 검출되지 않았다고 보고하였고, Blanco-Labra와 Iturbe-Chinas[6]는 옥수수에서 분리한 α-amylase 저해물질 중에는 탄수화물이 검출되지 않았다고 보고하였다. Frels와 Rupnow[23]는 검정콩에서 분리한 2종류의 α-amylase 저해물질은 각각 7.5 및 9%의 탄수화물을 함유하였다고 하였으며, Lajolo와 Filho[24]는 검정콩 저해물질에 탄수화물이 14.5%, Marshall과 Lauda[8]는 강남콩 α-amylase 저해물질에서 탄수화물이 8.6% 함유되었다고 보고하였는데, 본 연구에서의 저해물질 중 탄수화물 함량은 이들의 결과보다 상당히 낮게 나타났다.

Table 3. Color reaction of α-amylase inhibitors from black bean

Reaction	Response
Protein Biuret	+
Ninhydrin	+
Xanthoprotein	+
Carbohydrate Molisch	+
Benedict	−
Barford	−
Fehling	+

+: positive −: negative

요 약

한국산 두류 중의 α-amylase 저해물질의 이화학적 특성에 관한 기초자료를 얻기 위하여 검정콩으로 부터 α-amylase 저해물질을 분리, 정제하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 검정콩 α-amylase 저해물질도 SDS-PAGE 상에서 단일밴드를 확인하였고, capillary electrophoresis에서 순도를 확인하였으며, 정제된 저해물질의 비활성도는 544.0 units/mg, 정제도는 약 18배였으며, SDS-PAGE 상에서 분자량은 25 KD이였다. 검정콩 α-amylase 저해물질의 주요 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid 및 lysine 순이었다. 정색반응 결과 검정콩 α-amylase 저해물질은 당단백질로 추정되었으며, 탄수화물 함량은 3.2%로 나타났다.

감사의 글

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

문 헌

1. Chrzaszcz, T. and Janicki, J.: "Sisto-amylase", A natural inhibitor of amylase. *Chem. Abstr.*, 27, 3491 (1933)

2. Bowman, D.E.: Amylase inhibitor of navy beans. *Science.*, **102**, 358 (1945)
3. Jaffe, W.G., Moreno, R. and Wallis, V.: Amylase inhibitors in legume seeds. *Nutr. Rep. Inter.*, **7**, 169 (1973)
4. Jane, M.F. and John, H.R.: Characterization of two α-amylase inhibitors from black bean(Phaseolus vulgaris). *J. Food Sci.*, **50**, 72 (1985)
5. Gatehouse, A.M.R., Fenton, K.A. and Pavey, D.J.: 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 (1986)
6. Blanco-Labra, A. and Iturbe-Chinas, F.A.: Purification and characterization of α-amylase inhibitor from maize (Zea maize). *J. Food Biochem.*, **5**, 1 (1981)
7. Puls, W., and Keup, U.: Influence of α-amylase inhibitor(BAY D 7791) on blood-glucose, serum-insulin and NEFA in starch loading tests in rats, dogs and man. *Diabetologia.*, **9**, 97 (1973)
8. Marshall, J.J.and Lauda, C.M.: Assay of alpha-amylase inhibitor activity in legumes. *Die Starke'27.*, 274 (1975)
9. Gomez, L., S.M. Rosa, G.O. Francisco, Salcedo, G.: Wheat tetrameric inhibitors of insect α-amylase: alloploid heterosis at the molecular level. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 3242 (1989)
10. Pick, K.H. and Wober, G.: Proteinaceous α-amylase inhibitor from beans(Phaseolus vulgaris). Purification and characterization. *Physiol. Chem.*, **359**, 1371 (1978)
11. Tanizaki, M.M. and Lajolo, F.M.: Kinetics of the interaction of pancreatic α-amylase with a kidney bean *Phaseolus vulgaris* α-amylase inhibitor. *J. Food Biochem.*, **9**, 71 (1985)
12. Menezes, E.W. and Lajolo, F.M.: Inhibition of starch digestion by a black α-amylase inhibitor, in normal and diabetic rats. *Nutr. Rep. Int.*, **36**, 1185 (1987)
13. Altabella, T., Chrispeels, M.J.: Tobacco plants transformed with the bean ai gene express an inhibitor of insect α-amylase in their seeds. *Plant Physiol.*, **93**, 805 (1990)
14. Kim, J.K., Kim, J.W., Kim, H.W., Shim, M.J., Choi, E.C and Kim, B.K.: Screening and classification of Actinomycetes producing α-amylase inhibitors and the isolation, their kinetic Studies of α-amylase inhibitors. *Kor, J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 223 (1985)
15. Lee, K.S. and Yang, C.B.: Screening of oriential drugs for α-amylase inhibitor. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 644 (1988)
16. Bernfeld, P.: Amylases, α and β. *In Methods in Enzymol.*, **1**, 149 (1955)
17. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
18. Bio Rad Protein Assay.: *Bio Rad Labortories Instruction Manual.*, 58 (1992)
19. Palmieri, S.R., R. Lori and O. Leoni.: Myrosinase from Sinapis alba L.: A new method of purification for glucosinolate analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 138 (1986)
20. Laemmli, U.K. *et. al.*: Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature.*, **27**, 680 (1972)
21. 한국생화학회 교재편찬위원회. 실험생화학, p.245 (1991)
22. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
23. Frels, J.M. and Rupnow, J.H.: Purification and partial characterization of two α-amylase inhibitors from black bean(*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Biochem.*, **8**, 281 (1984)
24. Lajolo, F.M. and Filho, F.F.: Partial characterization of the amylase inhibitor of black bean (*Phaseolus vulgaris*). Variety Rico 23. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132 (1985)
25. Powers, J.R. and Whitaker, J.R. Purification and some physical propertied and chemical properties of red kidney bean(Phaseolus vulgaris) α-amylase inhibitor. *J. Food Biochem.*, **1**, 217 (1977a)
26. Saunders, R.M. and Lang. J.A.: α-Amylase inhibitor in Triticum aestvum purification and physical-chemical properties. *Phytochem.*, **12**, 1237 (1973)
27. Granum, P.E. and Whitaker, J.R.: Purification and characterization of α-Amylase inhibitors in wheat(*Triticum aestivum* var. Anza.). *J. Food Biochem.*, **1**, 385 (1977)
28. O'Connor, C.M. and Mcgeeney, K.F.: Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificites for human salivary and human pancreatic α-amylase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **658**, 387 (1981)

(1995년 5월 1일 접수)