

## 한국산 쌀보리 $\alpha$ -Amylase 저해물질의 분리 및 정제

문주석 · 신창식\* · 최진상\* · 박석규\*\* · 심기환\*†

한국식품위생연구원

\*경상대학교 식품공학과

\*\*순천대학교 식품영양학과

## Purification of $\alpha$ -Amylase Inhibitor from Naked Barley in Korea

Ju-Seok Moon, Chang-Shik Shin\*, Jine-Shang Choi\*, Seok-Kyu Park\*\* and Ki-Hwan Shim\*†

Korea Institute of Food Hygiene, Seoul 156-050, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*\*Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

### Abstract

The  $\alpha$ -amylase inhibitor from naked barley was purified by DEAE-cellulose, Concanavalin-A sepharose and superose 6 column chromatography, and confirmed by capillary electrophoresis. The purified  $\alpha$ -amylase inhibitor showed a single band of 29KD in molecular weight when estimated by the SDS-PAGE. Its purity was increased by 12-fold as compared to its crude extract, and its specific activity was found to be 336.7units/mg. The major amino acids of the  $\alpha$ -amylase inhibitor from naked barley was appeared to be glutamic acid, aspartic acid and arginine. The inhibitor from naked barley was glycoproteins and carbohydrate content of inhibitor was 1.0%.

**Key words :**  $\alpha$ -amylase inhibitor, naked barley, specific activity, glycoproteins

### 서 론

$\alpha$ -Amylase ( $\alpha$ -D-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1)의 저해물질은 Chrzaszcz와 Janicki (1)에 의해 처음으로 보고된 이래 많은 식물체에 함유되어 있는 것으로 알려졌으며 (2,3), 특히 밀 (4), 옥수수 (5), 귀리 (6), 망고 (7) 등에서 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 식물체 중 이들의 생리적인 역할에 대해서는 아직 규명되어 있지 않으며 종자 중의 단백질 저장체로서 작용한다는 데 대해서는 여러가지 연구결과가 보고되고 있다 (8,9). 이 저해물질은 그 활성 부위의 구조와 촉매반응 기구의 해석에 이용되며, 다양한 생리기능에 있어서 효소의 역할 및 질병에 관여하는 효소의 해명에도 중요한 역할을 하고, 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방과 치료제로서 응용이 기대되므로 임상적 의의도 크다 (10).

일반적으로 저해물질의 활성도는 곡류가 성숙되는

동안에 증가하고  $\alpha$ -amylase 활성도는 감소하는 반면에, 곡류가 발아되는 동안에는 저해물질의 활성도는 감소하고  $\alpha$ -amylase 활성도는 증가한다고 알려져 있다 (2). 특히, 식물체 중 곡류와 두류의  $\alpha$ -amylase 저해물질에 대한 연구가 외국의 여러 연구자들에 의해 다양하게 보고되고 있으나 (11), 국내에서는 Kim 등 (12)의 방선균에 의해 분리된  $\alpha$ -amylase 저해물질에 대한 연구와 Lee와 Yang (13)의 한약재의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 검색 등이 있을 뿐, 식물체에서 분리한  $\alpha$ -amylase 저해물질에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 한국산 곡류 중의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 이화학적 특성에 관한 기초자료를 얻기 위하여, 쌀보리로부터  $\alpha$ -amylase 저해물질을 분리, 정제하여 그 저해물질의 분자량, 아미노산 함량 및 저해활성도 등을 조사하였다.

† To whom all correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 쌀보리 (*Hordeum vulgare*)는 진주 근교의 농가에서 구입한 시료를 사용하였다. 실험에 사용한 주요 시약으로 DEAE-cellulose는 Whatman사, Concanavalin-A는 Pharmacia사, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside는 Sigma사 및 FPLC용 칼럼은 Pharmacia사, 전기영동에 사용한 시약은 Bio-Rad사 제품을 사용하였다.

### $\alpha$ -Amylase 저해물질의 활성도 측정

$\alpha$ -Amylase 저해물질의 활성도는 Bernfeld의 방법 (14)에 준하여 측정하였다. 즉 porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (1 unit),  $\alpha$ -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 수욕상에서 10분간 가열한 후 급속히 냉각한 다음, 증류수 10ml를 가하고 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 바탕시험은 효소를 첨가하지 않고 상기의 방법에 준하여 행하였다.

### 단백질의 농도 측정

$\alpha$ -Amylase 저해물질의 단백질 정량은 Bradford 방법 (15)과 Bio-rad 단백질 정량법 (16)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. 1).

### 저해물질의 분리 및 정제

쌀보리 (*Hordeum vulgare*) 분말 200g을 Waring blender로 분쇄한 후 diethyl ether를 이용하여 24시간 탈지하고 20mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.9) 1,000ml를 가하여 3시간 교반시킨 다음 70°C 항온수조에서 20분 가열하고 냉각한 후 원심분리 (8,000rpm, 30min, 4°C) 하여 상정액을 가제 (gauze)로 여과하였다. 이 여과액은 황산암모늄으로 70% 포화 처리하여 얻은 침전물을 10mM NaCl을 함유한 20mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.5)으로 용해시킨 후, 4°C에서 24시간 투석시킨 다음 원심분리 (8,000rpm, 30min, 4°C)하였다. 그 상정액을 동일 완충액으로 평형화된 DEAE-cellulose 칼럼

(2.0×30cm)에 투입하여 세척한 후 0~1M NaCl을 이용하여 선형기울기로 용출하였다. 이 중 저해활성도가 나타난 분획을 모아 농축한 후, Palmieri 등 (17)의 방법으로 Concanavalin-A (Con-A) 완충액 (10mM Tris-HCl Buffer, pH 7.4)에 충분히 투석한 후, Con-A 완충액으로 평형화된 Con-A sepharose 칼럼에 시료를 투입하여 동일 완충액으로 세척하고 0.25M methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside로 용출하였다. 이 중 저해활성을 나타낸 분획을 농축한 후, 20mM sodium phosphate 완충액 (pH 7.5)으로 투석하여 fast performance liquid chromatography (FPLC, LKB LCC-50) superose 6 칼럼을 사용하여 injection volume 400 $\mu$ l, elution time 150min, room temp. 4°C 등의 조건으로 gel filtration하였다.

### Capillary electrophoresis

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

### 분자량의 측정

각 정제 단계별 전기영동 패턴과 최종 정제물질의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 등의 방법 (18)에

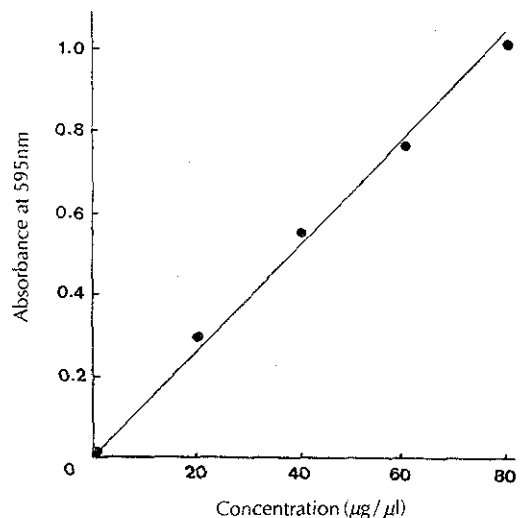


Fig. 1. Standard curve bovine serum albumin by the Bradford method.

준하여 전기영동하였다.  $\alpha$ -Amylase 저해물질과 표준 단백질은 SDS-PAGE하여 Coomassie blue로 염색한 후, 각 표준단백질의 상대적 이동거리 (Rf)와 분자량에 대한 plot로써 subunit 분자량을 측정하였다.

아미노산의 분석

$\alpha$ -Amylase 저해물질의 아미노산은 아미노산 자동분석기 (LKB-4150)를 이용하여 column (ultrapas II cation exchange resin), flow rate buffer 400ml/hr, ninhydrin 25 ml/hr, column temp. 50°C, reaction temp. 80°C 등의 조건으로 분석하였다.

정색반응

단백질 정색반응은 Biuret, Ninhydrin 및 Xanthoprotein 반응(19)으로 측정하였으며, 탄수화물 정색반응은 Molish, Benedict, Barfoed 및 Fehling 반응(19)으로 조사하였다.

탄수화물의 함량

쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질의 탄수화물 함량은 Du-bois 등의 방법 (20)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

$\alpha$ -Amylase 저해물질의 정제

쌀보리 저해물질을 DEAE-cellulose 칼럼에 용출한 결과, 분획 No. 52-66, 68-94에서 각각 저해활성도가 나타났다(Fig. 2). 이들 분획 No. 55-65, 75-86을 각각 따로 모아 peak I, II로 명명하여 이들 중 저해활성도가

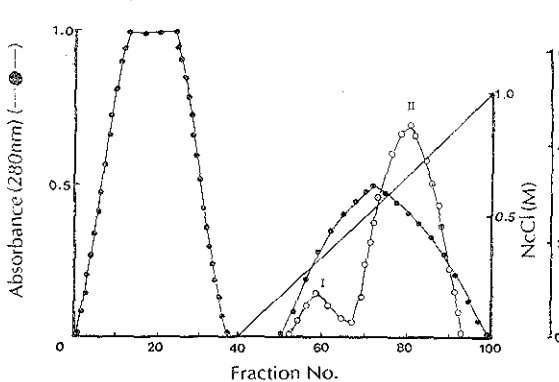


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of the  $\alpha$ -amylase inhibitor from naked barley. Elution was carried out with a linear gradient (0 to 1.0M) of NaCl in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). Column size : 2.5×30cm, Flow rate : 3ml/min, Fraction : 9ml/tube.

가장 높은 peak II의 분획을 모아 농축, 투석한 후 Concanavalin-A sepharose 칼럼에 충전하여 0.25M methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside로 용출한 결과, 분획 No. 8~30에서 저해활성도가 나타났다(Fig. 3). 이들 분획 No. 16-23을 모아 농축한 후 FPLC superose 6 칼럼으로 gel filtration하여 정제하였으며(Fig. 4), 저해활성도가 높은 분획 No. 16-17을 모아 농축하였다.

쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질의 정제결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 쌀보리 추출물의 단백질 함량이 1,508mg이던 것이 황산암모늄으로 70% 포화 처리시 531mg으로 감소하였고, DEAE-cellulose 칼럼을 통과하

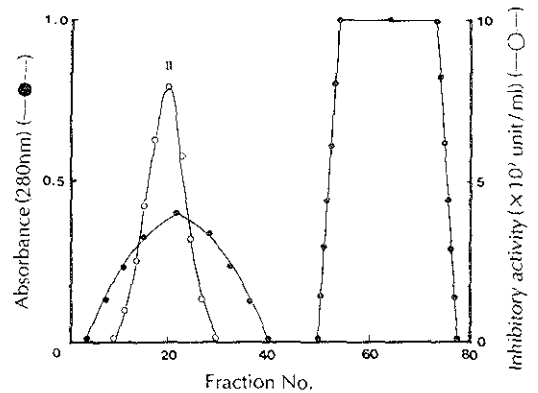


Fig. 3. Affinity chromatography of DEAE-cellulose fraction (II) on Concanavalin-A sepharose column from naked barley. Elution was carried out with 0.25M methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside in Concanavalin-A sepharose buffer (pH 7.4). Column size : 2.5×10cm, Flow rate : 1ml/min, Fraction : 1ml/tube.

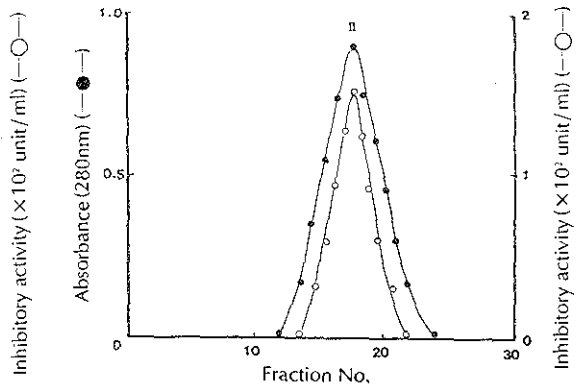


Fig. 4. Gel filtration fast performance liquid chromatography of Concanavalin-A sepharose fraction on superose 6 column from naked barley. Elution was carried out with 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). Flow rate : 0.2ml/min, Fraction : 1ml/tube.

Table 1. Purification of  $\alpha$ -amylase inhibitor from naked barley

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	150.0	1,508	41,020	27.2	1.0	100.0
30-70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50.0	531	28,960	54.5	2.0	70.6
Dialysis	20.0	427	27,430	64.2	2.4	66.9
DEAE-cellulose						
Peak I	3.5	15.4	462	30.0	1.1	1.1
Peak II	5.5	28.5	3,112	109.2	4.0	7.6
Concanavalin-A						
Peak II	2.5	1.8	309	171.8	6.3	0.8
FPLC (superose 6)						
Peak II	0.5	0.3	101	336.7	12.4	0.2

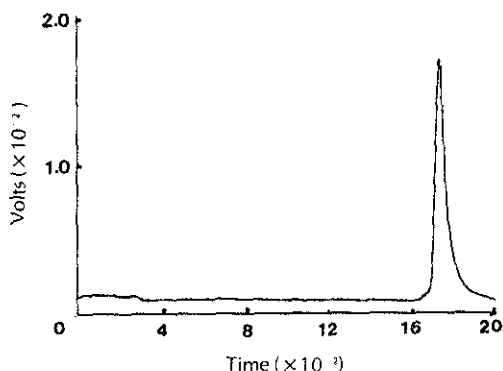


Fig. 5. Chromatogram of the purified  $\alpha$ -amylase inhibitor on Capillary electrophoresis from naked barley. Injection volume was for 1.5sec, running voltage was 20KV and capillary column ( $75\mu\text{m} \times 60\text{cm}$ ) used.

면서 peak I과 II는 각각 15.4, 28.5mg으로 감소하였으며, 수율도 황산암모늄으로 70% 포화 처리하였을 때 70.6%로 감소하였고, DEAE-cellulose 칼럼 통과시 peak I은 1.1, peak II는 7.6%로 나타났다. 이중 peak II를 Con-A와 FPLC superose 6 칼럼에 통과시켰을 때 단백질량이 1.8, 0.3mg으로 감소하였으며, 수율도 0.8 및 0.2%로 감소하였다. 최초 추출액 상태에서 비활성도는 27.2 units/mg이었던 것이 황산암모늄으로 70% 포화 처리시 54.5units/mg으로 증가하였으며 정제도는 2.0였다. DEAE-cellulose 칼럼 통과시는 peak I의 비활성도는 30.0, peak II는 109.2였다. 이중 peak II를 Con-A 및 FPLC superose 6 칼럼에 통과시켰을 때 비활성도가 171.8, 336.7units/mg으로 증가하였으며, 정제도도 6.3 및 12.4로 증가하였다. Blanco-Labra 등(9)도 옥수수 추출액 200ml에 황산암모늄으로 60% 포화 처리하여 Sephadex G-75 및 G-150 칼럼으로 정제하였는데, 옥수수 추출물의 단백질 함량이 956mg이던 것이 황산암모늄으로 60% 포화 처리시 48mg으로 감소하였으며, 수율도 황산암모늄으로 60% 포화 처리시 48%로 감소하였고,

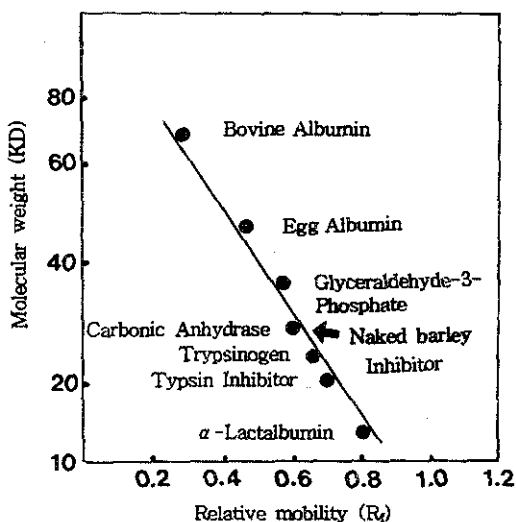


Fig. 6. Calibration curve typically obtained with proteins from the MW-SDS Kit (10% gels).

Molecular weight marker proteins in MW-SDS-70L ; 66KD : Bovine albumin, 45KD : Egg albumin, 36KD : Glyceraldehyde-3-phosphate, 29KD : Carbonic anhydrase, 24KD : Trypsinogen, 20KD : Trypsin inhibitor, 14KD :  $\alpha$ -Lactalbumin

Sephadex G-75 칼럼 통과시 28%로 감소하였다. 최초 추출액 상태에서 비활성도는 0.49units/mg이었던 것이 황산암모늄으로 60% 포화 처리시 4.6units/mg으로 증가하였으며 정제도는 9.5였다고 보고하였다.

순도

FPLC superose 6 칼럼에서 gel filtration한 분획을 농축한 후 capillary electrophoresis를 이용하여 쌀보리 저해물질을 측정한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 gel filtration 결과와 유사한 단일물질이었다.

### 분자량

쌀보리의  $\alpha$ -amylase 저해물질을 SDS-PAGE 상에서 확인한 결과 분자량은 표준단백질과 비교하였을 때 29KD로 추정되었으며 (Fig. 6), 이는 Baker 등 (21,22)의 쌀  $\alpha$ -amylase 저해물질 10KD 보다는 높았으며, 밀에서 정제한 53KD 보다는 낮았고, O'Donnell 등 (23)의 밀에서 정제한 21KD과 유사하였다.

### 아미노산의 조성

산가수분해법으로 분석한 쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질의 아미노산 조성을 조사한 결과는 Table 2와 같이 총 16가지 아미노산이 확인되었으며, 쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질의 경우는 glutamic acid, aspartic acid 및 arginine이 전체의 30.79%를 차지하였고 다음으로 histidine, proline 및 threonine 순으로 함량이 많았으며 tyrosine, methionine 및 phenylalanine 함량은 적었다. Saunderson과 Lang (24)은 밀에서 2종류의  $\alpha$ -amylase 저해물질을 분리하였는데 그 저해물질의 아미노산 조성은 glutamic acid, alanine 및 leucine 순으로 함량이 많았다고 보고하였으며, Shainkin와 Birk (25)은 밀에서 2종류의 저해물질 중 하나는 valine, alanine 및 proline 순으로 함량이 많았으며, 다른 하나는 alanine, glutamic acid 및 glycine 순으로 나타났다고 보고하였고, Granum와 Whitaker (26)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.

이와 같이 쌀보리의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 아미노산 조성과 밀의 아미노산 조성간에는 다소 함량의 차이가 있었다.

### 정색반응

쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질은 Biuret, Ninhydrin, Xanthoprotein, Molisch 및 Fehling 반응에서 정색을 나타내는 것으로 보아 당단백질로 구성되어 있는 것으로 추측된다 (Table 3). O'Connor와 Mcgeeney (27)은 밀에서 4종류  $\alpha$ -amylase 저해물질을 분리하였는데 그 중 3종류가 당단백질로 확인되었으며, Frels와 Rupnow (28)은 검정콩에서 2개의  $\alpha$ -amylase 저해물질을 정제하였는데 그 물질들은 당단백질로 구성되어 있다고 보고하였다.

### 탄수화물의 함량

쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질 중의 탄수화물의 함량은 1.0%였다. O'Connor와 Mcgeeney (27)은 밀에서 4개의  $\alpha$ -amylase 저해물질을 정제하였는데 그 물질들의 탄수화물 함량은 각각 1.5, 2.3 및 2.0%였으며 나머지 하나는 검출되지 않았다고 보고하였으며, Frels와 Rupnow (28)는 검정콩에서 분리한 2종류의  $\alpha$ -amylase 저해물질에는 각각 7.5 및 9%의 탄수화물을 함유하였다고 보고하였다. 또한 흰 완두콩 (29)에서는 9~10%, 붉은 완두콩 (30)에서는 8.6%의 탄수화물이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다.

이와같이 쌀보리 중의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 탄수화물 함량과 밀, 검정콩 및 완두콩 중의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 탄수화물을 비교할 때 곡류가 두류 보다  $\alpha$ -amylase 저해물질의 탄수화물 함량이 적은 것으로 생각된다.

Table 2. Amino acid composition of the purified  $\alpha$ -amylase inhibitors from naked barley (dry basis)

Amino acid	Barley	
	Contents (mg%)	%
Aspartic acid	9872	10.65
Threonine	7060	7.62
Serine	5032	5.43
Glutamic acid	10980	11.85
Proline	7320	7.90
Glycine	5532	5.97
Alanine	5572	6.01
Valine	6180	6.67
Methionine	1920	2.07
Isoleucine	3260	3.52
Leucine	6392	6.90
Tyrosine	1240	1.34
Phenylalanine	2240	2.42
Histidine	7600	8.20
Lysine	4780	5.16
Arginine	7680	8.29
Total	92660	100.00

Table 3. Color reaction of the purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from naked barley

Reaction	Result
Protein	
Biuret	+
Ninhydrin	+
Xanthoprotein	+
Carbohydrate	
Molisch	+
Benedict	-
Barfoed	-
Fehling	+

## 요 약

한국산 곡류 중의  $\alpha$ -amylase 저해물질의 이화학적 특성에 관한 기초자료를 얻기 위하여, 쌀보리로부터  $\alpha$ -amylase 저해물질을 분리, 정제하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질은 DEAE-cellulose, Concanavalin-A sepharose 및 FPLC superose 6 칼럼을 이용하여 분리·정제한 다음, SDS-PAGE 상에서 단일밴드를 확인하였고, capillary electrophoresis에서 순도를 확인하였으며, 정제된 저해물질의 비활성도는 336.7units/mg, 정제도는 약 12배였으며, SDS-PAGE 상에서 분자량은 29KD였다. 쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질의 주요 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid 및 arginine 순으로 높았다. 정색반응 결과 쌀보리  $\alpha$ -amylase 저해물질은 당단백질로 추정되었으며, 탄수화물 함량은 1.0%로 나타났다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

- Chrzaszcz, T. and Janicki, J. : " Sisto-amylase ", a natural inhibitor of amylase. *Chem. Abstr.*, **27**, 3491 (1933)
- Abdul-Hussain, S. : Proteinaceous  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitors in relation to preharvest sprouting of wheat. *Diss. Abstr. Int.*, **47**, 2697 (1981)
- Wu, C. and Whitaker, J. R. : Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). *J. Agric. Food. Chem.*, **38**, 1523(1990)
- Kashland, N. and Richardson, M. : The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of  $\alpha$ -amylase. *Phytochemistry*, **20**, 178 (1981)
- Strumeyer, D. H. : Protein amylase inhibitors in the fraction of wheat and rye flour : possible factors in celiac disease. *Nutr. Rep. Intern.*, **5**, 45 (1972)
- Kneen, E. and Standstedt, R. M. : Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereal. *Arch. Biochem. Biophys.*, **9**, 235 (1946)
- Mattoo, A. K. and Modi, V. V. : Partial purification and properties of enzyme inhibitors from unripe mangoes. *Enzymologia*, **39**, 237 (1970)
- Gatehouse, A. M. R., Fenton, K. A. and Pavey, D. J. : The effects of  $\alpha$ -amylase inhibitors on insect storage pests : Inhibition of  $\alpha$ -amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 727 (1986)
- Blanco-Labra, A. and Iturbe-Chinas, F. A. : Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.*, **5**, 1 (1981)
- Puls, W. and Keup, U. : Influence of  $\alpha$ -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)
- Jones, B. L. and Meredith, P. : Inactivation of  $\alpha$ -amylase activity by purothionins. *Cereal Chem.*, **59**, 321 (1982)
- 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  $\alpha$ -amylase inhibitors and the isolation, their kinetic studies of  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Kur. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 223 (1985)
- Lee, K. S. and Yang, C. B. : Screening of oriental drugs for  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 644 (1988)
- Bernfeld, P. : Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . In *Methods in Enzymol.*, **1**, 149 (1955)
- Bradford, M. M. : A rapid and sensitive methods for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- Bio Rad Protein Assay : *Bio Rad Laboratories Instruction Manual*. (1979)
- Palmieri, S. R., Lori, R. and Leoni, O. : Myrosinase from *Sinapis alba* L. : A new method of purification for glucosinolate analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 138 (1986)
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 한국생화학회 교재편찬위원회 : 실험생화학. p.245 (1991)
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. : Olorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- Baker, J. E. and Woo, S. M. : Purification, partial characterization, and post-embryonic levels of amylases from *sitophilus oryzae* and *sitophilus granarius*. *Archs. Insect Biochem. Physiol.*, **2**, 415 (1985)
- Baker, J. E. : Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) by high performance liquid chromatography and their interaction with partially purified amylase inhibitors from wheat. *Insect Biochem.*, **17**, 37 (1987)
- O'Donnell, J. D., Fitzgerald, O. and McGeeney, K. F. : Differential serum amylase determination by use of an inhibitors, and design of a routine procedure. *Clin. Chem.*, **23**, 560 (1977)
- Saunders, R. M. and Lang, J. A. :  $\alpha$ -Amylase inhibitor in *Triticum aestivum* purification and physical-chemical properties. *Phytochem.*, **12**, 1237 (1973)
- Shainkin, R. and Birk, Y. :  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat isolation and characterization. *Biochem. Biophys. Acta*, **221**, 502 (1970)
- Granum, P. E. and Whitaker, J. R. : Purification and

- characterization of  $\alpha$ -amylase inhibitors in wheat (*Triticum aestivum* var. Anza). *J. Food Biochem.*, **1**, 385 (1977)
27. O'Connor, C. M. and Mcgeeney, K. F. : Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Biochem. Biophys. Acta*, **658**, 387 (1981)
28. Frels, J. M. and Rupnow, J. H. : Characterization and two  $\alpha$ -amylase inhibitors from black bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, **50**, 72 (1985)
29. Marshall, J. J. and Lauda, C. M. : Purification and properties of phaselamin, an inhibitor of  $\alpha$ -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030 (1975)
30. Powers, J. R. and Whitaker, J. R. : Purification and some physical properties and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -amylase inhibitor. *J. Food Biochem.*, **1**, 217 (1977a)

(1995년 5월 1일 접수)