

White Kidney bean(*Phaseolus vulgaris*)로부터 α -Amylase 저해제의 분리 · 정제

전승호 · 류일환 · 박승택* · 이갑상*
원광대학교 생명자원과학부, *원광대학교 해부학교실

Purification of α -Amylase Inhibitor from White Kidney Bean(*Phaseolus vulgaris*)

Seung-Ho Chun, Il-Hwan Ryu, Seung-Taeck Park* and Kap-Sang Lee*

College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University
*Department of Anatomy School of Medicine, Wonkwang University

White kidney bean, *Phaseolus vulgaris*, contains proteinaceous inhibitors of α -amylase. Two inhibitors have been purified by conventional protein fractionation methods such as ethanol precipitation, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel chromatography. The inhibitors were purified as I-1 and I-2 based on their elution order from the DEAE-Sephadex column. The overall purification ratio were about 15.0 and 14.8 for I-1 and I-2, respectively. The molecular weights of purified α -amylase inhibitors were 50,000 and 45,000 determined by Sephadex G-100 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. They contain 17.6~17% of carbohydrate, 70~80% of protein. The carbohydrates were composed of glucose : xylose : mannose : N-acetylglucosamine (5 : 3 : 50 : 42).

Key words : white kidney bean, α -amylase inhibitor, purification

서 론

α -Amylase 저해제는 2가지 타입으로 구분된다. 그중 하나는 주로 미생물에 의해 생산되는 아미노당, 올리고당, 당쇄 타이드이며, 주로 glucosidase에 대하여 특이적으로 작용하며 다른 하나는 각종 식물에 존재하는 당단백질로 주로 동물 α -amylase에 대해 특이적으로 작용한다⁽¹⁾.

α -Amylase(1-4)- α -D-glucan-4-glucanohydrolase(EC 3.2.1.1) 저해제는 Chrzaszcz와 Janicki⁽²⁾에 의해 최초로 보고된 이래 다양한 식물종에서 α -amylase 저해제가 발견되었다. 그중 밑에 존재하는 α -amylase 저해제는 Kneen 등⁽³⁾, Shainkin 등⁽⁴⁾, Silano 등⁽⁵⁾, Petrucci 등⁽⁶⁾, O'donnell 등⁽⁷⁾, Granum 등⁽⁸⁾ 수많은 연구자에 의해 보고되었다. 한편 Kneen 등⁽⁹⁾은 barley, corn, oats, millet, rice 등에는 α -amylase 저해제가 존재하지 않는다고 보고하였으나, Elliott 등⁽¹⁰⁾은 oats의 씨앗 껍질에서 *Bacillus subtilis*와 barley amylase 모두를 정량적으로 저해하는 proteinaceous 물질을 발견하였다고 보고하였으며, Blanco 등⁽¹¹⁾도 corn에 존재하는 α -amylase 저해제는 돼지 췌장, 인

간의 타액과 곰팡이 α -amylase에는 활성을 나타내지 않으나 곤충, 세균과 corn의 α -amylase에는 저해활성을 보였다고 보고하였다.

또한 Kneen⁽³⁾, Srrumyer⁽¹²⁾, Marshall⁽¹³⁾, Granum 등⁽⁸⁾에 의해 호밀에서 α -amylase 저해제가 존재함이 보고되었고, Srankovic 등⁽¹⁴⁾은 도토리(acorn), Hemberg 등⁽¹⁵⁾은 potato tuber, Rao⁽¹⁶⁾는 colocasia에 존재하는 α 및 β -amylase 저해제를 보고하였다. Miller 등⁽¹⁷⁾은 사탕수수로부터 α 및 β -amylase를 저해하는 페놀성물질을 최초로 보고하였으며 Shivaraj 등⁽¹⁸⁾은 α -amylase 및 trypsin을 효과적으로 저해하는 proteinaceous 저해제를 왕바랭이(ragi)로부터 분리하였다.

또한 α -amylase 저해제의 생리학적 역할은 정확하게 규명되지는 않았으나 α -amylase 저해제는 인체 영양 및⁽¹⁹⁾ 곤충과 잡초의 방제⁽²⁰⁾에 중요한 역할을 한다.

한편 자양, 해열, 이뇨 및 부종의 소거에 효능이 있는 것으로 알려진 *Phaseolus vulgaris*는 1년생 콩과 식물의 씨앗은 glucoprotein을 함유하고 있으며 mannose, glucosamin, arabinose, xylose 등으로 이루어진 당질부분과 다량의 방향족 아미노산과 소량의 cysteine을 갖고 있는 단백질 부분으로 구성되어 있다. 또한 trypsin 억제물질을 포함하고 있고 인간의 적혈구에 강한 활성을 갖고 있는 적혈구 응집소(PHA)를 갖고 있는 것으로 알려져 있는 콩과 식물의 씨앗이다.

따라서 본 연구는 국내산 *Phaseolus vulgaris*를 사용하여

Corresponding author : Kap-Sang Lee, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
Tel : 82-63-850-6675
Fax : 82-63-850-6675
E-mail : IKS6675@hanmail.net

α -amylase에 대해 저해효능을 갖는 물질을 분리·동정하였다.

재료 및 방법

재료

*Phaseolus vulgaris*는 경동시장에서 구입하여 이물질 제거하고 사용하였으며, 모든 gel filtration과 ion-exchange resin은 Pharmacia Fine Chemical사에서, electrophoresis reagent는 Bio-Rad사 제품을 사용하였으며, gel filtration column이나 polyacrylamide gel을 이용한 분자량측정에 사용된 단백질 및 3,5-dinitrosalicylic acid와 schiff's reagent는 Sigma Chemical사 제품을 사용하였다.

α -Amylase 활성 및 저해활성 측정

α -Amylase 활성 측정 : Standard buffer는 0.05 M NaCl과 0.001 M CaCl_2 를 포함한 pH 6.9의 0.05 M potassium phosphate buffer를 사용하였다. α -Amylase 활성 측정은 Bernfeld⁽²¹⁾의 방법에 준하여 측정하였다.

1% starch 용액 0.5 mL를 0.05 M potassium phosphate buffer에 용해시킨 porcine pancreatic α -amylase(3 units) 0.5 mL에 첨가하고 30°C, 30분간 반응시킨 후 dinitrosalicylic acid reagent(DNS) 1 mL를 첨가하고 끓는 수조에서 10분간 가열하여 반응을 중지시킨 후 top water로 냉각하고 증류수 10 mL를 첨가하여 희석시켰다. 이 반응액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였으며, 효소를 첨가하지 않고 동일 반응을 진행시킨 것을 blank로 사용하였다. α -Amylase 1 unit는 위 반응조건하에서 5분동안 1 μ mol의 maltose를 생산하는 효소의 양으로 하였다.

α -Amylase 저해제의 활성 측정 : α -Amylase 저해제의 활성은 α -amylase 저해제와 0.05 M NaCl과 0.001 M CaCl_2 를 포함한 pH 6.9의 0.05 M potassium phosphate buffer에 용해시킨 porcine pancreatic α -amylase(3 units) 0.5 mL에 첨가하고 30°C, 30분간 preincubation 시켰다. Preincubation 시킨 용액에 1% starch 용액 0.5 mL를 첨가하고 30°C, 30분간 반응시킨 후 DNS 1 mL를 첨가하고 끓는 수조에서 10분간 가열하여 반응을 중지시킨 후 top water로 냉각하고 증류수 10 mL를 첨가하여 희석시켰다. 이 반응액을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대 저해활성은 다음식에 의하여 계산하였으며, α -amylase 저해제 활성의 1 unit는 반응 조건하에서 α -amylase의 활성을 1% 저해하는 저해제의 양으로 하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \frac{[A(\text{inhibition}) - A(\text{control})]}{[A(\text{enzyme}) - A(\text{blank})]} \times 100$$

α -Amylase 저해제의 추출 및 정제

경동시장에서 구입한 *Phaseolus vulgaris* 3 kg을 깨끗한 물로 세척하고 2배량의 물에서 1일간 침적시킨 후 homogenizer를 이용하여 100 rpm에서 1분간 분쇄하였다. 4°C 냉장고에서 2시간 방치하여 발생한 기포를 제거하고, 8,000×g, 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 상등액을 crude inhibitor 용액으로 사용하였다. Crude inhibitor 용액 100 mL에 ethanol을 10~90% 포화도까지 단계적으로 높히면서 완전

히 혼합하여 4°C에서 12시간 침전시켜 8,000×g, 20분간 원심분리 하였다.

Ethanol 포화도 70~80%로 침전시켜 얻은 침전물을 0.05 M K-Na phosphate buffer(pH 6.5)에 용해시키고 ammonium sulfate를 20~80% 포화도까지 단계적으로 높히면서 완전히 용해시킨 후 4°C에서 12시간 침전시킨 후 8,000×g, 20분간 원심분리하여 활성 분획을 모으고 DEAE-Sephadex column chromatography를 행하였다. Ammonium sulfate 재침전에서 얻은 용액을 column에 흡착시킨 후 0.05 M K-Na phosphate buffer(pH 6.5)와 NaCl 용액을 사용하여 0~0.4 M까지 gradient로 18 mL/hr의 유속으로 용출하였고 tube당 3 mL씩 분획하여 단백질 농도와 α -amylase 저해활성을 측정하였다. 저해활성을 보인 분획을 모으고 각 분획을 Sephadex G-100 column(3.0×35 cm)에 충전시킨 후 0.05 M K-Na phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하여 18 mL/hr의 유속으로 용출하였고 tube당 3 mL씩 분획하여 단백질 농도와 α -amylase 저해활성을 측정 후 단백질 peak와 저해활성 peak가 일치하는 분획을 동결건조 후 다음 실험에 이용하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

일련의 과정을 통하여 정제된 α -amylase 저해제의 순수 정제를 확인하기 위하여 Davis법⁽²²⁾에 따라 polyacrylamide gel electrophoresis를 행하였다. Standard gel 7.5%를 만들어 20 mA로 16시간 동안 전기영동 시킨 후 coomassie blue 용액으로 염색시켰다. 탈색은 methanol, acetic acid, 증류수(2.5:1:6.5 v/v)를 혼합한 용액을 사용하여 행하였다.

분자량 측정

정제된 α -amylase 저해제의 분자량은 Andrews 등⁽²³⁾의 방법에 따라 gel filtration 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 측정하였다. Gel filtration은 0.05 M K-Na phosphate buffer(pH 6.5)로 평형시킨 후 Sephadex G-100을 column에 충전하여 표준 단백질과 정제 효소 단백질 용액을 column에 첨가한 후 동일 buffer로 18 mL/hr의 용출 속도에서 3 mL/tube씩 분획하였다. 표준 단백질로는 Lysozyme(M.W. 14,300), Egg albumin(M.W. 45,000), Bovine albumin monomer(M.W. 66,000), Bovine albumin dimer(M.W. 132,000)를 사용하였다. 정제효소의 분자량 결정은 표준 단백질 분자량 대수값과 void volume에 대한 용출 액량의 비(V_e/V_o)로서 표준 직선을 구하고 이 표준 직선에 의하여 효소의 분자량을 결정하였다. 또한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli⁽²⁴⁾의 방법에 따라 12.5% acrylamide gel을 조제하여 사용하였다. 표준 단백질로는 hemoglobin, cross-linked bovine (M.W. 200,000~14,400)을 사용하였으며 0.01 M Tris-glycine 완충용액에서 20 mA로 16시간 동안 전기영동시킨 후 coomassie blue 용액으로 염색시켰다. 탈색은 methanol, acetic acid 및 증류수(2.5:1:6.5 v/v)의 혼합 용액을 사용하여 행하였다. 분자량 측정은 표준 단백질과 정제효소의 상대 이동도를 측정하여 분자량을 구하였다.

단백질의 정량

분광광도계를 사용하여 Lowry 등⁽²⁵⁾의 방법에 따라 bovine

serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 표준단백질로 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 저해제의 단백질 양을 구하였다.

탄수화물의 정량

α -Amylase 저해제에 함유된 탄수화물 함량을 phenol sulfuric acid법⁽²⁶⁾으로 비색 정량하였다. 시험관에 시료 1 mL에 5% phenol 용액 1 mL와 진한황산 5 mL를 가한 후 교반하였다. 반응물을 30분간 실온에서 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 직선으로부터 탄수화물의 양을 구하였다.

구성당의 확인

정제 α -amylase 저해제 2 mg에 2 M TFA(trifluoro acetic acid) 1 mL를 첨가하고 120°C에서 60분 동안 가수분해한 후 가수분해물을 alditol acetate 유도체로 합성하고 TLC(thin layer chromatography) 분석을 행하여 구성당의 종류를 정성 분석하였으며 ethylacetate : pyridine : H₂O(2 : 2 : 1, v/v)를 전개 용매로 사용하였다⁽²⁷⁾. 또한 구성당의 정량분석은 Clamp 등⁽²⁸⁾의 방법에 준하여 Gas chromatography를 행하였다. 이때 Hewlett-Packard model 5880A series gas chromatography를 사용하여 30 m SE-54 glass capillary column을 사용하였다. Port temperature는 300°C였으며, column temperature는 150°C에서 분당 2°C 상승하도록 프로그램하였으며 표준 탄수화물은 fructose, glucose, galactose, mannose, N-acetylglucosamine과 xylose를 사용하였다.

결과 및 고찰

Ethanol 침전 및 ammonium sulfate 재침전

Phaseolus vulgaris 3 kg을 분쇄하고 원심분리하여 얻어진 상등액으로부터 ethanol의 포화도를 단계적으로 높이면서 침전시켜 분리한 결과는 ethanol 70% 및 80% 포화도에서 비활성도가 23.89 units/mg protein 및 21.63 units/mg protein으로 높았으며 60% 이하의 포화도 및 90%의 포화도에서는 단백질의 침전량은 많았으나 비활성도가 낮고 침전물이 용해되지 않았다. 한편 70% 및 80% 포화도에서 침전된 단백질을 활성분획으로 하여 ammonium sulfate 재침전을 행한 결과 60% 포화도에서 비활성은 50.18 units/mg protein으로 가장 높았으며 이때의 정제도는 3.24배 증가를 나타내었다(Table 1).

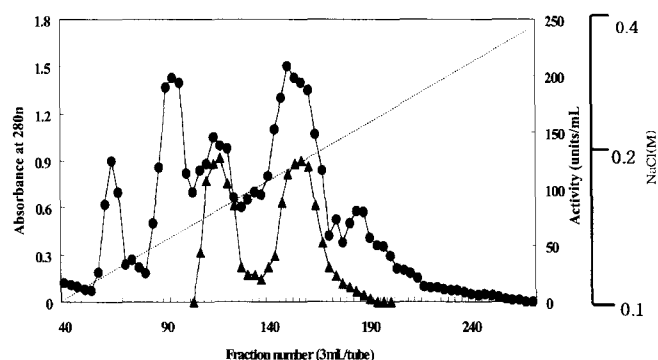


Fig. 1. Elution profile of α -amylase inhibitor on the DEAE-Sephadex ion exchange chromatography

Symbols: -▲-; activity, -●-; absorbance, -...-; NaCl

DEAE-Sephadex ion exchange chromatography

Ammonium sulfate로 재침전하여 분획한 활성부분의 저해제 용액을 0.05 M K-Na phosphate buffer(pH 6.5)로 평형시킨 DEAE-Sephadex column(3.0×40 cm)에 흡착시킨 후 NaCl을 이용하여 0~0.4 M까지 gradient로 이온강도를 증가시키면서 용출하여 3 mL/tube씩 분획하였다.

Fraction number 109~133과 146~180에서 각각 활성을 나타내어 α -amylase 저해제는 적어도 2가지 형태 이상이 존재한다고 추정되었으며, 활성을 보인 fraction을 I-1과 I-2로 명명하였다(Fig. 1).

활성을 보인 I-1 fraction의 총 단백질량은 25.84 mg/L, 총 활성은 4498 unit/L, 비활성은 174.07 unit/mg protein이었고 정제도는 11.24배였다(Table 1). 또한 I-2 fraction의 총 단백질량은 46.66 mg/L, 총 활성은 6189.6 unit/L, 비활성은 132.65 unit/mg protein이었으며 정제도는 8.57배 증가하였다(Table 1).

Sephadex G-100 gel의 chromatography

DEAE-Sephadex ion exchange chromatography에서 활성을 보인 fraction들을 I-1과 I-2로 나누어 동일한 buffer로 평형시킨 Sephadex G-100 column(13.0×40 cm)에 각각 가해 동일한 buffer로 용출시켜 3 mL/tube씩 분획하였다. 그 결과 I-1-f는 Fig. 2에서와 같이 50~70 fraction에서 활성을 나타내었다.

분리된 I-1-f의 총 단백질량은 12.0 mg/L, 총 활성은 2784 unit/L, 비활성은 232 unit/mg이었으며 정제도는 14.99배 증가하였고 수율은 5.56%이었다(Table 1). 또한 I-2-f는 Fig. 3에

Table 1. Summary of purification in α -amylase inhibitor I-1-f and I-2-f

Purification step	Total activity (units/L)	Total protein (mg/L)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Crude inhibitor solution	5,000.00	3,230.00	15.48	100.00	1.00
7080% ethanol precipitation	21,600.00	743.53	29.09	43.20	1.88
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	13,968.16	278.35	50.18	27.94	3.24
DEAE-Sephadex chromatography					
I-1	4,498.00	25.84	174.07	8.99	11.24
I-2	6,189.60	46.66	132.65	12.37	8.57
Sephadex G-100 chromatography					
I-1-f	2,784.00	12.00	232.00	5.56	14.99
I-2-f	3,210.00	14.00	229.28	6.40	14.81

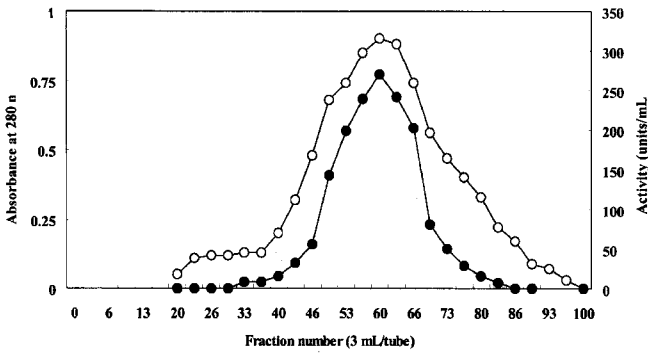


Fig. 2. Elution profile of α -amylase inhibitor I-1-f on the Sephadex G-100 gel chromatography
Symbols: - \circ -; absorbance, - \bullet -; activity

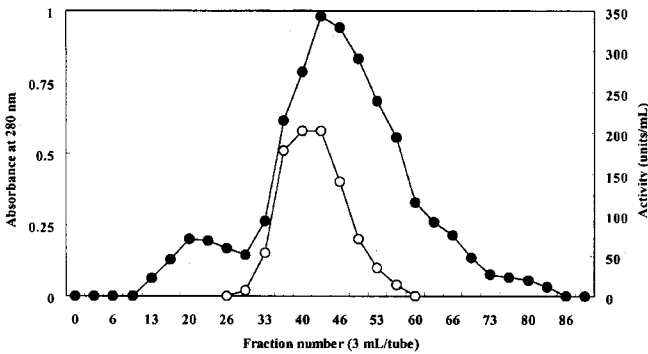


Fig. 3. Elution profile of α -amylase inhibitor I-2-f on the Sephadex G-100 gel chromatography
Symbols: - \circ -; activity, - \bullet -; absorbance

서와 같이 33-50 fraction에서 활성을 보였으며, 분리된 I-2-f의 총 단백질량은 14.0 mg/L, 총 활성은 3210 units/L, 비활성은 229.28 units/mg protein이었으며, 정제도는 14.81배 증가하였고 이때 수율은 6.4%이었다.

분자량 결정

정제 α -amylase 저해제의 분자량을 확인하기 위하여 gel filtration하고 용출 부피를 구한 후 분자량의 대수 값과 void volume에 대한 용출 부피의 비를 도시한 결과는 Fig. 4와 같으며 이로부터 구한 분자량은 I-1-f는 약 50,000, I-2-f는 약 45,000 정도로 추정되었다.

이 결과는 Jane 등⁽²⁹⁾이 보고한 black bean으로부터 분리한 두 가지 성분의 α -amylase 저해제의 49,000, 47,000과 유사하였으며, Power 등⁽³⁰⁾이 보고한 red bean의 α -amylase 저해제와 Marshall 등⁽³¹⁾이 보고한 white bean α -amylase 저해제의 분자량이 모두 49,000이라는 보고와도 매우 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 Andrew 등⁽²³⁾은 glycoprotein을 gel filtration에 의해 분자량을 결정할 때 탄수화물에 의해 실제 분자량보다 높은 수치를 나타낸다고 보고하였다.

또한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(Fig. 5)에 의한 분자량은 α -amylase I-1-f와 I-2-f의 분자량은 50,000과 45,000이었으며 이 결과는 gel filtration에 의한 결과와 동일하였으며 저해제 I-1-f와 I-2-f는 각각 1개의 subunit로 구성된 것으로 추정되었다.

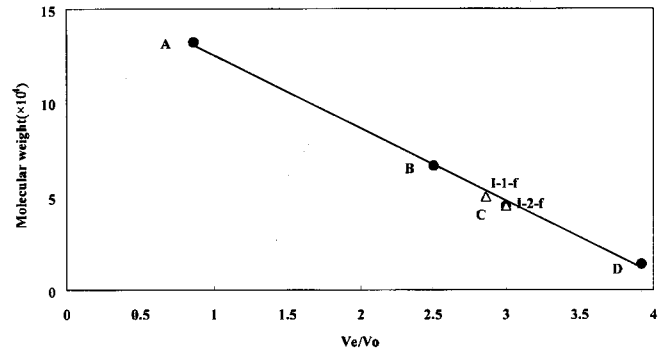


Fig. 4. Determination in molecular weight of the purified α -amylase inhibitor I-1-f and I-2-f by Sephadex G-100 gel filtration

- A : bovine serum albumin dimer(M.W. 132,000)
- B : bovine serum albumin monomer(M.W. 66,000)
- C : egg albumin (M.W. 45,000)
- D : lysozyme (M.W. 14,000)

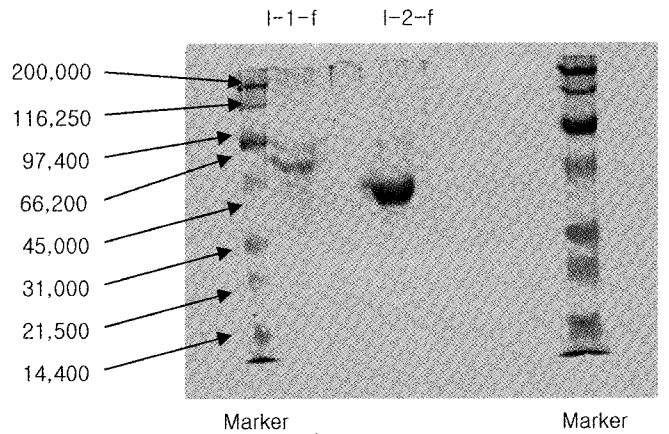


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified α -amylase inhibitor I-1-f and I-2-f

구성성분의 함량

정제 α -amylase 저해제 I-1-f와 I-2-f의 구성성분은 phenol sulfuric acid의 방법으로 탄수화물을, Lowry 등⁽²⁵⁾의 방법에 의해 단백질의 함량을 측정된 결과 각각 약 17.6~17%의 당과 79~80%의 단백질로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 가수분해한 구성당을 alditol 유도체로 전환시키고 ethylacetate : pyridine : H₂O(2 : 2 : 2, V/V)를 전개용매로 사용하여 TLC 분석을 행하여 정성 분석을 행한 결과 주로 mannose(R_f 0.50)와 N-acetylglucosamine(R_f 0.45), glucose(R_f 0.42), xylose (R_f 0.41)로 구성되어있음을 확인하였다. 또한 standard mono-

Table 2. Composition of α -amylase inhibitor I-1-f and I-2-f

Content	Content (%)	
	I-1-f	I-2-f
Total Sugar	17.6	17.0
Xylose	0.5	0.5
Glucose	1.0	1.0
Mannose	8.5	8.0
N-acetylglucosamine	7.6	7.5
Protein	79.0	80.0

saccharide와 저해제 I-1-f 및 I-2-f를 가수분해하여 monosaccharide를 만들고 이를 gas chromatography 분석을 행한 결과 glucose : xylose : mannose : N-acetylglucosamine의 함량이 5 : 3 : 50 : 42의 구성성분을 갖고 있음을 확인하였다.

이 결과는 Blanco 등⁽¹¹⁾이 보고한 tepary bean으로부터 분리한 2개의 α -amylase inhibitor의 구성당이 xylose, glucose, mannose, 2-acetamide-2-deoxyglucose 등으로 구성되어 있으며 이 2개 저해제의 구성당 함량이 거의 동일하다는 보고와 유사하였다.

요 약

*Phaseolus vulgaris*을 분쇄한 후 ethanol 70% 및 80% 포화도에서 침전을 행하고 그 침전물을 다시 ammonium sulfate로 재침전한 후, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography 및 Sephadex G-100 gel의 chromatography를 행하여 활성을 보인 fraction I-1-f와 I-2-f를 분획하였다. 그 결과 분리된 I-1-f의 총 단백질량은 12.0 mg/L, 총 활성은 2784 unit/L, 비활성은 232 unit/mg이었으며 정제도는 15.0배 증가하였고 수율은 5.56%이었다. 또한 I-2-f의 총 단백질량은 14.0 mg/L, 총 활성은 3210 units/L, 비활성은 229.28 units/mg protein이었으며, 정제도는 14.8배 증가하였으며 수율은 6.4%이었다. 또한 polyacrylamide gel electrophoresis를 행한 결과 단백질 band가 각각 하나로 확인되어 각각 단일 성분으로 판단되었다. 정제 α -amylase 저해제 I-1-f와 I-2-f의 분자량은 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행한 결과 50,000과 45,000이었다. 또한 구성성분의 함량을 측정된 결과 각각 17.6~17%의 당과 79~80%의 단백질로 구성되어 있으며 당은 glucose : xylose : mannose : N-acetylglucosamine의 함량이 5 : 3 : 50 : 42의 구성성분을 갖고 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구된 결과로 학교 당국에 감사드립니다.

문 헌

- Sawao, M., Akira, G., Yoshihiro, M., Kunio, O. and Motoo, A. Isolation and identification of hog pancreatic α -amylase inhibitor producing *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem. 45: 2599-2609 (1981)
- Chrzaszcz, T. and Janicki, J. "Sisto-amylase" a natural inhibitor amylase. Chem. Abstr. 27: 3491-3505 (1933)
- Kneen, E. and Sandstedt, R.M. An amylase inhibitor from certain cereals. J. Am. Chem. Soc. 65: 1247-1258 (1943)
- Shainkin, R. and Birk, Y. Isolation and characterization of α -amylase inhibitors from wheat. Biochim. Biophys. Acta 221: 502-513 (1970)
- Silano, V., Pocchiari, F. and Kasarda, D.D. Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. Biochim. Biophys. Acta 317: 139-148 (1973)
- Petrucci, T., Tomasi, M., Cantagalli, P. and Silano, V. Comparison of wheat albumin inhibitors of α -amylase and trypsin. Phytochem. 13: 2487-2495 (1974)
- O'donnell, M.D. and McGeeney, K.F. Purification and properties of an α -amylase inhibitor from wheat. Biochim. Biophys. Acta. 422: 159-169 (1976)
- Granum, P.E. and Whitaker, J.R. Purification and characterization of α -amylase inhibitors in wheat(*Triticum aestivum* var. Anza.). J. Food Biochem. 1: 385-401 (1977)
- Kneen, E. and Sandstedt, R.M. Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereals. Archys. 9: 235-249 (1946)
- Elliott, B.B. and Leopold, A.C. An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds. Physiologia Plantarum 6: 65-78 (1953)
- Blanco, L.A. and Iturbe, C.F.A. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize(zea maize). J. Food Biochem. 5: 1-14 (1981)
- Srumyer, D.H. Amodified for use in amylase assays. Anal. Biochem. 19: 61-72 (1967)
- Marshall, J.J. α -Amylase inhibitor from plants. Am. Chem. Soc. Symposium Serise 15: 244-256 (1975)
- Srankovic, S.C. and Markovic, N.D. A study of amylase inhibitors in the acorn. Glasnik Hem Drustua, Beograd 25-26, 519-525. Chem. Abstr. 59: 3084d (1963)
- Hemberg, T. and Larsson, I. The inhibitor beta complex from resting potato tubers as an inhibitor of α -amylase. Plant Physiol. 14: 861-873 (1961)
- Rao, M.N., Shurpalekar, K.S. and Sundaravalli, O.E. Purification and properties of an amylase inhibitor from colocasia(*Colocasia esculenta*) tuber. Ind. J. Biochem. 7: 241-253 (1970)
- Miller, B.S. and Kneen, E. The amylase inhibitor of *Leoti sorghum*. Archiv. Biochem. 15: 251-265 (1947)
- Shivaraj, B. and Pattabiraman, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Biochem. J. 193: 29-41 (1981)
- Jolo, F.M. and Filho, F.F. Characterization of the α -amylase inhibitor of black beans, variety Rico 23. J. Agric. Food Chem. 33: 132-144 (1985)
- Huesing, J.E., Shade, R.E., Chrispeels, M.J. and Murdock, L.L. α -Amylase inhibitor, not phytochemagglutinin, explain resistance of common bean seeds to cowpea weevil. Plant Physiol. 96: 993-1006 (1991)
- Bernfeld, P. Amylase α and β . In Method on Enzymology, Vol. 1(S.P. Colowick and N.O. Kaplan, ed.). Academic press, New York (1955)
- Davis, B.J. Disc-electrophoresis II method and application to human serum protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404-418 (1964)
- Andrews, P. The gel-filtration behavior of protein related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96: 595-609 (1965)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structure protein the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-692 (1970)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-276 (1951)
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350-361 (1956)
- Stahl, E. Thin layer Chromatography, Spin. Int., Berlin, 815 (1969)
- Clamp, J.R., Bhatti, J. and Chambers, R.E. The examination of carbohydrate in glycoprotein by gas-liquid chromatography. In glycoprotein, Vol 5, Part A, Elsevier Publishing Co., New York (1972)
- Jane, M.F. and John, H.R. Characterization of two α -amylase inhibitors from black bean. J. Food Sci. 50: 72-86 (1985)
- Power, J.R. and Whitaker, J.R. Purification and some physical properties and chemical properties of red kidney bean α -amylase inhibitor. J. Food Biochem. 1: 217-228 (1977)
- Marshall, J.J. α -Amylase inhibitors from plants. Am. Chem. Soc. Symposium Series 15: 244-259 (1975)

(2000년 9월 7일 접수)