

강낭콩의 열처리 및 발효에 의한 렉틴의 활성변화

유수연 · 임지영 · 박양호* · 서경범* · 박원봉[†]

서울여자대학교 자연과학부
*예일 비알엠

Changes of Lectin Activity of Kidney Beans by Heating and Fermentation

Su-Yun Lyu, Jee-Young Rhim, Yang-Ho Park*, Kyung-Bum Sub* and Won-Bong Park[†]

College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

*Yeil BRM Co., Ltd., Seoul 135-010, Korea

Abstract

Synthesis of new active protein was investigated by heat-treatment and fermentation of kidney beans with *Bacillus subtilis* ATCC 51189. The amount of water-soluble protein in raw kidney bean (raw protein, RP) was greatly reduced by heating (heated protein, HP) and several new amino acids were synthesized by fermentation. The molecular weights of proteins determined by SDS-PAGE were 118 kDa for RP and a new band of 18.0 kDa for protein (fermented protein, FP) in kidney beans heated and fermented with *B. subtilis* ATCC 51189. Hemagglutinating activities of RP, HP and FP were 128 HU, 4 HU and 32 HU respectively. Both of RP and FP showed anticancer activity against stomach cancer cell line (SNU-1) at 50 µg/mL and lymphocyte stimulating activity at 1 µg/mL, and stimulated PBMC to secrete IFN-γ and IL-12. However, HP did not show any kinds of activities. Taken together, these results suggested that lectin in kidney beans was destroyed by heating, but new active lectin-like protein was derived by fermentation with *B. subtilis* ATCC 51189.

Key words: kidney bean, lectin, fermentation, anticancer, cytokine, *Bacillus subtilis* ATCC 51189

서 론

자연계에 널리 존재하는 렉틴은 단백질 또는 당단백질(glycoprotein)로 구성되어 있는데, 2~6개의 당결합 부위를 가지며 2개(MW = 60 kD) 혹은 4개(MW = 120 kD)의 subunit로 이루어져 있으며, 세포막 표면에 있는 특이한 당수용체(carbohydrate receptor)와 높은 친화력을 가지고 결합한다(1, 3). 또한, 렉틴은 사람의 혈액에 대한 특이성, 휴지기의 림프구를 자극 분열효과(mitogenic activity), 종양세포의 선택적 응집 능력 등을 갖고 있다. 즉, T세포나 B세포를 자극하여 면역을 상승시키며, 암세포 표면의 당에 특이적으로 결합하여 암세포를 파괴시키는데 이들 기능은 렉틴-당의 상호작용으로 인한 것으로 알려져 있다(2).

항암제에 의한 항암효과는 직접적인 암세포의 살해 및 면역활성화 등의 복합작용에 의하여 효과를 발휘하며, 면역활성화에 의한 항암활성은 면역세포의 활성화 및 cytokine 분비촉진작용에 의하여 발휘된다(4). IL-12는 T세포나 자연살해세포에 의하여 INF-γ를 생성하게 하는 강력한 유도체이다. 또한, IL-12는 자연살해세포를 활성화하며, INF-γ가 생성하는 T_H1 세포의 분화를 증가시켜 특이성 면역을 촉진한

다. 그리고, INF-γ는 대식세포를 활성화하며, IL-12의 양을 증가시키고, T_H1-type 반응의 유지를 촉진한다. 따라서, IL-12와 INF-γ는 virus 등 세포 내 감염과 종양세포에 대한 숙주의 방어에 매우 중요하다(4).

강낭콩(*Phaseolus vulgaris*, kidney bean) lectin은 phytohemagglutinin(PHA)으로, 분자량 30,000의 E-type의 혈구응집(erythroagglutinating) subunit와 L-type의 림프구 증식(mitogenic) subunit로 구성된 분자량 118 kDa의 tetramer이다(5). 이들 subunit가 각각 다른 형태의 비공유결합의 tetramer로 결합되어 5종류의 PHA isolectin을 구성하고 있다. 각 subunit들은 세포표면 수용체에 대하여 매우 다른 특이성을 갖고 있기 때문에 각각의 조합은 각각 다른 기능을 갖고 있는 것으로 여겨지고 있다. 그리고, 이들 중 약 7~10%는 L-subunit를 전혀 갖고 있지 않으며, 따라서 자극분열효과도 보여주지 않는 것으로 알려져 있다. 또한, 강낭콩의 종류에 따라 E, L subunit 양쪽 모두를 갖고 있거나, E subunit만을 갖고 있거나, 양쪽 모두 갖고 있지 않는 등 다양한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(5). 따라서 복합적인 올리고당에 의하여 저해되는 PHA는 적혈구의 강력한 응집원(aggutinin)인 동시에 mitogen이며, 암세포 증식억제효과 및 면역

[†]Corresponding author. E-mail: wbpark@swu.ac.kr
Phone: 82-2-970-5655. Fax: 82-2-975-3159

활성화효과가 있다고 보고되고 있다(6-12).

동물이 PHA를 함유한 생강낭콩을 섭취 시, 설사, 영양분의 흡수저해작용, 체중감소, 성장억제 등 동물에게 농도 의존적인 독성이 있는 것으로 알려져 있다(13-16). PHA가 어떻게 독성을 나타내는지 아직 잘 알려지지 않았지만 PHA를 섭취하면 식이 단백질을 제대로 사용할 수 없는 동시에 조직의 이화작용을 촉진하는 것으로 추측되고 있다(16). 따라서 조직 단백질의 파괴 및 식이 단백질의 이용의 저하로 인하여 신체의 전체적인 단백질의 상실을 초래하며, 결과적으로 음의(negative) 질소 균형상태에 있게 된다고 보고 있다. 또한, 소화액의 분비를 심각하게 억제하여 소화기관의 전반적인 음식물의 성분의 소화 및 흡수를 방해하며, 동물의 대사, 성장, 건강 등의 심각한 전신적인 결과를 초래한다고 보고되고 있다(17). 실제로 PHA를 투여한 그룹은 대조군보다 체중 및 생존기간이 절반이하 수준으로 떨어진 반면, 열처리한 PHA를 투여한 그룹은 대조군과 유사한 결과를 나타내는 것으로 보아, PHA는 열처리에 의하여 독성은 사라지고, 동물에게 단백질원을 제공하여 성장 및 생존에 도움이 되는 것으로 추측되고 있다(13). 따라서 강낭콩은 충분히 가열하여 섭취하는 것이 원칙이나, 이 과정에서 당단백질인 PHA는 파괴되고, lectin활성도 사라진다.

최근, 일본의 전통발효식품인 natto와 마찬가지로 우리나라의 전통식품인 청국장 등의 기능성에 대한 연구도 활발히 진행되고 있으며, 항암, 면역활성, 혈전용해 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(18). 청국장은 삶은 콩에 벗겨낸 콩을 이용하여 재래식으로 발효시키거나 *Bacillus subtilis*를 이용하여 단시간 발효시켜 제조한다. 그람양성의 아포형성 호기성 균인 *B. subtilis*는 콩을 발효시켜 필수아미노산, 비타민B₁, B₂, 나이아신, 판토텐산 등을 생성시키며, 각종 효소작용으로 콩 성분이 분해되어 소화 흡수율을 상승시킨다. 또한, *B. subtilis*는 발효과정에서 기능성 peptide 등 새로운 미생물유래 생리활성물질을 생성하는 것으로 기대되고 있다(19). 본 실험에서는 강낭콩을 열처리하여 PHA를 불활성화시킨 후 이를 *B. subtilis* ATCC 51189로 발효시켜 새로운 lectin의 생성 여부를 확인하고 생성된 lectin의 항암, 면역 등의 활성을 검색하였다.

재료 및 방법

강낭콩의 발효

한국미생물보존센터에서 분양받은 *B. subtilis* ATCC 51189를 nutrient agar medium(3 g/L bacto beef extract, 5 g/L bacto peptone, 15 g/L bacto agar)을 사용하여 3회 계대 배양하였다. 균을 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 48시간 증식시킨 배양액을 증자한 강낭콩(경동시장에서 구입한 국내산 붉은 강낭콩)에 6% 접종하여 37°C에서 3일간 배양시키고, 40°C 열풍건조기에서 48시간 건조시킨 후 분쇄하였다. 생

강낭콩 및 가압멸균기에서 1시간동안 가열처리한 강낭콩도 각각 동일하게 건조시킨 후 분쇄하였다.

단백질 분리 및 정량

시료분말 10 g에 인산완충용액(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) 100 mL를 가하여 30°C에서 6시간씩 3회 추출하여 원심분리(16,000×g)한 상등액을 취하였다. 100% 포화 황산암모늄으로 단백질을 침전시키고 원심분리하여 얻어진 침전물을 소량의 인산완충액에 용해시켜 4°C에서 48시간동안 동일한 완충용액으로 투석한 후, 원심분리하여 불용성 물질은 제거하고 여액을 한외여과막(Amicon YM10; molecular weight cut off 10,000)으로 농축하여 시료의 총량이 동량(10 mL)이 되도록 조절하였다. 시료 중의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin) 용액을 표준용액으로 하고, BCA (bicinchoninic acid, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아미노산 조성

단백질 시료 2 mL에 6 N HCl 0.1 mL를 가하여 98°C에서 8시간 가수분해시킨 다음, membrane filter(0.2 μm)로 여과하여 침전물은 제거하고 80°C에서 15시간 동안 건조시킨 후 1 mL의 완충용액에 가하여 용해시켰다. 아미노산 자동분석기(Beckmann 6300 system, GMI, Clearwater, Minn., USA)에 주입하여 분석하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

Separating gel 12.5%, stacking gel 8%로 하였으며, stacking gel에서는 50 V, separating gel에서는 100 V로 각각 전 개시켰다. Gel을 0.125% Coomassie blue 용액으로 염색 후, 탈색하여 molecular weight size marker에 의해 분자량을 확인하였다.

렉틴 활성

사람의 혈액을 10배의 0.15 M NaCl 용액으로 부유시킨 후 원심 분리한 침사 혈구는 다시 0.15 M NaCl 용액으로 세척 후 3% 적혈구 부유액을 얻었다. Microtiter well plate에 0.15 M NaCl 용액 50 μL를 넣고 단백질 시료 50 μL를 첨가하여 2배수로 단계적 희석한 후, 3% 적혈구 부유액 50 μL를 첨가하여 37°C 배양기에서 1시간 배양시킨 다음, 대조 표준과 비교하여 응집유무를 확인하였다. 적혈구 응집효과를 나타내는 lectin의 희석배수를 hemagglutinating unit(HU)로 나타냈다.

세포배양 및 항암활성 측정

한국세포주은행에서 구입한 SNU-1(stomach carcinoma, human, KCLB 00001)을 사용하여 항암활성을 측정하였다. 동물세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100 units/mL penicillin/streptomycin(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 RPMI 1640(Flow Laboratories, Irvine, UK)배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 세포와 trypan blue 용액 (trypan blue, 0.8%(w/v) NaCl, 0.06%(w/v) methyl-p-

hydroxy benzoate, pH 7.2, Sigma)을 혼합하여 hematocytometer에 취한 후 위상차 현미경(Olympus IM)을 이용하여 세포 수를 측정하였다. 항암활성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid(MTT, Sigma) assay를 이용하여 측정하였다. 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 180 μ L 분주하고 일정농도로 제조한 멸균시료를 20 μ L 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 72시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ L를 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고, 생성된 formazan crystal을 각 well 당 DMSO 150 μ L를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 성장을 대조구에 비하여 50% 억제하는 시료의 농도를 IC₅₀로 나타내었다. 대조구는 시료 대신 증류수를 첨가한 것으로 하였으며, 실험을 3회 반복하여 평균값을 산출하였다.

림프구 증식효과 및 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbant assay)

Ficoll-Hypaque(Pharmacia, Upsalla, Sweden)에 의하여 건강한 사람 혈액으로부터 분리한 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 gentamicin(40 μ g/mL) 및 10% FBS를 첨가한 RPMI 배지에 부유시켰다. PBMC(2.5×10^5 /well)를 microculture flat-bottom plate(Costar, Cambridge, MA, USA)에 넣고 시료를 처리한 후 5% CO₂, 37°C에서 72시간 배양하였다. 림프구 증식효과는 세포독성 측정과 동일한 방법으로 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Cytokine 측정은 IL-12 p40 및 IFN- γ 분석용 ELISA kit(Endogene, Cambridge, MA, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. Cytokine standard 및 세포를 제거한 배양액을 96 well(precoated with monoclonal antibody specific for IL-12 p40)에 100 μ L씩 넣은 후, biotinylated secondary antibody 50 μ L를 각 well에 가하였다. 실온에서 1시간동안 배양 후 세척용 완충액으로 3회 세척한 후, 각 well에 streptoavidin-HRP 100 μ L씩 넣고, 실온에서 30분간 배양하였다. 다시 3회 세척 후 발색시약(TMB) 100 μ L를 넣고, 20분간 발색시키고, H₂SO₄로 반응을 중지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험결과로부터 얻은 data를 SAS program을 이용하여 분산분석 및 Duncan 다범위 검증(Duncan's multiple range test)을 실시하였다(20).

결과 및 고찰

열처리 및 발효에 의한 강낭콩 단백질의 변화

동물이 강낭콩 lectin인 PHA를 함유한 생강낭콩을 섭취시, 설사, 영양분의 흡수저해작용, 체중감소, 성장억제 등 동

물에게 농도 의존적인 독성이 있기 때문에(13-16) 강낭콩은 충분히 가열하여 섭취하는 것이 원칙이나, 이 과정에서 당단백질인 PHA는 파괴되고, lectin활성도 사라진다. 콩을 발효시켜 펩수아미노산, 비타민B₁, B₂ 등을 생성하는 *B. subtilis*는 발효과정에서 단백질 가수분해효소에 의해서 기능성 peptide 등 새로운 생리활성물질을 생성하는 것으로 알려져 있다(19). 본 실험에서는 강낭콩을 열처리하여 PHA를 불활성화시킨 후 발효시켜 새로운 lectin의 생성여부를 확인하기 위하여 우선, 열처리 및 발효에 의한 강낭콩의 수용성 단백질의 함량을 확인하였다. 수용성 단백질을 황산암모늄으로 농축시킨 후 BCA시약을 이용하여 단백질의 양을 측정된 결과, 열처리에 의하여 강낭콩의 수용성 단백질 함량이 대폭 감소하였으며, 발효시킨 시료는 열처리만 한 시료와 큰 차이가 없는 것으로 보아, 발효과정은 수용성 단백질의 양을 크게 변화시키지 않는 것으로 나타났다(Table 1). 본 연구에서는 생강낭콩으로부터 분리한 단백질을 RP(raw protein), 열처리한 강낭콩으로부터 분리한 단백질을 HP(heated protein) 그리고 열처리하여 발효시킨 강낭콩을 FP(fermented protein)으로 각각 표시하였다.

각 시료의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. RP 및 HP에는 serine이 전혀 함유되어 있지 않았으나, FP에는 4.26%의 serine이 함유되어 있었으며, glycine과 alanine의 양도 증가하는 것으로 나타났다. 즉, RP 및 HP의 아미노산 조성은 큰 차이가 없었으나, FP의 아미노산의 조성은 유의한 차이를 보였다. 따라서 *B. subtilis*에 의한 발효과정에서

Table 1. Soluble protein content isolated from kidney bean

Kidney bean	Protein content (mg/g)
Raw	73.7
Heated	18.5
Heated & fermented	19.8

Water soluble protein was concentrated with saturated (NH₄)₂SO₄ solution and protein content was measured by BCA test.

Table 2. Percentage of amino acids in proteins isolated from raw, heated, and fermented kidney beans (unit: %, w/w)

Amino acids	Raw	Heated	Heated & fermented
Aspartic acid	-	-	0.09
Threonine	9.53	9.35	12.20
Serine	-	-	4.26
Glutamic acid	1.39	1.55	1.99
Proline	12.35	11.74	18.34
Glycine	5.55	5.71	7.80
Alanine	4.37	4.28	6.86
Valine	2.90	2.74	3.06
Methionine	0.41	0.35	0.71
Isoleucine	2.99	2.35	2.41
Leucine	4.98	5.87	6.53
Phenyl alanine	3.11	3.05	2.95
Histidine	2.28	2.11	2.24
Lysine	6.72	6.39	6.50
Arginine	3.65	3.26	3.77

새로운 아미노산 및 단백질이 생성된 것을 확인할 수 있었다.

SDS-PAGE에 의한 단백질 분자량 및 lectin 활성

PHA는 다양한 형태의 subunit가 5가지의 다른 형태의 비공유결합의 tetramer로 결합되어 있으며, 이들 isolectin은 E-type과 L-type의 subunit로 구성되어 있는데, 강낭콩의 종류에 따라 다양한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(5). Fig. 1은 황산암모늄으로 농축시킨 강낭콩 단백질을 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다. Lane 1은 RP의 pattern으로, 두 개의 subunit가 결합된 dimer에 해당하는 55.4 kDa의 진한 band와 30.0 kDa 부근에서 두 개의 약한 band가 보였다. 즉, 생강낭콩에서 분리한 단백질은 분자량 118 kDa의 PHA tetramer의 전형적인 pattern을 나타냈으며, E, L subunit 양쪽 모두를 갖고 있는 것으로 나타났다. 또한, PHA subunit band 외에 다른 band가 보이지 않는 것으로 보아 황산암모늄으로 침전시켜 얻은 수용성 단백질 분획의 대부분이 PHA인 것으로 나타났다. 그러나, 열처리한 강낭콩으로부터 분리한 단백질(HP)의 전기영동 pattern을 보면, RP에서 보였던 band는 사라지고, 저분자 단백질 혹은 peptide로 변화된 pattern을 보여주고 있으며(lane 2), 따라서 생강낭콩의 수용성 단백질은 열처리에 의하여 저분자 peptide로 변화된 것을 확인할 수 있었다. FP의 경우, RP 및 HP에서는 보이지 않았던 분자량 18.0 kDa의 진한 band가 보였다(lane 3). 따라서 발효과정에서 의하여 새로운 peptide 혹은 단백질이 생성된 것을 확인할 수 있었다.

적혈구 응집효과에 의하여 상기에서 분리된 단백질의 lectin 활성을 확인한 결과, RP(1 mg/mL)는 128 HU의 활성이 나타났으며, HP의 경우에는 4 HU의 활성이 나타난 것으로 보아 열처리에 의하여 PHA가 대부분 사라진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 동물이 PHA를 함유한 생강낭콩을 섭취

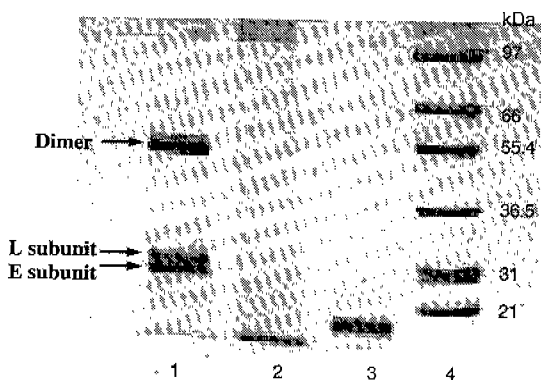


Fig. 1. SDS-polyacrylamide electrophoresis patterns of water-soluble proteins isolated from kidney beans. lane 1: protein from raw kidney beans (RP), lane 2: protein from heated kidney beans (HP), lane 3: protein from heated and fermented kidney beans (FP), lane 4: standard marker. Protein was concentrated with saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution.

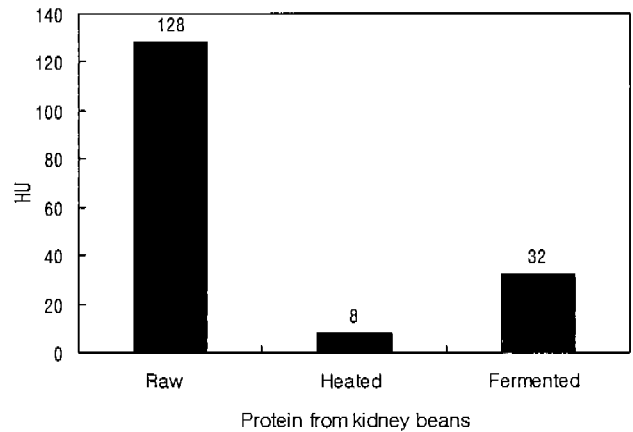


Fig. 2. Lectin activity of water-soluble proteins (1 mg/mL) isolated from kidney beans.

The definition of hemagglutination unit (HU) is the maximum number of a serial two-fold dilution of protein solution showing hemagglutinating activity.

시, 설사, 체중감소, 성장억제 등 동물에게 독성이 있는 것으로 알려져 있으나(13-16), 열처리에 의하여 당단백질인 PHA는 파괴되므로 조리 시 충분히 가열하면 그와 같은 부작용의 염려는 없을 것으로 판단되었다. 그리고, FP는 열처리 후 사라진 lectin 활성(32 HU)이 다시 나타나는 것으로 보아, *B. subtilis*에 의한 발효과정에서 새로운 peptide 혹은 lectin이 생성된 것으로 판단되었다.

항암 및 면역활성 확인

생리활성물질의 이용 가능성을 확인하기 위하여 단백질의 항암 및 면역활성을 확인하였다. 분리된 단백질의 위암세포(SNU-1)에 대한 세포독성효과는 각 well에 암세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 조정하여 MTT assay에 의하여 측정하였다. 그 결과, RP 및 FP는 위암세포에 대하여 유사한 항암활성이 있으나, 비교적 높은 농도($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$)에서 항암활성을 나타내는 것으로 보아 이들 물질의 직접적인 세포독성효과는 낮은 것으로 판단되었다(Fig. 3). 그리고, HP는 항암효과를 나타내지 않는 것으로 보아 가열과정에 의하여 항암활성물질이 파괴된 것을 확인할 수 있었다. 또한, FP의 lectin 활성(32 HU)이 RP의 lectin 활성(128 HU)보다 훨씬 낮은 것(Fig. 2)을 감안하면, 이들 활성물질은 서로 다른 것으로 추측된다. 따라서 열처리에 의하여 독성이 있는 생강낭콩의 PHA가 파괴된 후 발효시킨 강낭콩에 함유되어 있는 lectin은 생리활성물질로서의 기능이 있을 것으로 판단되었다.

림프구 증식효과는 세포독성 측정과 동일한 방법으로 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Fig. 4). HP는 증식효과가 없는 것으로 보아 열처리에 의하여 사라진 lectin활성(4 HU)과 관련이 있을 것으로 판단되며, RP 및 FP의 경우 세포독성효과를 나타내는 농도($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$)보다 훨씬 낮은 농도인 $1 \mu\text{g/mL}$ 에서 증식효과가 나타났다. 이와 같은 결과도 역시 lectin 활성의 결과와 일치하며, 특히 FP의 경우, RP보다 낮

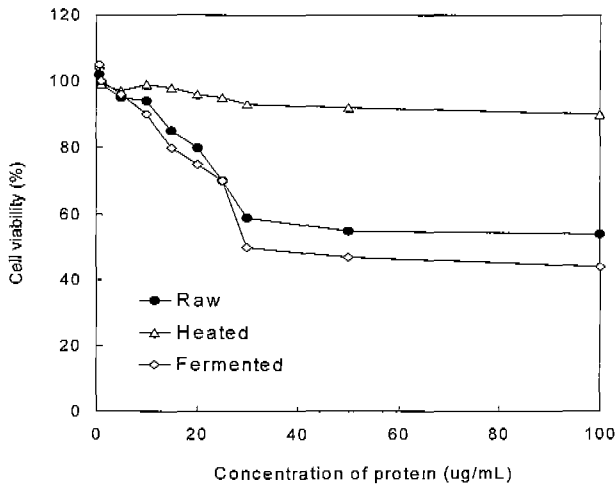


Fig. 3. Dose-dependent growth inhibition of SNU-1 stomach cancer cells by lectin proteins of kidney beans. Protein was concentrated with saturated (NH₄)₂SO₄ solution and the inhibition of cell growth was measured by MTT assay. Results are an average of three experiments.

은 lectin활성(32 HU)을 가지고 있음에도 불구하고, 유사한 활성을 나타내는 것으로 보아 새로운 활성물질인 것을 알 수 있었다.

면역활성화에 의한 항암활성은 면역세포의 활성화 및 cytokine 분비촉진작용에 의하여 발휘되는 것으로 알려져 있다(4). IL-12는 활성화된 대식세포나 수상세포에 의하여 만들어지며, T세포나 자연살해세포에 의하여 INF-γ를 생성하게 하는 강력한 유도체이다. 또한, INF-γ는 대식세포를 활성화하며, IL-12의 양을 증가시키고, T_H1-type 반응을 촉진하여 항암활성을 발휘한다. 따라서, IL-12 및 INF-γ는 종양 세포에 대한 숙주의 방어에 매우 중요하다(4). 본 실험에서는 강낭콩으로부터 분리된 단백질의 PBMC에 대한 IL-12 및 INF-γ의 분비촉진효과를 sandwich ELISA에 의하여 검색하였다(Fig. 5). RP 및 FP는 대조군에 비하여 INF-γ의 분비

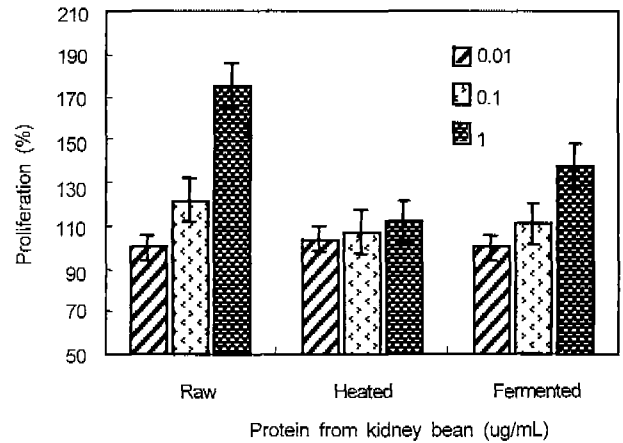


Fig. 4. Lymphocyte stimulating activity of lectin protein (ug/mL) isolated from kidney beans. PBMC was treated with protein concentrated with saturated (NH₄)₂SO₄ solution and the activity was measured by MTT assay. Control was treated with PBS buffer and results are an average of three experiments.

를 현저하게 촉진하는 것으로 나타났으며, 특히, 비교적 낮은 농도인 1.2 ug/mL의 농도의 FP는 RP에 비하여 더 많은 양의 INF-γ의 분비를 촉진시키는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 그리고 이들 물질의 의하여 PBMC가 분비하는 IL-12의 양은 INF-γ에 비하여 매우 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5B). HP의 경우 IL-12 및 INF-γ의 분비촉진은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 보아 강낭콩에 함유되어 있는 생리활성물질이 대부분 파괴된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 *B. subtilis* ATCC 51189에 의한 발효과정에서는 새로운 cytokine 분비물질이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과는 열처리에 의하여 생강낭콩의 PHA의 활성을 감소시킨 후 발효시킨 강낭콩에 함유되어 있는 lectin은 생리활성물질로서의 가능성이 있으므로 기능성식품의 이용 가능성을 제시해주고 있다.

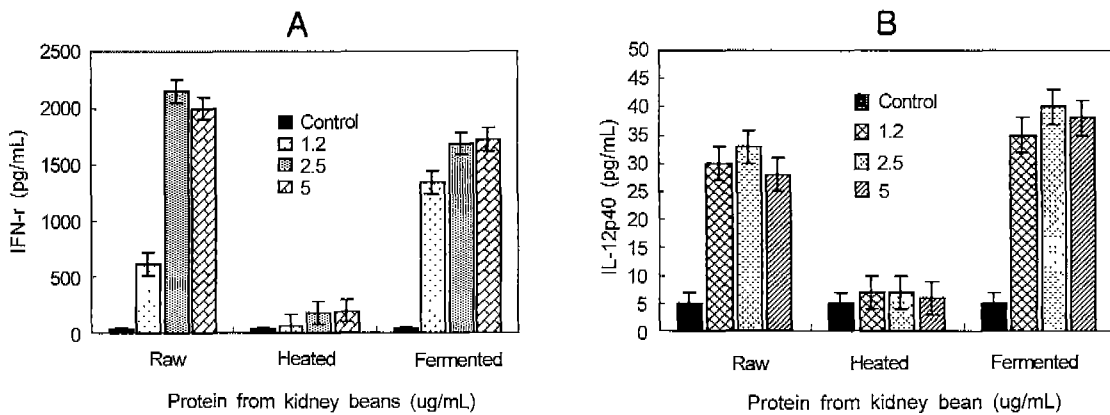


Fig. 5. Quantitative determination of IFN-γ (A) and IL-12 p40 (B) produced by PBMC treated with soluble protein in kidney beans. Protein was concentrated with saturated (NH₄)₂SO₄ solution and protein quantity was measured by ELISA. Control was treated with PBS buffer only and the results are an average of two experiments.

요 약

강낭콩을 가열한 후 *B. subtilis* ATCC 51189로 발효시켜 새로운 활성 단백질의 생성여부를 확인하였다. 생강낭콩의 수용성 단백질은 열처리에 의하여 감소하였으며, 발효과정에서 단백질의 양은 변화하지 않았으나, 새로운 아미노산이 합성되었다. 생강낭콩의 수용성 단백질(raw protein, RP)은 분자량 118 kDa의 PHA(phytohemagglutinin)의 전형적인 모습을 보였으나, 열처리한 단백질(heated protein, HP)의 경우, RP의 band는 사라지고, 저분자 peptide로 변화되었으며, 발효과정에 의하여 분자량 18.0 kDa의 새로운 단백질(fermented protein, FP)이 생성된 것을 확인하였다. 또한, RP는 128 HU, HP는 4 HU, FP는 32 HU의 적혈구응집효과를 보였으며, 위암세포(SNU-1)에 대하여 RP 및 FP는 비교적 높은 농도(IC₅₀=50 µg/mL)에서 항암활성을 보였다. 그리고, RP 및 FP의 경우 1 µg/mL에서 림프구 증식효과를 보였고, IFN- γ , IL-12의 분비를 촉진하였다. 그러나 HP는 항암효과, 림프구 증식효과, cytokine의 분비촉진효과를 보이지 않았다. 따라서, 강낭콩 lectin은 가열에 의하여 활성물질이 파괴되나, *B. subtilis*에 의한 발효과정에서 새로운 cytokine 분비촉진물질이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청과 서울특별시에서 지원하는 2000년 산·학·연 공동기술개발사업의 결과이며 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Stillmard, H. : Cell agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, **117**, 949-950 (1972)
2. Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. : Recent advances in the purification and characterization of plant lectins. In *COST 98: Effects of Antinutrients on the Nutritional value of Legume Diets*, Bardocz, S., Gelencser, E. and Pusztai, A. (eds.), European Commission, Brussels, Belgium, Vol. 1, p.1-7 (1998)
3. Goldstein, I.J. and Poretz, R.D. : Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, 1st ed., Liener, I.E., Saron, N. and Goldstein, I.J. (eds.), Academic Press, London, UK, p. 233-237 (1986)
4. Kovacs, E. : Serum levels of IL-12 and the production of IFN- γ , IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with *Viscum album* extract. *Biomed. Pharmacother.*, **54**, 305-310 (2000)
5. Pusztai, A. : Lectins and their specificity. In *Plant lectins*, Pusztai, A. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.3-31 (1991)
6. Pryme, I.F., Pusztai, A.J., Grant, G. and Bardocz, S. : Dietary phytohemagglutinin slows down the proliferation of a mouse plasmacytoma (MPC-11) tumor in Balb/c mice. *Cancer Lett.*, **103**, 151-155 (1996)
7. Pryme, I.F., Grant, G. and Bardocz, S. : Switching between control and phytohemagglutinin-containing diets affects growth of Krebs II ascites cells and produces differences in the levels of putrescine, spermidine and spermine. *Cancer Lett.*, **93**, 233-237 (1995)
8. Pryme, I.F., Pusztai, A.J., Grant, G. and Bardocz, S. : Dietary phytohemagglutinin slows down the proliferation of a mouse plasmacytoma (MPC-11) tumour in Balb/c mice. *Cancer Lett.*, **103**, 151-155 (1996)
9. Pryme, I.F., Pusztai, A.J., Bardocz, S. and Ewen, S.W. : The induction of gut hyperplasia by phytohaemagglutinin in the diet and limitation of tumour growth. *Histol. Histopathol.*, **13**, 575-583 (1998)
10. Pryme, I.F., Pusztai, A.J., Bardocz, S. and Ewen, S.W. : The growth of an established murine non-Hodgkin lymphoma tumour is limited by switching to a phytohaemagglutinin-containing diet. *Cancer Lett.*, **146**, 87-91 (1999)
11. Ogawara, M., Utsugi, M., Yamazaki, M. and Sone, S. : Induction of human monocyte mediated tumor cell killing by a plant lectin, wheat germ agglutinin. *Japn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 1107-1144 (1985)
12. Ogawara, M., Sone, S. and Ogura, T. : Human aveolar macrophages: Wheat germ agglutinin-dependent tumor cell killing. *Japn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 288-295 (1987)
13. Lafont, J., Rouanet, J.M., Gabrion J., Assouad, J.L., Zambonino, I.J.L. and Resancon, P. : Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat: An integrative assay. *Digestion*, **41**, 83-93 (1988)
14. Rodhouse, J.C., Haugh, C.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J. : Red kidney bean poisoning in the UK : an analysis of 50 suspected incidents between 1976 and 1989. *Epidemiol. Infect.*, **105**, 485-491 (1990)
15. Grant, G., Dorward, P.M., Buchan, W.C., Armour, J.C. and Pusztai, A. : Consumption of diets containing raw soya beans, kidney beans, cowpeas or lupin seeds by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. *Br. J. Nutr.*, **73**, 17-29 (1995)
16. Kordas, K., Burghardt, B., Kisfalvi, K., Bardocz, S., Pusztai, A. and Varga, G. : Diverse effects of phytohaemagglutinin on gastrointestinal secretion in rats. *J. Physiol. Paris*, **94**, 31-36 (2000)
17. Pusztai, A., Clarke, E.M.W., Grant, G. and King, T.P. : The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins: nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food and Agric.*, **32**, 1037-1046 (1981)
18. Lee, S.K., Heo, S., Bae, D.H. and Choi, K.H. : Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional *chungkookjang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 226-231 (1998)
19. Lim, S.I., Kim, H.K. and Yoo, J.Y. : Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean traditional *meju*. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **32**, 154-160 (2000)
20. SAS Institute : *SAS/STAT User Guide*. release 6.30 edition (1988)

(2001년 10월 20일 접수; 2001년 12월 14일 채택)