

Original Article

Identification and Characterization of Protease-Resistant Proteins from Adzuki Beans

Eun-Jung Song¹, Sun-Min Park², Qun Wang¹, and Jinkyu Lim^{1*}

¹School of Food Science & Biotechnology, Major in Life and Food Sciences, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Gyeongbuk Technopark, Pohang, Gyeongsangbuk-do, Korea

소화 효소 저항성을 지니는 팥 단백질의 성질 규명

송은정¹ · 박선민² · 왕 쿤¹ · 임진규^{1*}

¹경북대학교 응용생명과학부 생명식품공학전공, 경북대학교 식품공학부, ²경북 테크노파크, 포항, 경상북도

Received: September 15 2014 / Revised: September 26 2014 / Accepted: September 26 2014

Abstract It is already known that adzuki beans (*Vigna angularis*) are able to control appetite. Therefore, this study tested the proteins isolated from adzuki beans for their protease resistance and interaction with the intestinal mucosa. The major proteins from adzuki beans were found to be resistant to the digestive enzymes pepsin and pancreatin, and were identified using 2D-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. The major adzuki proteins were easily fractionated by treating the soluble protein extract with 10 mM CaCl₂, and were found to contain lactotransferrin, a homologous protein to the dynein light chain domain, proteinase inhibitor, and proteins with unknown functions. From a tissue binding assay using mouse intestinal tissue sections, the major protein fraction showed weak, yet significant and specific binding to the mucosa layer of the small intestine. Thus, the current results suggest that adzuki proteins are resistant to digestive enzymes, which enables them to survive protease digestion in the intestinal tract, plus they may interact with the intestinal mucosa layer.

Therefore, the molecules responsible for controlling appetite in adzuki beans are presumably protease-resistant proteins that interact with the intestinal mucosa or delay digestion in the digestive tract.

Keywords: adzuki bean, protease resistant protein, pepsin, pancreatin, tissue binding

서 론

팥은 떡고물, 양갱, 팥빙수용으로 많이 쓰이는 곡류로 잡곡 등 혼식용으로도 이용되고 있다. 팥에는 녹말 등의 탄수화물이 약 50% 함유되어 있으며, 그 밖에 단백질이 약 20% 함유되어 있다. 이 단백질 함량은 콩류 안에서는 중간 정도의 함량이고 이중 80%는 글로블린이다. 글로블린 단백질 중 대부분이 glycine이며 valine을 제외한 필수 아미노산이 풍부하다 (Hwang et al., 2005). 특히 lysine 함량이 높아 lysine이 부족한 쌀과 함께 혼식하면 단백질 보충에 매우 효과적이다. 이외에도 비타민 B1이 현미보다도 더 많이 함유되어 있어 각기병 치료에 효과적이다. 이노산, 피로회복에도 도움이 되며 비타민 A, B2, 칼슘, 인, 철분 등이 함유되어 있다. 또한 팥의 외피에는 사포닌과 콜린이라는 성분이 들어있어 항암효과와 성인병 예방에도 도움이 된다고 알려져 있으며, 포함된 사포닌의 거품을 내는 특성 때문에 피부 미용에도 이용된다(Kang and Han, 2012). 팥은 열량도 낮아 다이어트 식품으로도 각광받고 있으며(Thomson and Winham, 2013) 팥의 식이섬유(5 g/100 g)는 장운동을 도와 변비해소에도 좋다(Kim et al., 2003). 이처럼 팥은 콩에 비해서는 이용이 적지만 최근 웰빙

*Corresponding author: Jinkyu Lim
Tel: 82-53-950-5755; Fax: 82-53-950-6750
E-mail: jkylim@knu.ac.kr

• Song EJ and Park SM contributed equally in this study.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2014 Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University

열풍과 함께 팔의 효능에 대한 관심이 높아지면서 건강식품으로 인식되어 그 수요와 활용이 증가하고 있어 팔에 대한 활용 증진을 위한 노력이 필요하다. 이에 팔에 관한 연구가 필요하며 특히 팔 단백질에 관한 연구는 콩이나 옥수수 등의 다른 곡류들의 단백질 연구에 비해 많지 않은 실정이다.

따라서, 팔 단백질의 기능에 관해 알아보기 위해 팔 단백질을 추출하여 실험을 실시하였으며 특히 콩의 단백질분해효소 저항성 단백질의 특성과 연관시켜 팔 단백질에 관한 실험을 설계하였다. 소장은 용모와 미세용모를 가지고 많은 소화효소를 분비하여 영양소 흡수에 효과적이다. 그렇기에 대부분의 영양소들이 소장에서 분해되어 흡수된다. 그러나, 사전 연구들에 따르면 콩의 주요단백질은 소장에서 완전히 분해되지 않는다(Wati et al., 2010; Betancur-Ancona et al., 2014). 이러한 단백질을 단백질 분해효소 저항성 단백질이라 보고 팔 또한 이러한 콩 단백질처럼 완전히 분해되지 않고 소장 점막과 어떠한 상호작용을 하는 팔 단백질이 있을 가능성이 있으므로 팔 단백질 중의 소화효소 저항성 단백질에 대한 연구를 중점으로 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

Defatted adzuki bean 샘플용액 제조

팥을 4°C 증류수에 18 시간 동안 침지시켜 외피를 모두 제거한 후 전체의 반은 10분 동안 100°C로 열처리하고 나머지 반은 열처리 없이 각각 동결건조하여 완전히 수분을 제거하였다. 그 후 건조된 열처리 및 무열처리 팥을 각각 분쇄기에 갈아서 고운 분말로 만들고 분말 30 g 당 0.1 × PBS 150 mL를 첨가 후 1 시간 동안 실온에서 200 rpm으로 교반하여 단백질을 추출하고 12000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 수용성 단백질 상층액을 얻었다.

Simulated gastric/intestinal fluid에서 팔 단백질 분해

수용성 팔 단백질 용액을 9 mL씩 취하고 pepsin을 최종 3.2 mg/mL되도록 첨가하여 pH 2로 맞추어 주고(Galia et al., 1998) 37°C water bath에서 반응시키며 0, 1, 2 h에 각각의 반응물을 채취하고 1 M NaOH을 가하여 pH 7로 맞추어 반응을 종료 시킨 후 0°C에서 보관하였다. 채취하고 남은 팔 단백질 반응물에 1 M NaOH 용액을 가하여 pH 6.8로 맞추어 후 pancreatin의 최종 농도가 10 mg/mL 되도록 첨가하고(Galia et al., 1998; Stippler et al., 2004) water bath incubator(37°C)에서 반응시키며 1, 2, 3, 4, 18 h에서 각각 반응물을 채취하고 5분간 100°C 물에서 증탕 열처리하여 반응을 종결 시킨 후 0°C에서 보관하였다.

단백질분해효소 저항성 단백질의 분리

열처리구와 무열처리구 팔 단백질을 pepsin 및 pancreatin으로 소화시킨 후 소화효소에 저항성을 보이는 단백질분해를 위해 12% Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 100 V에서 전기영동 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue G-250으로 overnight staining, 10% ethanol 용액으로

destaining하고 증류수로 세척한 후 scan 하였다(Epson Perfection V700 Photo, Nagoya, Japan).

CaCl₂로 major 팔 단백질 제거

무열처리 팔 단백질 시료용액 9.5 mL에 0.02 M 10 mL 이 되도록 0.5 M Tris-HCl, pH6.8 0.4 mL과 1 M CaCl₂ 0.1 mL을 섞어 최종 10 mM CaCl₂이 들어 있는 20 mM Tris, pH 6.8용액을 10 mL를 만든 후 0°C에서 1시간 방치하여 침전이 생기도록 하고 16000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 major 단백질이 제거된 상층액과 major 단백질을 포함하는 pellet을 분리하여 냉장보관 하였다.

Pancreatin 처리 된 팔 단백질의 2D gel 분석

무열처리 및 열처리 팔 단백질을 pancreatin으로 4 h 처리한 것, 그리고 CaCl₂ 처리하여 얻은 major protein을 simulated intestinal fluid용액에 녹이고 이 용액을 pancreatin으로 4 h 처리한 시료 3 mL에 1:1 비율로 phenol을 넣은 후 vortexing 하고 5분간 3000 rpm, 37°C에서 원심분리하였다. 그 뒤 단백질이 들어 있는 아래쪽 phenol층을 취하여 5 × 부피의 0.1 M ammonium acetate/methanol을 넣어 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 70% ethanol을 넣고 vortexing하여 washing한 뒤 5분간 12000 rpm, 37°C에서 원심분리하고 pellet을 세척하는 과정을 3 번 반복하였다. 세척된 단백질 시료를 동결건조하고 그 단백질 시료 450 µg을 사용하여 pH 4.0-7.0 구간의 IPG-strip(Biorad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 36000 V-h로 isoelectric focusing하였다. 1차원 전기영동이 이루어진 strip을 equilibration buffer에서 30분간 처리 후 2차원 전기영동을 12% SDS-PAGE로 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue G-250으로 staining(overnight)한 후 10% ethanol로 destaining하고 증류수로 세척한 후 gel 상에 분리된 단백질 image를 scan하였다.

MALDI-TOF 측정

2-D gel에서 선발한 단백질 spot들을 50% acetonitrile/0.1 M NaHCO₃, pH 8.0로 destaining한 후 냉동건조 하여 보관하였다. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) 질량분석 할 spot을 정하고 동결건조한 gel에 1 mg/mL 0.1 M NaHCO₃, pH 8.0, Trypsin(Promega, MI, USA) 을 15 µL씩 넣고 얼음에서 30분 동안 incubation 한 뒤 37°C water bath에 16시간 반응시켰다. Trypsin을 처리한 tube에서 15 µL 용액을 취하여 새 tube에 담고 얼린 후에 동결 건조하여 MALDI-TOF를 위한 샘플을 만든다. MALDI-TOF 분석에서 얻어진 mass spectra를 M-over-Z 프로그램으로 calibration하고 그 값들을 가지고 NCBI-database를 검색하여 단백질을 동정하였다(Webster, 2012). MASCOT을 검색엔진으로 사용하여 얻은 score로부터 가장 신뢰도가 높은 것들을 동정된 단백질로 결정하였다.

CaCl₂ 처리로 얻은 major 팔 단백질을 이용한 tissue binding 냉동 보관하였던 major 팔 단백질인 CaCl₂ pellet을 biotinylation 하기 위해 1 × PBS로 10 mg/mL 농도로 맞춰주고 10 mg biotin/1 mL dimethyl sulfoxide 0.1 mL과 1 h 실온에서 반응 시켜주고

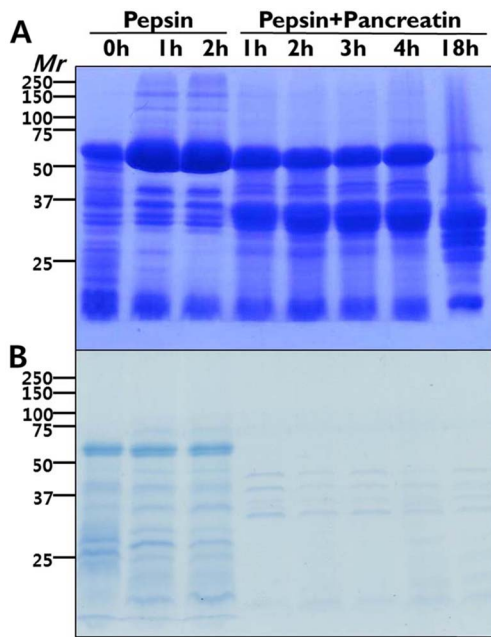


Figure 1. Protease resistance of proteins fractionated from adzuki beans. The soluble proteins from no-heat-treated (A) and heat-treated (B) adzuki beans were dissolved in simulated gastric fluid and digested using pepsin at pH 2.0 for 0, 1, and 2 h. The 2 h pepsin-digested sample was pH-adjusted and digested by pancreatin for 1, 2, 3, 4, and 18 h at pH 6.8. The samples were heat inactivated right after sampling and stored frozen until analyzed using 12% SDS-PAGE.

얼음 위에서 냉장보관하였다. 쥐의 소장을 paraffin으로 고정하여 4 µm 절편으로 lateral 하게 자른 slide를 이용하여 tissue binding을 실행하였다. 먼저 paraffin 제거를 위해 xylene에 10분간 slide를 담고 차례대로 100% ethanol에 3분, 95% ethanol에 3분, 80% ethanol에 3분, 70% ethanol에 3분 동안 담근다. 그 뒤 물에 5분, 3% H₂O₂ 용액에 13분 처리 후 물에 15분간 담근다. Antigen retrieving을 위해 slide를 0.01 M citric acid, pH 6.0에 넣고 마이크로웨이브 오븐에서 10분간 가열시켜준다. 30분간 열을 식힌 후 물에 10분, 1×PBS에 10분 처리한다. Slide 조직 바깥 쪽에 paraffin으로 테두리 원을 그려 marking 하고 blocking 용액으로 2-3 시간 blocking 한다. Biotinylation 된 시료와 avidin을 1:2비율로 섞고 slide에서 blocking 용액을 제거하고 0.1% Tween 20이 들어있는 blocking 용액을 떨어뜨린다. 그 후 두 개의 조직에 각각 20, 40 µL씩 떨어뜨린다. 1×PBS로 3번 세척 후 mounting 용액을 떨어뜨리고 coverslip으로 덮어 mounting한다. 그 뒤 노출을 Light 10 ms, FITC 4 s, DAPI 600 ms로 현미경 관찰하였다.

결 과

팥 단백질의 단백질 분해효소 저항성

열처리와 무열처리 팥에서 분리한 수용성 단백질을 분리하여 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 단백질 정량을 한 결과 무열처리 팥에서는 60 mg/mL의 농도로 단백질이 측정되었으나 열처리구에서는 6 mg/mL 이하로 단백질이 측정되어 열처리에

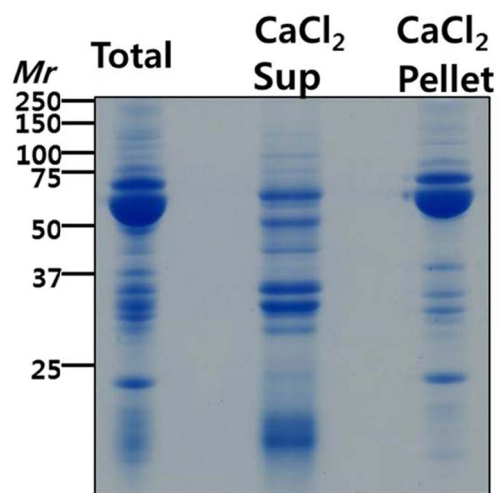


Figure 2. Removal of major adzuki proteins by CaCl₂ treatment. The soluble fraction of the adzuki proteins (Total) was treated with 0.1 M CaCl₂ for 1 h on ice and centrifuged for 30 min at 10000 g. Most of the major proteins were removed as a pellet fraction and the proteins remaining in the supernatant (Sup) were enhanced and visualized using 12% SDS-PAGE.

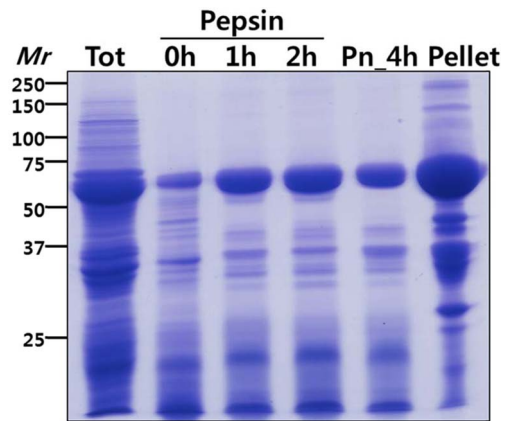


Figure 3. Protease resistance of major adzuki proteins pelleted by CaCl₂ treatment. The major proteins from the adzuki beans remained resistant during 2 h digestion by pepsin and a consecutive 4 h digestion by pancreatin (Pan_4 h).

의해 대부분의 팥 단백질이 불용화되는 것으로 추정되었다 (Figure 1B). 따라서 이 후의 실험에서는 무열처리 팥 단백질을 이용한 실험을 진행하였다. 무열처리와 열처리된 팥 단백질의 단백질 분해효소 저항성을 알아보기 위해 우선 팥 단백질을 pepsin으로 2 h 그리고 pancreatin으로 18 h동안 반응시킨 후 분해되지 않고 남은 단백질을 12% SDS-PAGE 상에서 분리해서 염색을 한 결과 무열처리한 팥 단백질은 pepsin에 대해 대부분 저항성을 보였고 pancreatin에 대해서는 4 h 반응시킬 경우 대부분 저항성을 보였으며 18 h 반응에는 대부분의 major 단백질들이 분해되었을 뿐 나머지 단백질들은 저항성을 보였다. 그러나, 열처리한 팥 단백질은 수용성으로 추출된 단백질의 농도가 낮아 gel 상에서 희미한 단백질 band를 보였는데 pepsin 반응에서는 저항성을 보였으나 pancreatin 반응에서는 대부분의 단백질이 분해되는 경향을 보였다. 이 결과는 팥

단백질에도 콩 단백질에서와 같이 단백질분해효소 저해요소가 들어 있음을 알 수 있고 열처리에 의해 이들 저해요소들이 제거 되었음에도 pepsin에 대해서는 여전히 단백질 분해효소에 저항성을 보임을 알 수 있다. 또한 팥의 major 단백질들은 오히려 pancreatin에 의해 더 선별적으로 분해될 수 있음을 보였다.

팥의 major protein의 동정

SDS-PAGE 상에서 주를 이루는 단백질을 분리하여 상대적으로 미량으로 존재하는 단백질을 분석하고 동시에 major 단백질을 분석하기 위해 주요 팥 단백질들을 추출, 제거하기 위해 Omana and Wu의 방법을 참고하여 CaCl₂ 처리를 실시하였다(Omana and Wu, 2009). 수용성 팥 단백질 용액에 10 mM CaCl₂처리 실험 결과, CaCl₂처리 상층액에는 major 단백질이 제거되고 남은 단백질들이 상대적으로 더 잘 확인 될 수 있었으며 침전물 중에는 major 단백질의 band가 대부분을 차지함을 나타내었다(Figure 2). 또한 주요 단백질을 제거한 CaCl₂처리 상층액을 pepsin 및 pancreatin으로 분해한 결과, CaCl₂ 처리하기 전과 비교하여 상층액 단백질들이 단백질 분해효소에 의해 더 많이 분해됨을 보였다(Figure 3). 이는 팥 단백질은 pepsin에 의해 분해가 일어나나 팥의 major protein들은 다른 팥 단백질들에 비해 pepsin 저항성을 갖고 있음을 보여서 팥의 major protein들이 단백질 분해효소 저항성 단백질을 알 수 있다.

MALDI-TOF 분석을 통한 단백질 분해효소 저항성 단백질들의 동정

팥 단백질 중 단백질분해효소 저항성 단백질들을 분리 동정하기 위해 무열처리 팥 단백질을 2 h 동안 pepsin처리 후 4 h 동안 pancreatin 처리하고 분해되지 않고 남은 단백질들을 2D gel 상에서 분리하였다. 대조구로 단백질 분해효소 처리를 하지 않은 팥 단백질을 같은 방법과 조건으로 2D gel 상에서 분리하여 2D gel image들을 얻고 두 image를 PDQUEST 분석 software로(Biorad, Hercules, CA, USA) 분석하여 농도의 차이를 보이는 단백질을 선별하였다(Figure 4). Gel 단편에 들어있는 단백질들을 trypsin으로 처리한 후 얻어진 peptide를 MALDI-TOF로 분석하여 mass spectrum을 얻고 이들 mass 값을 이용하여 NCBI-database를 검색하여 단백질을 동정하였다. 이러한 peptide mass fingerprinting 분석의 문제점으로는 아직 팥의 genome 염기서열이 완성되지 않아 팥 단백질에 대한 정보를

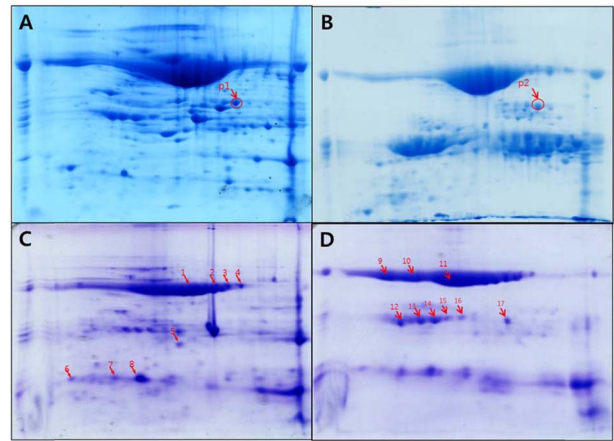


Figure 4. Protease-resistant adzuki proteins separated on 2D gel. The total adzuki proteins (A) and CaCl₂-fractionated major proteins (C) were digested by pepsin for 2 h and pancreatin for 4 h (B and D, respectively), and separated using 2D SDS-PAGE. Based on an image analysis of the gels using PDQUEST software, the protease-resistant proteins are marked with arrows and numbers. The marked proteins were dissected and further analyzed for protein identification by mass spectrometry.

얻을 수 없기 때문에 콩, Arabidopsis, 감자와 같이 지금까지 genome 염기서열이 밝혀진 식물 유전자 database로부터 유사한 단백질들의 정보를 구하는 미완성적인 분석을 할 수 밖에 없었다. 그 결과를 Table 1에 정리하여 나타냈다. 그러나 매우 높은 유의성을 보인 단백질들로부터 major 단백질이 lactotransferrin임을 알 수 있었다(spot #11).

Protease 저항성 단백질의 장점막 조직 결합

팥 단백질들이 단백질 분해효소에 대한 저항성을 보이기 때문에 이들 저항성 단백질들이 소장에 머무는 동안 장점막과 상호작용을 통해 일련의 생리적 작용을 할 수 있다는 가설을 세우소 소장조직과 팥 단백질의 상호결합을 분석하였다. Paraffin에 고정되어 박피층을 만든 후 paraffin을 제거하고 단백질의 folding을 회복시키는 방법으로 장점막 조직을 원상복구 한 뒤 이 조직절편에 biotinylation한 팥 단백질들을 가하여 반응을 시킨 후 avidin-FITC로 표지한 결과 장점막 상에 팥 단백질이 신호는 약했지만 BSA(bovine serum albumin) 처리구에 비해 선택적으로 결합함을 보였다(Figure 5). 이 결과는 콩 단백질

Table 1. Identification of protease-resistant proteins from adzuki beans by peptide mass fingerprinting

Spot	MOWSE score	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Identification
P1	60481	77626/8.6	P14632	lactotransferrin
P2	2280000	118028/5.5	Q5T1B0	dynein light chain domain
3	483594	62019/4.9	B2A0K0	hydroxylamine reductase
8	1570000	9130/4.9	P01058	proteinase inhibitor
9	133044	65947/9.4	Q4R744	uncharacterized protein
10	6376	92093/6.5	Q9LZA6	triacylglycerol lipase
11	2430000	77838/8.9	P08071	lactotransferrin
13	162671	97747/5.9	Q0WPZ6	pentatricopeptide repeat
16	362938	80876/5.6	Q9Y2L9	calponin
17	126596	9153/8.8	P07081	9.2 kDa protein

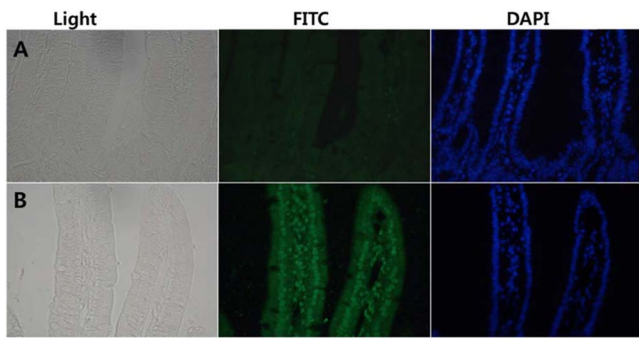


Figure 5. Binding of adzuki proteins to intestinal mucosa layer. The biotinylated soluble adzuki proteins (B) and BSA (A) were conjugated with avidin-FITC. The conjugates were incubated with sections of the small intestine from a mouse. The sections were visualized under a light microscope (Light) and fluorescent microscope. The binding of the proteins to the sections was highlighted by green fluorescence (FITC) and the nuclei of the intestinal cells were visualized by DAPI staining.

이 장점막과 특이적으로 결합하는 것과 비교하면 매우 약한 결합이기는 하지만(unpublished data) 특정 단백질이 장점막과 상호작용을 통하여 일련의 생리작용을 유발 할 수 있는 가능성을 보여주었다. 또한 팥 단백질들이 단백질 분해효소 저항성을 보이며 소장내 머무는 동안 물리적으로 cholesterol이나 중성지방 등 다른 대사물질들과 흡착 또는 결합할 수 있는 가능성도 배제할 수 없다(Nakamura et al., 2009).

고찰

콩 단백질처럼 팥에도 소화효소 저항성을 지닌 단백질이 있을 것으로 예상한 것과 같이 팥 단백질 중에서도 소화효소 저항성을 지닌 단백질이 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 팥 단백질에 열을 가하면 단백질 대부분이 불용화되어 수용성 단백질의 회수가 어려웠다. 이는 팥 단백질은 열에 매우 약해 쉽게 변성되는 것으로 추론된다. 팥의 주요 단백질들을 제거한 뒤에 소화효소로 분해한 결과, 대부분 단백질들이 분해되었으므로 팥의 주요 단백질 들(lactotransferrin)이 단백질 분해효소 저항성을 가지는 단백질들임을 의미한다. 하지만 팥 단백질의 정확한 데이터베이스가 아직 정리되어 있지 않아 이 단백질들을 명확히 규명하기 위해서는 MS/MS방법으로 *de novo sequencing*을 하여 아미노산 서열을 구한 후 아미노산 서열 유사도가 높은 단백질을 선별하는 방법으로 단백질 성질을 규명하는 방법을 시도할 필요가 있다. 단백질 분해효소 저항성 팥 단백질들이 장 점막세포에서 어떤 작용을 할 수 있지 않을까도 예상하였으나 예상과 달리 장 점막세포와는 강하게 결합하지 않는 결과를 얻었다. 이는 팥 주요 단백질들이 제한된 수의 장 점막세포 상의 단백질과 작용하여 생리작용을 나타내거나 물리적인 흡착과 같은 과정을 통해 소장 내에서 생리적 기능을 나타낼 수 있음을 시사한다. 따라서 팥 단백질의 작용에 대한 연구를 위해 단백질분해효소 저항성 단백질들과 lipid와의 상호작용, 단백질 분해산물인 peptide 들의 장점막결합 등도 앞으로 분석을 기다리는 분야이다. 더 정확

한 팥 단백질의 분석을 위해서는 genome 염기서열의 구축 이전에라도 팥의 cDNA 염기서열 분석을 통한 발현 단백질의 정보를 구축하면(Huang et al., 2013) 어느 정도 발현량을 보이는 단백질들은 MS 분석과 peptide mass fingerprinting에 의해서도 동정이 가능할 것으로 예상된다.

요약

1. Pepsin과 pancreatin 소화물들을 비교한 결과, 순수한 팥 단백질 중에서 소화효소 저항성을 가지는 단백질이 존재하는 것으로 확인되었다.
2. 팥의 주요 단백질을 제거하고 pepsin과 pancreatin으로 소화시켰을 때 더 많은 분해가 일어나는 것으로 보아 팥의 주요 단백질들 중에 소화효소 저항성을 가지는 것이 많을 것이라 추측된다.
3. 팥의 주요 단백질들은 장 점막세포와는 크게 작용하지 않는 것을 확인할 수 있었다.
4. 팥 단백질의 데이터베이스 구축과 팥 단백질이 다른 영양소들과의 상호작용을 하는 지에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

사사

본 연구는 KNU학술연구보조비의 지원으로 수행되었음.

References

Betancur-Ancona D, Sosa-Espinoza T, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Chel-Guerrero L (2014) Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *Int J Food Sci Technol* 49: 2-8.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB (1998) Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 15: 698-705.

Huang KY, Shin JW, Huang PJ, Ku FM, Lin WC, Lin R, Hsu WM, Tang P (2013) Functional profiling of the *Trichomonas foetus* transcriptome and proteome. *Mol Biochem Parasitol* 187: 60-71.

Hwang CS, Jeong DY, Kim YS, Na JM, Shin DH (2005) Effects of enzyme treatment on physicochemical characteristics of small red bean extract. *Korean J Food Sci Technol* 37: 189-193.

Kang SJ, Han YS (2012) Studies on the anti-oral microbial activity and selected functional component of small red Bean extract. *Korean J food Cookery Sci* 28: 41-49.

Kim CK, Oh BH, Na JM, Shin DH (2003) Comparison of physicochemical properties of Korean and Chinese red bean starches. *Korean J Food Sci Technol* 35: 551-555.

Nakamura Y, Yabe K, Shimada KI, Sasaki K, Han KH, Okada T, Sekikawa M, Ohda K, Ito N, Horiuchi K, Kawakami S, Fukushima M (2009) Effect of fermented bean paste on serum lipids in rats fed a cholesterol-free diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2506-2512.

Omana DA, Wu J (2009) Effect of different concentrations of calcium

- chloride and potassium chloride on egg white proteins during isoelectric precipitation of ovomucin. *Poult Sci* 88: 2224-2234.
- Stippler E, Kopp S, Dressman JB (2004) Comparison of US Pharmacopeia simulated intestinal fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8, TS of the international Pharmacopoeia with respect to their use in *in vitro* dissolution testing. *Dissolution Technologies* 5: 6-10.
- Thompson SV, Winham DM, Hutchins AM (2012) Bean and rice meals reduce postprandial glycemic response in adults with type 2 diabetes: a cross-over study. *Nutr J* 11: 11-23.
- Wati RK, Theppakorn T, Benjakul S, Rawdkuen S. (2010) Trypsin inhibitor from 3 legume seeds: fractionation and proteolytic inhibition study. *J Food Sci* 75: C223-C228.
- Webster J, Oxley D (2012) Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 800: 227-240.