

한국산 검정콩 및 쌀보리 α -Amylase 저해물질의 이화학적 특성

문주석 · 배영일* · 심기환*[†]

한국식품위생연구원

*경상대학교 식품공학과

The Physicochemical Properties of α -Amylase Inhibitors from Black Bean and Naked Barley in Korea

Ju-Seok Moon, Young-Il Bae* 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

Abstract

The physicochemical properties of the α -amylase inhibitors from black bean and naked barley in Korea were investigated. Preincubation time for maximum inhibition was 30 min and no activity change was seen after that time. Optimum pH of the α -amylase inhibitors from the black bean and naked barley was pH 7.0 and the inhibitory activities were stable in the range of pH 6.0~8.0 in both phosphate and Tris-HCl buffer solutions. Both inhibitors maintained more than 50% of activity after incubation for 17 min at 70°C. The inhibitors from the black bean and naked barley maintained more than 50% of activities after treatment for 40 min and 30 min with pepsin, and 30 min and 50 min with trypsin, respectively. Both inhibitors functioned via a noncompetitive mechanism and were active against porcine pancreatic and human salivary α -amylases. The activities of both inhibitors were linear for the ionic strength ranging from 0 to 0.9. The addition of 70 mM maltose to the reaction mixture caused a maximum increase in the relative activities of both inhibitors, but it did not affect the dissociation of the EI complex. The activities of both inhibitors were significantly enhanced by adding 1mM of K^+ or Mg^{2+} .

Key words: α -amylase inhibitor, black bean, naked barley, inhibitory activity

서 론

생물체 내의 효소와 그 저해물질은 개체발생에서 노화에 이르는 모든 생명현상과 깊은 관계를 가지며, 미생물이 생산하는 효소 저해물질은 대부분이 고분자인 동식물 유래의 저해물질(1)과는 다른 구조를 가지고 있다(2). 효소 저해물질은 효소 활성부위의 구조나 촉매 반응기구의 해석에 이용되거나, 복잡한 생리기능에 있어서 효소의 역할 및 질병에 관여하는 효소의 해명에도 중요한 역할을 하며, 특히 α -amylase 저해물질은 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 예방과 치료제로서 기대되어 임상적 의의도 있다(3). α -Amylase(α -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1)의 저해물질은 Chrzaszcz와 Janicki(4)에 의해 처음으로 보고된 이래로 많은 식물체에 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 밀(5),

옥수수(6) 및 두류(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 연구결과로부터 제시되고 있다(8,9). 최초로 Marshall과 Lauda(10)에 의해 단백질성 α -amylase 저해물질이 분리되어 부분적인 특성이 밝혀졌는데(11) 그 후 그 구성성분과 구조(12), 특이성이 일부 보고되었으며(13), 동물에 대한 생화학적 활성도(14) 및 콩 자엽에서의 생리적인 특성과 같은 연구들을 보고하였다(15).

이와 같이 곡류와 두류는 가공처리한 상태로 사람의 식생활에 다양하게 이용되고 있으며(16), 현재 외국에서는 여러 연구자들에 의해 두류와 곡류 중의 α -amylase 저해물질에 대한 연구가 계속되고 있으나, 국내에서는 Kim 등(17)의 방선균에 의해 분리된 α -amylase

[†]To whom all correspondence should be addressed

저해물질에 대한 연구와 Lee와 Yang(18)의 한국산 한약재의 α -amylase 저해물질의 검색 등이 있을 뿐, 식물체에서 분리한 α -amylase 저해물질에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국산 두류와 곡류 중 α -amylase에 대한 저해활성도가 높은 검정콩과 쌀보리로부터 α -amylase 저해물질을 분리·정제하여 그 이화학적 특성에 관한 기초자료를 얻기 위하여 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 검정콩과 쌀보리는 경상대학교 두류육종연구실에서 보존 중인 품종과 진주 근교에서 구입하여 분리·정제한 시료를 -4°C 이하에 보관하면서 이화학적 특성을 실험하였다. 실험에 사용한 효소는 Sigma사(USA) 제품으로 porcine pancreas(1,240 units), human saliva(110 units), *Aspergillus oryzae*(1,500 units) *Bacillus subtilis*(2,800 units) 및 맥아보리에서 정제한 α -amylase(12.7 units)를 사용하였으며, 그의 시약들은 특급을 사용하였다.

전처리의 영향

전처리의 영향을 알아보기 위하여 검정콩과 쌀보리에서 전보(19,20)와 같이 분리·정제한 α -amylase 저해물질(100 μg)과 효소용액(3 units)을 pH 7.0으로 조절한 후 25, 30 및 35°C 에서 10, 20, 30, 40 및 50분별로 하여 각각 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

최적 pH 및 pH 안정성

검정콩과 쌀보리에서 분리·정제한 α -amylase 저해물질의 최적 pH를 조사하기 위하여 10mM acetate 완충액(pH 4.0~6.0), 10mM phosphate 완충액(pH 6.0~7.0) 및 10mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0~11.0)을 사용하여 기질(2% soluble starch), 효소액(3 units) 및 저해물질(100 μg)을 반응시켜 각각 저해활성도를 측정하였고, pH 안정성은 상기 완충액과 저해물질을 혼합하여 4°C 에서 24시간 방치한 후 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

열 안정성

검정콩과 쌀보리에서 분리·정제한 α -amylase 저해물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 α -amylase저해물질(100 μg)과 효소용액(3 units)을 pH 7.0으로 조절

한 후 50, 60 및 70°C 에서 10분 간격으로 방치시킨 다음 각각 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

각종 α -amylase에 대한 저해활성도

검정콩과 쌀보리로부터 분리한 α -amylase 저해물질에 대한 각종 효소에 대한 저해활성도를 조사하기 위하여 porcine pancreas, human saliva, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* 및 맥아보리로부터 추출한 α -amylase(3 units)를 최적 pH 6.9에서 각각 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

기질농도

20mM sodium phosphate 완충액(pH 6.9)에 기질인 가용성 전분을 0에서 1%까지 농도별로 용해하여 30°C 에서 30분간 전처리시킨 후 25°C 에서 5분간 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 α -amylase 저해물질과 반응시켜 초기 반응속도를 측정하였고, 이때 얻어진 기질농도에 따른 초기 반응속도를 Lineweaver-Burk법으로 각각 plot하였다.

α -Amylase 저해물질의 농도

α -Amylase 저해물질의 농도별 영향은 기질 및 효소의 혼합용액을 pH 7.0으로 조절한 후 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 저해물질의 농도를 20, 40, 60, 80 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조정하고, 전처리 시간을 동일하게 하여 각각 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

단백질 분해효소

단백질 분해효소의 영향은 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 α -amylase 저해물질(100 μg)에 pepsin(pH 1.5), trypsin(pH 7.7)의 최적 pH로 조정한 후 pepsin(110 units/ml), trypsin(103 units/ml)을 각각 10 μl 를 첨가하여 amylase의 최적 pH 6.9로 조절한 다음 경시적으로 저해물질의 저해활성도를 측정하였다.

이온강도

저해물질에 대한 이온강도의 영향은 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 α -amylase 저해물질과 효소의 혼합용액에 NaCl로 이온강도를 각각 0.1에서 0.9까지 조절하여 전처리한 후 25°C 에서 5분간 반응시켜 저해물질의 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

Maltose

Maltose의 영향은 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 α -

amylase 저해물질과 효소의 혼합용액에 maltose를 각 농도별(0~90mM)로 동시에 첨가한 후 30°C에서 30분간 전처리하여 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 저해물질의 저해활성도를 측정하였다. 또한 α -amylase 저해물질과 효소의 혼합용액을 30°C에서 16시간 전처리한 후 maltose(0~90mM)를 첨가하여 상기와 같은 방법으로 저해물질의 저해활성도를 측정하였다.

무기염

α -Amylase 저해물질에 대한 무기염의 영향을 조사하기 위하여 기질, 효소 및 검정콩과 쌀보리로부터 분리한 저해물질을 각각 pH 7.0으로 조절하고 각종 무기염(1mM)을 첨가한 후 25°C에서 5분간 반응시켜 저해물질의 저해활성도를 상대적으로 측정하였다.

결과 및 고찰

α -Amylase 저해물질에 대한 전처리의 영향

검정콩과 쌀보리의 α -amylase 저해물질에 대한 전처리의 영향을 알아보기 위하여 저해물질과 효소의 혼합용액을 pH 7.0으로 조절한 후 25, 30 및 35°C에서 10~50분으로 하여 각각 저해활성도를 측정한 결과는 다음과 같다. 즉 검정콩에서 분리한 α -amylase 저해물질은 25, 30 및 35°C에서 10분간 처리하였을 때 각각 40, 45 및 60%의 저해활성도를 나타내었고, 30°C에서 30분간 처리할 경우 95% 이상의 최대저해활성이 나타났다. 쌀보리에서 분리한 α -amylase 저해물질의 경우 25, 30 및 35°C에서 10분간 처리하였을 때 각각 37, 45 및 50%의 저해활성도를 나타내었고, 30°C에서 30분간 처리할 경우 95%이상의 최대저해활성을 나타내었으며, 그 이후는 저해활성도의 변화가 거의 없었다. 한편 Frels와 Rupnow(21)는 검정콩 α -amylase 저해물질을 25~40°C에서 저해활성도를 측정한 결과, 온도가 높을수록 저해활성도가 높았다고 보고하였으며, Blanco-Labra와 Iturbe-Chinas(22)는 옥수수 저해물질은 15분 경과할 때 저해활성도가 높게 나타났으나, 그 이후는 저해활성도가 낮았다고 보고하였고, Granum(23)도 호밀 저해물질은 30°C 이상에서는 저해활성도가 감소하였다고 보고하였다. 이는 α -amylase 저해물질의 저해활성을 측정할 때 사용하는 α -amylase의 종류와 품종에 따라 차이가 나는 것으로 추측된다.

최적 pH 및 pH 안정성

검정콩과 쌀보리에서 분리한 α -amylase 저해물질

의 최적 pH를 조사하기 위하여 10mM acetate 완충액은 pH 4.0~6.0, 10mM phosphate 완충액은 pH 6.0~7.0 및 10mM Tris-HCl 완충액은 pH 7.0~11.0으로 기질용액의 pH를 변화시켜 조제한 후 각 pH별 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 검정콩과 쌀보리 저해물질은 각각 pH 7에서 최적을 나타내었다. 이와 같은 결과를 토대로 기질용액을 Tris-HCl 완충액으로 pH 3.0~11.0까지 변화시켜 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질을 각 pH별로 4°C에서 24시간 방치한 후 pH 안정성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질은 각각 pH 6~8 범위에서 안정성이 높았다. 한편 Frels와 Rupnow(21)는 검정콩 저해물질 중 I-1의 최적 pH는 4.5~5.0, I-2는 5.0~5.5 이었다고 보고하였고, Marshall과 Lauda(10)는 강남콩에서 정제한 phaseolamin의 최적 pH는 5.5였다고 보고하였으며, Baker(24)는 쌀 α -amylase 저해물질의 최적 pH는 4.5, pH 안정성은 4~7범위로 보고하였고, 밀 저해물질의 최적 pH는 4.5, pH 안정성은 9~10범위였다고 보고하였다(25). 이와 같이 곡류 α -amylase 저해물질의 최적 pH는 4.5에서 9.5까지 폭넓게 나타난 것에 비하여 한국산 쌀보리 저해물질은 7.0이었으며, 두류 α -amylase 저해물질의 최적 pH는 4.5에서 5.5까지 약산

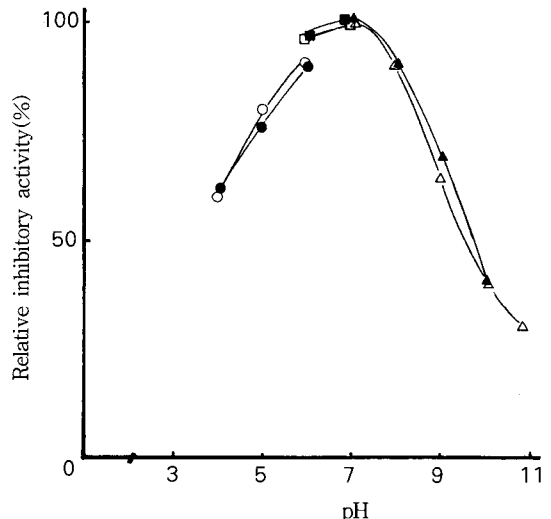


Fig. 1. Effect of pH on the activity of the purified α -amylase inhibitors from black bean (●,■,▲) and naked barley (○,□,△).
 —●○—: pH 4.0~6.0(10mM acetate buffer)
 —■□—: pH 6.0~7.0(10mM phosphate buffer)
 —▲△—: pH 7.0~11.0(10mM Tris-HCl buffer)
 The α -amylase inhibitors(100 μ g), enzyme(3 units) and substrate(2% soluble starch) were preincubated for 30 min at 30°C and stood for 5 min at 25°C. α -Amylase inhibitory activities were determined in the range of pH 4.0~11.0.

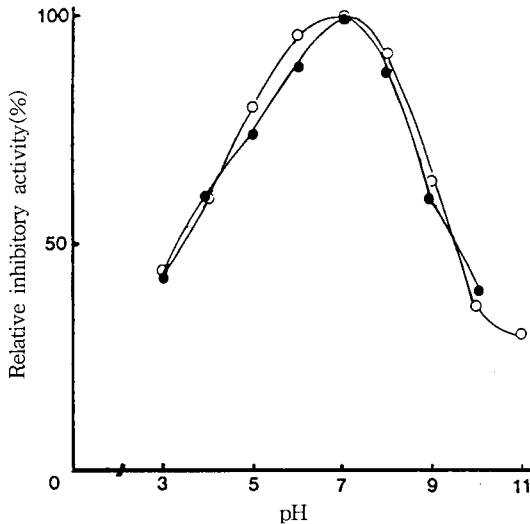


Fig. 2. Effect of pH on the activity of the purified α -amylase inhibitors from black bean(●) and naked barley(○).

—●—○—: pH 4.0~11.0(10mM acetate buffer)
The condition of determining the α -amylase inhibitory activities was the same as Fig. 1.

성에서 저해활성을 나타난 것에 비하여 한국산 검정콩 저해물질은 중성부근에서 최적을 나타내었다. 이러한 차이는 반응물의 조건 즉 농도, 이온강도, 사용하는 α -amylase의 종류 및 온도 등에 기인한다고 추측된다.

열 안정성

검정콩과 쌀보리에서 분리한 α -amylase 저해물질의 열 안정성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉 검정콩 α -amylase 저해물질은 50°C에서 10분 후 90% 저해활성도를 유지하였으며, 20~50분 후 88~75%로 완만하게 감소하였다. 50% 저해활성도를 유지하는 시간은 60, 70°C에서 각각 50, 20분이었으며, 검정콩 저해물질이 보리에 비해 열에 안정한 것으로 나타났다. 쌀보리 α -amylase 저해물질의 경우 50°C에서 10분 후 90% 저해활성도를 유지하였고, 20, 30, 40 및 50분 후 80, 75, 70 및 65%로 완만하게 감소하는 경향이었으며, 50% 저해활성도를 유지하는 시간은 60, 70°C에서 각각 36, 17분이었다. 한편 Marshall과 Lauda(10)는 강남콩 α -amylase 저해물질 중 70°C에서 15분 동안 71% 저해활성도를 유지하였다고 보고하였고, Frels와 Rupnow(21)도 검정콩 저해물질 중 하나는 70°C에서 5분간 안정하였으며, 다른 하나는 70°C에서 30분 동안에 60% 저해활성도를 유지하였다. Blanco-Labra와 Iturbe-Chinas(22)는 옥수수 저해물질은 96°C에서 5분, Shaikin과 Birk(26)도 밀 저해물질 중 하나는 끓는 물에서 10분간 처리

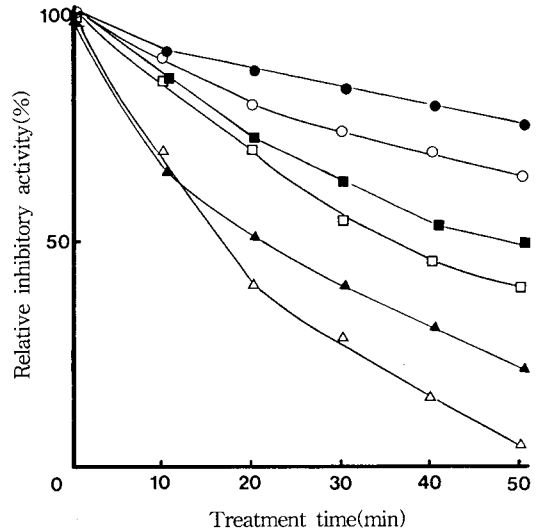


Fig. 3. Effect of temperature on the thermal stability of the purified α -amylase inhibitors from black bean(●, ■, ▲) and naked barley(○, □, △).

The α -amylase inhibitors(100 μ g) and enzyme solution (3 units) were adjusted to pH 7.0 and then the thermal stability were determined on the interval of 10 min at 50, 60, and 70°C.

하여도 저해활성도를 유지하였으나, 다른 하나는 10분 후에는 70 내지 80% 잃어버렸다고 보고하였으며, O'Connor와 Mcgeeney(27)도 밀 저해물질은 60°C에서 1시간 처리 중 하나는 약간의 저해활성도를 잃었으나, 다른 3개는 저해활성도를 유지하였다고 보고하였다. 이는 한국산 쌀보리와 검정콩 α -amylase 저해물질의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다.

각종 α -amylase에 대한 저해활성도

각종 α -amylase에 대한 저해활성도를 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질은 porcine pancreatic α -amylase를 대조구로 하였을 때 human saliva의 α -amylase에 대해 각각 95% 저해하였으나, *Asp. oryzae*, *B. subtilis* 및 맥아보리의 α -amylase에서는 저해활성도가 낮았다. 한편 Frels와 Rupnow(21)도 검정콩 저해물질이 porcine pancreatic 및 human saliva의 α -amylase에 대해서는 저해하였으나, *B. subtilis*, *Asp. oryzae* 및 맥아에서 유래되는 α -amylase에 대해서는 저해활성도가 없었다고 보고하였으며, Blanco-Labra와 Iturbe-Chinas(22)는 옥수수의 저해물질은 human pancreatic, hog pancreas, *Asp. oryzae*, 밀, 호밀 및 보리의 α -amylase 저해물질에 대해서는 저해활성도가 없었다고 보고하였다. 일반적으로 식물체에서 정제한 α -amylase 저해물질은 포

Table 1. Effect of α-amylase inhibitors from black bean and naked barley on the activity of α-amylase

Enzyme ¹⁾	Origin	Substrate	pH	Relative inhibition(%)	
				Black bean	Naked barley
Pancreatic α-amylase	Porcine pancreas	Starch	6.9	100	100
Salivary α-amylase	Human saliva	"	"	95	93
Fungal α-amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	"	"	30	25
Bacterial α-amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	"	"	30	28
Plant α-amylase	Barley malt	"	"	20	15

¹⁾Enzymes(Sigma Co., USA) were adjusted to 3 units, respectively.

유동물의 α-amylase에 대해서는 저해활성도를 나타내지 않는 즉 기원 특이성이 있었으며(16), 본 연구에서의 한국산 검정콩과 쌀보리 α-amylase 저해물질도 이 경우와 유사하였다.

기질농도의 영향

20mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 기질인 가용성 전분을 0~1% 범위의 농도별로 용해하여 검정콩과 쌀보리 α-amylase 저해물질과 효소용액을 30°C에서 30분간 전처리한 후 25°C에서 5분간 반응시켜 초기 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk법으로 plot한 결과는 Fig. 4와 같이 비경쟁적으로 저해하였다. 이와 같은 결과는 옥수수(22) 및 검정콩(21)의 연구보고와 비슷한 경향을 나타내었다.

α-Amylase 저해물질 농도의 영향

α-Amylase 저해물질 농도의 영향을 알아보기 위하여 저해물질을 pH 7.0으로 조절한 후 저해활성도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 검정콩 α-amylase 저해물질은 20μg일 때 45% 저해활성도를 나타내었으며, 40, 60 및 80μg일 때 각각 85, 90 및 100%를 나타내었다. 쌀보리 α-amylase 저해물질의 경우 20μg일 때 35% 저해활성도가 나타났으며, 40, 60 및 80μg일 때 각각 70, 85 및 100%로서 검정콩과 비슷한 경향으로 나타났다. 한편 Frels와 Rupnow(21)도 검정콩에서 2개의 저해물질 중 하나는 2.6×10⁻⁸M, 다른 하나는 1.3×10⁻⁸M에서 각각 45%, 52%의 저해활성도를 나타내었다고 보고하였고, O'Donnell과 McGeeney(28)는 밀 α-amylase 저해물질

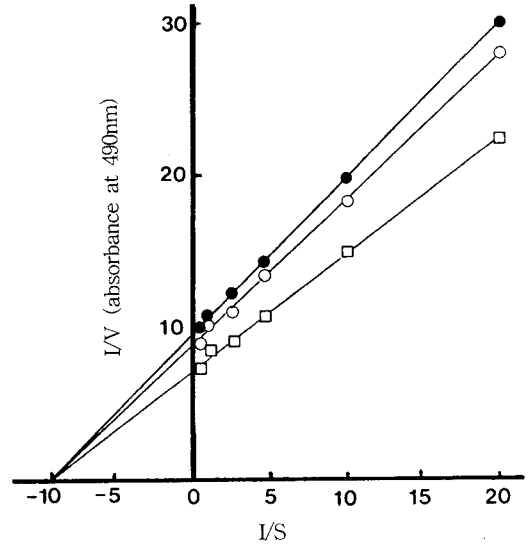


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot for the activity of porcine pancreatic α-amylase in the absence(□) and in the presence of the inhibitors purified from black bean(●) and naked barley(○). Soluble starch(0~1%) was preincubated for 30min at 30°C and the first reaction rate was determined after another reaction with the inhibitors were incubated for 5min at 25°C.

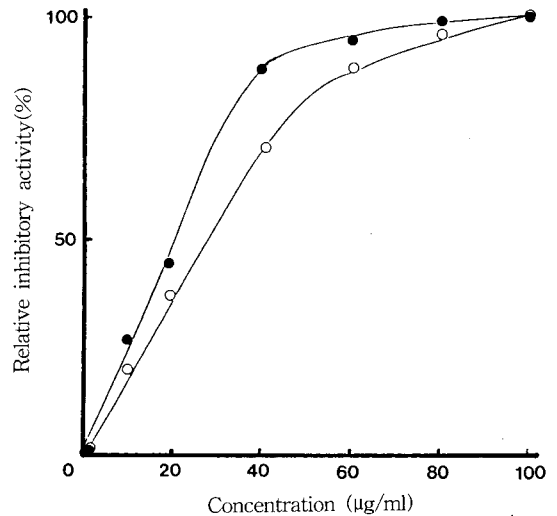


Fig. 5. Effect of inhibitors concentrations from black bean(●) and naked barley(○) on the activity of α-amylase.

이 pancreatic에 비해 salivary amylase에 대해 농도가 증가할수록 특이적으로 저해활성도가 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 한국산 검정콩과 쌀보리 α-amylase 저해물질의 농도가 높을수록 저해활성도가 증가하는 경향이였다.

단백질 분해효소의 영향

α -Amylase 저해물질에 대한 단백질 분해효소(pepsin, trypsin)의 영향을 나타낸 결과는 Fig. 6 및 7과 같다. 즉 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질은 pepsin으로 20분 동안 처리할 때 저해활성도가 70%를 유지하였으나, 1시간 후에는 20%로 급격하게 감소하였다(Fig. 6). Trypsin처리시 저해활성도는 pepsin의 경우 20분까지는 검정콩의 저해활성도가 70%를 유지하였고, 1시간 이후에는 30%를 유지하여 pepsin의 경우보다는 완만하게 감소하였다(Fig. 7). Frels와 Rupnow(21)는 검정콩 저해물질 I-1($2.2 \times 10^{-7}M$)과 I-2($1.1 \times 10^{-7}M$)에 trypsin($2.1 \times 10^{-5}M$)을 첨가하여 4시간 동안 처리하였을 때 I-1은 45분 경과 후 저해활성도는 원래의 20%만 잔존하였다고 보고하였으며, I-2는 저해활성도가 50% 이상 잔존하였다고 보고하였고, Shainkin과 Birk(26)도 밀 α -amylase 저해물질 0.2ml(1%)에 trypsin 10 μ g, pepsin 33 μ g, carboxypeptidase A 6 μ g 및 carboxypeptidase B 6 μ g를 처리하였을 때 carboxy peptidase A와 B처리에서는 저해활성도가 무첨가구에 비해 약하게 감소하였다고 보고하였다.

이온강도의 영향

20mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 NaCl로 이온강도(0.1~0.9)를 조절하여 α -amylase 저해물질과

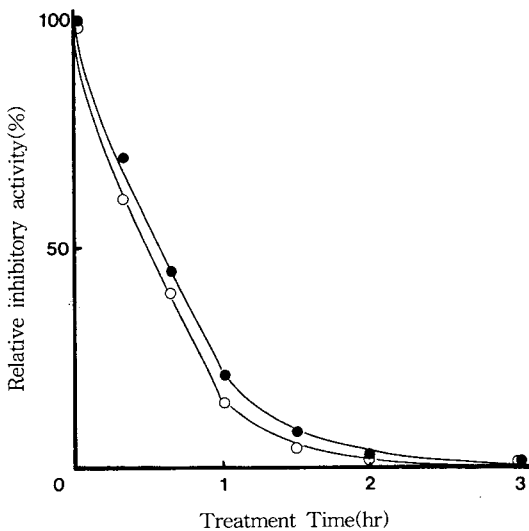


Fig. 6. Effect of pepsin treatment on the stability of the purified α -amylase inhibitors from black bean (●) and naked barley (○). The α -amylase inhibitors(100 μ g) were added pepsin (110 units) 10 μ l and the optimum pH for amylase was determined to 6.9.

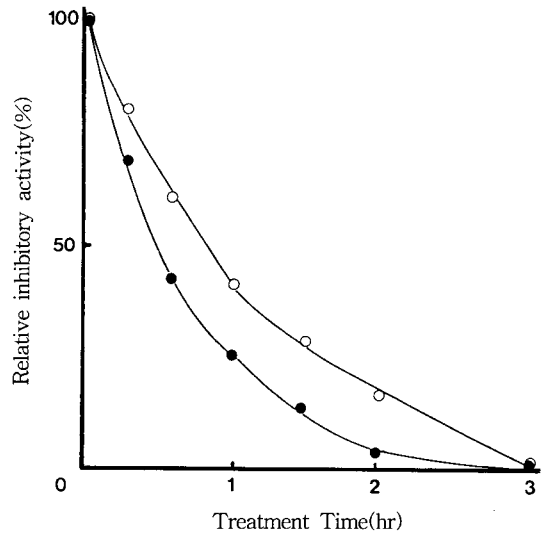


Fig. 7. Effect of trypsin treatment on the stability of the purified α -amylase inhibitors from black bean (●) and naked barley (○). The α -amylase inhibitors(100 μ g) were added trypsin (103 units) 10 μ l and the optimum pH for amylase was determined to 6.9.

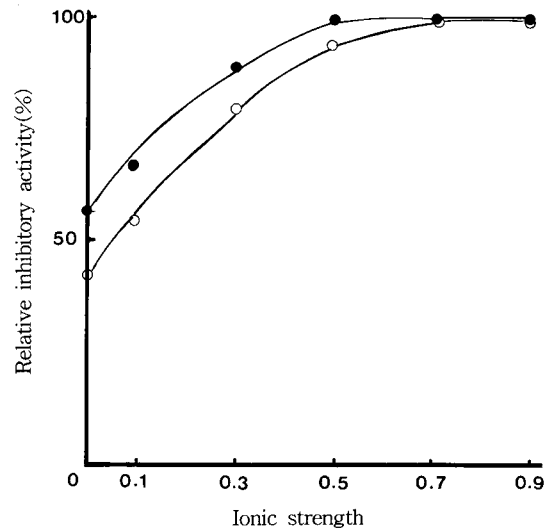


Fig. 8. Effect of ionic strength on the stability of the purified α -amylase inhibitors from black bean (●) and naked barley (○).

효소용액을 가한 후 저해물질에 대한 이온강도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 검정콩 α -amylase 저해물질은 이온강도가 0.1, 0.3 및 0.5일 때 저해활성도가 각각 68, 90 및 100%로 쌀보리 저해물질보다는 높게 나타났다. 쌀보리 α -amylase 저해물질의 경우 이온강도 0.1, 0.3 및 0.5일 때 저해활성도는 각각 55, 80 및

95%로서 이온강도가 높을수록 저해활성도가 높게 나타났다. 한편 Frels와 Rupnow(21)는 검정콩 α -amylase 저해물질은 NaCl로 이온강도를 0.1~0.9으로 조절하여 저해활성도를 측정하였는데, 이온강도 0.1에 비해 0.9에서 3배의 저해활성도를 나타내었다고 보고하였으며, O'Donnell과 McGeeney(28)는 밀 α -amylase 저해물질은 phosphate 완충액의 농도를 0.1에서 50mM로 증가하여도 저해활성도가 증가하지 않았으나 phosphate 완충액 0.1mM에 1mM NaCl의 첨가시에 저해활성도가 68%에서 85%로 증가하였다고 보고한 반면, Granum(23)은 밀 저해물질은 KCl의 농도를 1.0M까지 증가하여도 저해활성도는 증가하지 않았다고 보고하였는데 이러한 결과는 이온강도가 높을수록 charge group을 보호함으로써 효소와 저해물질과의 복합체 형성을 도와주기 때문이라고 보고하였다.

Maltose 농도의 영향

α -Amylase 저해물질과 효소의 혼합용액에 maltose를 0에서 90mM까지 농도별로 동시에 첨가한 후 검정콩과 쌀보리에서 분리한 저해물질에 대한 maltose 농도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 즉 검정콩 α -amylase 저해물질은 maltose를 10mM 첨가하였을 때 저해활성도가 70%로 나타났으며, 쌀보리 α -amylase 저해물질의 경우 maltose를 10mM 첨가하였을 때 저해활성도가 55%로 나타났고, 30, 50 및 70mM 첨가하였을 때 각각 90, 95 및 100%의 저해활성도를 나타내었으며, 그 이후의 농도에서는 저해활성도의 변화가 거의 없었다. 이는 Frels와 Rupnow(21)에 의한 검정콩에서 2개(I-1, I-2)의 저해물질을 정제하여 maltose 0에서 87mM까지 첨가하여 저해활성도를 측정할 결과 maltose 87mM은 무첨가에 비해 I-1 및 I-2는 각각 1.5, 3배의 저해활성을 나타낸 결과와 일치하였다. 효소에 α -amylase 저해물질을 가하여 16시간 동안 복합체를 형성한 후 maltose를 0에서 90mM까지 농도별로 첨가하여 저해물질의 저해활성도를 측정할 결과, 쌀보리와 검정콩 α -amylase 저해물질은 초기의 저해활성도에 영향을 주지 않았다(Fig. 10). Frels와 Rupnow(21)는 검정콩 α -amylase 저해물질에서 효소와 저해물질을 16시간 전처리시킨 후 maltose를 0에서 87mM까지 첨가하여도 저해활성도에는 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 이러한 결과는 효소에 대해 경쟁적인 저해물질로 작용하는 maltose를 첨가하여 전처리하였을 때 효소와 저해물질과의 복합체 형성을 보호하는 것으로 나타났으며, 일단 효소-저해물질 복합체를 형성하면 강한 상호작용을 가진다는 결과와 일치하였다.

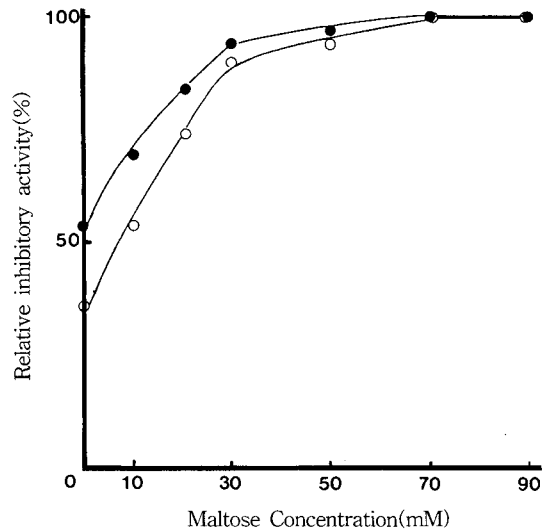


Fig. 9. Effect of maltose on the stability of the purified α -amylase inhibitors from black bean(●) and naked barley(○).

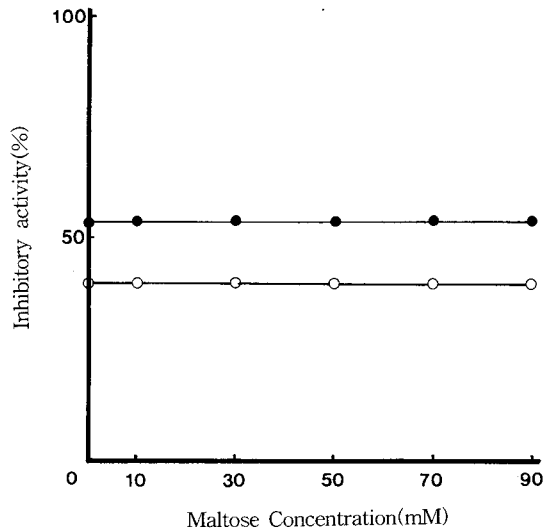


Fig. 10. Effect of maltose on preformed complexes of the purified α -amylase inhibitors from black bean (●) and naked barley(○).

각종 무기염의 영향

검정콩과 쌀보리의 α -amylase 저해물질에 대한 무기염의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 즉 검정콩 α -amylase 저해물질에 대한 무기염의 영향은 망간 및 수은 이온은 저해활성도가 대조구에 비해 높게 나타났으며, 카드뮴 및 구리 이온은 저해활성도를 억제하는 것으로 나타났으며, 쌀보리 저해물질의 경우에 망간,

Table 2. Effect of inorganic salts on the activity of the purified α -amylase inhibitors from black bean and naked barley

Inorganic salts	Concentration (mM)	Relative inhibition(%)	
		Black bean	Naked barley
Control	1	100	100
CaCl ₂	1	110	105
CoCl ₂	1	110	110
SnCl ₂	1	115	120
CdCl ₂	1	95	108
MgCl ₂	1	105	95
ZnCl ₂	1	113	102
CuSO ₄	1	85	70
HgSO ₄	1	120	123
KCl	1	105	129
NaCl	1	106	108
MnCl ₂	1	125	130

칼륨, 수은 및 주석이온은 대조구에 비하여 저해활성도가 높았으나, 마그네슘 및 구리이온은 저해활성도를 크게 억제하였다. 한편 Baker(24)는 α -amylase 저해물질에 대해 20mM NaCl 첨가하여 저해활성도를 측정하였을 때 K_m 치나 V_{max} 에 아무런 영향을 미치지 않는다고 하였으며, NaCl의 첨가는 효소의 최적 pH에도 관여하지 않는다고 보고하였다. 이는 본 실험의 α -amylase 저해물질의 정제과정 중 NaCl을 용출액으로 사용하였는데 저해활성도에 큰 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

요 약

한국산 검정콩과 쌀보리로부터 분리·정제한 α -amylase 저해물질의 이화학적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 즉 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질의 전처리 시간은 30분에 저해활성도가 가장 높았으며, 그 이상의 시간에서는 변화가 없었다. 최적 pH는 phosphate 및 Tris-HCl 완충액에서 7.0이었으며, pH 6~8에서 안정하였다. 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질의 열 안정성은 70°C에서 17분 동안 50%의 저해활성도를 유지하였다. 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질은 모두 porcine pancreatic과 human saliva의 α -amylase에 대해서 높은 저해활성도를 나타내었고, 모두 농도가 높을수록 저해활성도가 높았으며, 기질에 대해 비경쟁적으로 작용하였다. Pepsin 처리시 검정콩 쌀보리 α -amylase 저해물질은 각각 40, 30분, trypsin 처리시 각각 30, 50분 동안 50% 저해활성도를 유지하였다. 검정콩과 쌀보리 α -amylase 저해물질은 이온강도가 높을수록 저해활성도가 높았고, maltose의 영향은 70mM에서 최대 저해활성도를 보였으며, 그 이상의 농도에서

는 변화가 없었다. 효소-저해물질 복합체가 형성된 후 maltose 첨가는 저해활성도에 영향을 미치지 않았으며, 무기염에 대한 영향은 칼륨 및 마그네슘에서 저해활성도가 높았다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드립니다.

문 헌

- Dupa, S. L. and Pattabiraman, T. N. : Isolation and characterization of a trypsin/chymotrysin inhibitor from the Millet *Eshinocloa fruneutacea*. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 642(1985)
- Arai, M., Oouchi, N. and Murao, S. : Inhibitory properties of an α -amylase inhibitor, Pain, from *Streptomyces corchorushii*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 987(1985)
- Puls, W. and Keup, U. : Influence of α -amylase inhibitor(BAY D7791) on blood-glucose, serum-insulin and NEFA in starch loading test in rats, dogs and man. *Diabetologia*, **9**, 97(1973)
- Chrzaszcz, T. and Janicki, J. : "Sisto-amylase", a natural inhibitor of amylase. *Chem. Abstr.*, **27**, 3491(1933)
- Kashland, N., Richardson, M. : The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amylase. *Phytochemistry*, **20**, 178(1981)
- Granum, P. E. : Purification and characterization of an amylase inhibitor from rye(*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.*, **2**, 103(1978)
- Bowman, D. E. : Amylase inhibitor of navy beans. *Science*, **102**, 358(1945)
- 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)
- Robertson, M. and Hill, R. D. : Accumulation of an endogenous α -amylase inhibitor in barley during grain development. *J. Cereal Sci.*, **9**, 237(1989)
- Marshall, J. J. and Lauda, C. M. : Assay of alpha-amylase inhibitor activity in legumes. *Die Starke*, **27**, 274(1975)
- Prakash, D., Misra, P. N. and Misra, P. S. : Variation in protein and trypsin of winged bean(*Prophocarpus tetragonolobus*) seeds. *J. Sci. Food Agric.*, **57**, 623(1991)
- 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)
- Pick, K. H. and Wobser, G. : Proteinaceous α -amylase inhibitor from beans(*Phaseolus vulgaris*). Purification and characterization. *Physiol. Chem.*, **359**, 1371(1978)
- Jaffe, W. G. and Lette, L. V. : Heat-labile growth-inhi-

- biting factors in bean(*Phaseolus vulgaris*.) *J. Nutr.*, **94**, 203(1968)
15. Silano, V., Posrio, E. and Buonocore, V. : A model for the interaction of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors with α -amylase. *Mol. Cell. Biochem.*, **18**, 87(1977)
 16. Udupa, S. L., Prabhakar, A. R. and Tandon, S. : α -Amylase inhibitors in foodstuffs. *Food Chem.*, **34**, 95 (1989)
 17. Kim, J. K., Kim, J. W., Kim, H. W., Shim, M. J., Dhoi, 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. *Kur, J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 223(1985)
 18. Lee, K. S. and Yang, C. B. : Screening of oriental drugs for α -amylase inhibitor. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**, 644(1988)
 19. Moon, J. S., Bae, Y. I. and Shim, K. H. : Purification of α -amylase inhibitor from black bean in Korea. *J. Food Sci. Technol.*, **27**, 762(1995)
 20. Moon, J. S., Shin, C. S., Choi, J. S., Park, S. K. and Shim, K. H. : Purification of α -amylase inhibitor from naked barley in Korea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 556(1995)
 21. Frels, J. M. and Rupnow, J. H. : Characterization and two α -amylase inhibitors from black bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Food Sci.*, **50**, 72(1985)
 22. Blanco-Labra, A. and Iturbe-Chinas, F. A. : Purification and characterization of α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.*, **5**, 1(1981)
 23. Granum, P. E. : Purification and characterization of an amylase inhibitor from rye(*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.*, **2**, 103(1978)
 24. Baker, J. E. : Purification of an α -amylase inhibitor from wheat, *Triticum aestivum*, and its interaction with amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *Insect Biochem.*, **18**, 107(1988)
 25. Baker, J. E. : Interaction of partially-purified amylases from larval anagasta kuehniella(Lepidoptera : pyralidae) with amylase inhibitors from wheat. *Comp. Biochem. Physiol.*, **93B**, 239(1989)
 26. Shainkin, R. and Birk, Y. : α -Amylase inhibitors from wheat isolation and characterization. *Biochem. Biophys. Acta.*, **221**, 502(1970)
 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 α -amylase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **658**, 387(1981)
 28. O'Donnell, M. D. and McGeeney, K. F. : Purification and properties of an α -amylase inhibitor from wheat. *Biochem. Biophys. Acta.*, **422**, 159(1976)

(1998년 1월 10일 접수)