

大豆 品種別 Trypsin Inhibitor의 Fractionation과 耐熱性에 關한 研究

朴 正 隆 · 崔 愛 鈴

嶺南大學校 食品營養學科

Fractionation of Soybean Trypsin Inhibitors and Its Heat Stability

Jyung-Rewng Park and Ai-Ryung Choi

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam Univ.

Abstract

This experiment was conducted to fractionate the trypsin inhibitors and its heat stability of five varieties of soybean.

It was observed that water extractable protein of all varieties used was fractionated into three peaks and the second peak seemed to show trypsin inhibitor activity. (TIA).

The trypsin inhibitors were fractionated into four fractions-FI, FII, FIII and FIV.

FIII showed the highest TIA in Suwon No. 81, Suwon No. 82 and Suwon No. 83

In the case of Kyungnam No. 3 and Suwon No. 62, the highest activity was found in FIV.

When trypsin inhibitors fractionated in boiling water-bath for 20 min, the FIV showed the highest heat stability and FI was found to be the weakest.

序 論

옛날부터 우리의 食生活에 使用되어 온 大豆는 植物性蛋白資源으로 重要시되고 있으며 特히 近來에는 豆乳의 개발로 因해 大豆蛋白質의 섭취가 增加되고 있다. 그러나 蛋白質의 含量이 約 40% 程度로 높은 反面 大豆에는 proteinase inhibitor, hemagglutinin; saponin等, 이의 榮養價를 低下시키는 成分이 存在해 있다는 것은 이미 잘 알려져 있다.^{8,9)}

이中 特히 trypsin inhibitor는 Osborne과 Mendel¹²⁾의 研究에 依해 처음 밝혀진 後 여러 研究者들에 依해 自

然界의 分布^{4,12)}, 一般的 性質^{5,6,8,9)}, 分離 및 精製^{1,7,18,19)}, 生体에 미치는 영향²⁾, 加工中の 變化^{15,17)} 等이 研究되어 왔다.

發表된 報告¹⁴⁾에 依하면 trypsin inhibitor는 生大豆蛋白質의 利用을 低下시키는 主原因이 되며 動物實驗에 依해 30% 程度 成長率 低下와 60% 程度의 蛋白質効率을 低下시키는 要因이 되며 또한 輥장의 비대에 주 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다.

Proteinase inhibitor는 大豆蛋白質의 約 6%를 차지하며¹⁰⁾ 이中 trypsin inhibitor는 지금까지 5種 또는 이 以上의 서로 다른 inhibitor로 分離되었지만 alcohol

insoluble fraction인 Kunnitz inhibitor와 alcohol soluble 이며 acetone-insoluble fraction인 Bowman-Birk inhibitor에 關해서만 많은研究가 行해졌으며, 이 두 inhibitor의 主要한 差異點은 前者는 熱에 對해 比較的 不安定하며, 後者는 安定하다.

本 實驗은 韓國產 大豆 4品種中의 trypsin inhibitor를 fractionation하여 各 fraction에 對해 耐熱性의 差異를 살펴보기 為한 目的으로 試圖하였다.

材料 및 方法

1. 材料 및 試料調製

本 實驗에 使用한 大豆는 慶北 칠곡에 所在하는 農村振興院에서 栽培한 大豆 5品種 即 水原 62號, 81號 82號, 83號, 慶南 3號를 使用하였다.

試料의 調製는 Nakamura¹⁰⁾의 方法에 따라 依次 제거하고 80mesh sieve를 통과하도록 분쇄하여 n-hexane으로 5°~6°C에서 低溫脫脂한 後 Buchner funnel로 흡입여과하여 용매를 除去하고, 室溫에서 공기中에 건조 시켜 이것을 다시 100mesh sieve를 통과하도록 微粉했다.

水溶性 大豆蛋白質의 抽出은 Fig. 1에 나타난 方法에 따라 抽出하였다.

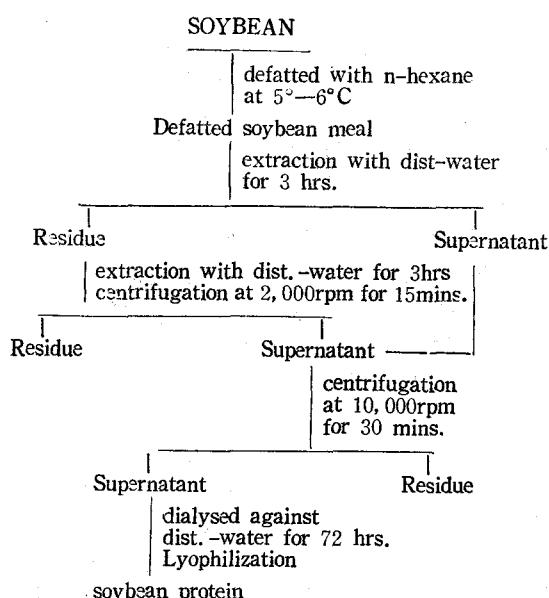


Fig. 1 Preparation of water extractable soybean protein

2. Gel Filtration의 條件

Gel의 調製: Sephadex G-75에 充分量의 중류수를 첨가해서 24時間동안 室溫에서 放置하여 完全히 膨潤시킨 後 potassium phosphate buffer(pH 7.6)용액으로 數回 decantation하여 column(Pharmacia Fine Chemical Ind., Sweden)내에 충진하였다.

Sephadex G-75에 依한 gel Filtration: 凍結乾燥한 試料 300~500mg을 potassium phosphate buffer 용액(pH7.6)5~10ml에 용해후 원심분리하여 上層액 2ml를 取하여 gel filtration하였다. 蛋白質은 Lowry等의 方法에 준하여 定量하였다.

gel filtration은 25×450mm의 column에 400mm의 gel bed를 製作해 Sephadex G-75를 써서 충진하였다. blue dextran을 통과시켜 column의 충진상태를 확인한 後 potassium phosphate 용액에서 평형화 시켰다.

sample은 流速 32~34 ml/hour, 溫度 4~7°C에서 filtration하였다. 溶出液은 fraction collector에서 3ml씩 一定하게 取하여 spectrophotometer를 使用하여 280nm의 O. D. 와 Trypsin Inhibitor Activity를 測定하였다.

3. Trypsin Inhibitor Activity(TIA)의 測定方法

Kunitz의 方法⁹⁾에 준하였다.

試料 0.5ml를 시험판에 取해 trypsin 용액 0.5ml를 加한 다음 casein 용액 1ml와 35°C에서 정확히 20分間 反應시킨 後 5% TCA 3ml를 加하여 反應을 정지시켰다. 내용물은 잘 混合한 後 실온에서 1時間放置後 여과하여 液을 280nm에서 O. D. 를 측정하였다. blank는 試料 0.5ml를 취한 後 TCA 용액 3ml를 加해 미리 反應을 정지시킨 後 trypsin 및 casein 용액을 加하였으며 control은 試料代身에 potassium phosphate buffer 용액을 使用하였다.

TIA의 表示는 아래 式에 따라 계산하여 試料 1ml內에 있는 trypsin의 저해된 量을 μg 으로 表示하였다¹⁰⁾

$$\text{TIA} = \frac{(C - C_B) - (S - S_B)}{C - C_B} \times a$$

C : control

S : sample

C_B : control blank

S_B : sample blank

a : trypsin $\mu\text{g}/\text{ml}$

4. 耐熱性 實驗의 條件

Fractionation한 各 fraction으로부터 3ml를 시험판(1.5×15cm)에 取하여 100°C에서 20分間 加熱처리 後 即時 冷却시켜 TIA를 측정하여 그 殘存活性을 求하였다.

結果 및 考察

1. Gel Filtration에 依한 品種別 Trypsin Inhibitor의 Fractionation

各品種에 있어서 column에 charge한 sample의 protein含量은 Table 1에서 보는 바와 같이 수원83호가 29.03mg/ml로 가장 많으며, 수원 81호가 24.25mg/ml, 수원 82호가 20.63mg/ml, 경남 3號가 19.44mg/ml의 순서이고, 수원 62호가 18.50mg/ml로 가장 적었다.

各大豆品種의 水溶性蛋白質을 gel filtration하여 얻은 fraction은 5品種 모두 3種의 peak가 나타났다.

이것은 日本產大豆의 蛋白 peak와 일치하였으며, 報告에 따르면 第1의 peak는 大豆의 主要蛋白質인 15S, 11S, 7S의 混合物이고, 第3의 peak는 核酸類似物質이다.¹¹⁾

TIA는 第2의 peak부근에 걸쳐 있고 각品種 모두 4개의 trypsin inhibitor fraction으로 나뉘어졌다.

수원81호는 3번째 fraction이 가장 높았으며(Fig. 2)

Table 1. Protein content of five different soybean varieties applied into gel filtration

Varieties	Suwon No. 62	Suwon No. 81	Suwon No. 82	Suwon No. 83	Kyungnam No. 3
Protein content*	18.50	24.25	20.63	29.03	19.44

* Expressed as mg/ml

수원82호는 4개의 거의 같은 分布를 나타내나 3번째 fraction이 넓게 나타났다(Fig. 3). 수원 83호는 다른品種보다 대체로 높게 나타났으며 3번째 fraction이 다른 fraction보다 훨씬 높고 넓게 나타났으며(Fig. 4), 경남 3호 및 수원62호는 fraction I, II, III이 서로 비슷하게 나타났고 fraction IV이 아주 높게 나타났다(Fig. 5, 6).

protein含量은 모두 fraction I이 가장 높았다(Table 3).

2. 品種別 各 Fraction의 TIA

gel filtration에서 분획한 4개의 fraction의 TIA는 다음과 같다(Table 2).

수원81호는 fraction IV가 517.4로 가장 많은 TIA를 나타냈고 다음 FII, FIII, FI의 순서로 각각 361.7, 343.0, 185.1이었다.

TIA는 protein mg當 저해된 trypsin μg 으로 表示되었을 때 수원82호는 81호처럼 FIV에서 가장 많은 TIA를 나타내 589.3이었고 다음 FIII, FII, FI의 순서였다.

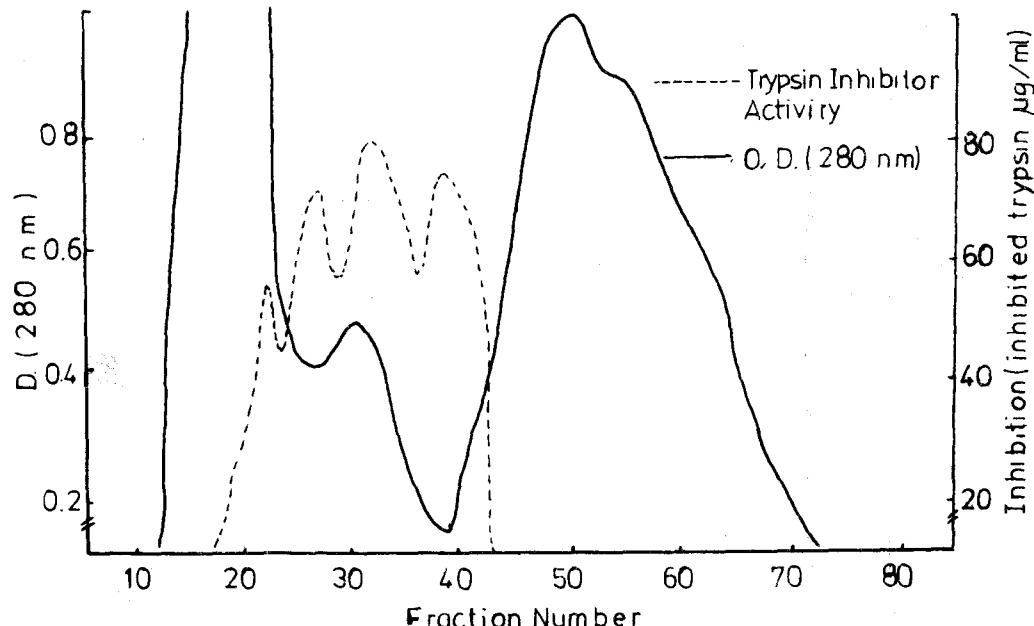


Fig. 2 Gel filtration of Suwon No. 81 on Sephadex G-75

Table 2. Protein content and trypsin inhibitor activity of each fraction in five soybean varieties.

Varieties	Fraction	Protein content (mg/ml)	TIA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	TIA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of Protein)
Suwon No. 81	I	387.6	71.7	185.1
	II	217.6	78.7	361.7
	III	225.0	77.2	343.0
	IV	150.0	77.6	517.4
Suwon No. 82	I	380.0	72.6	191.1
	II	216.0	77.4	358.3
	III	182.0	77.0	422.9
	IV	120.0	70.2	589.3
Suwon No. 83	I	402.5	79.9	198.5
	II	307.5	84.3	274.0
	III	172.5	89.2	517.3
	IV	77.5	87.2	1125.3
Kyungnam No. 3	I	381.5	57.6	150.9
	II	172.5	73.5	426.0
	III	182.5	77.7	426.9
	IV	87.5	77.3	883.1
Suwon No. 62	I	287.5	68.2	237.1
	II	122.5	68.7	561.0
	III	105.0	74.5	709.9
	IV	87.5	79.1	903.9

Table 3. Heat inactivation of fractionated trypsin inhibitor in five soybean varieties.

Varieties	Fraction	TIA before heating	TIA after heating	Remaining activity (%)
Suwon No. 81	I	185.1	10.1	5.45
	II	361.7	20.0	5.53
	III	343.0	19.3	5.64
	IV	517.4	86.9	16.80
Suwon No. 82	I	191.1	54.3	28.44
	II	358.3	195.2	54.50
	III	422.9	298.6	62.70
	IV	589.3	87.0	14.87
Suwon No. 83	I	198.5	33.3	16.77
	II	274.0	81.5	29.73
	III	517.3	141.6	27.38
	IV	1125.3	403.5	35.86
Kyungnam No. 3	I	150.9	—	—
	II	426.0	79.0	18.55
	III	425.9	66.4	15.06
	IV	883.1	294.3	33.33
Suwon No. 62	I	237.1	34.8	14.67
	II	561.0	74.2	13.23
	III	709.9	415.5	58.54
	IV	903.9	675.3	74.72

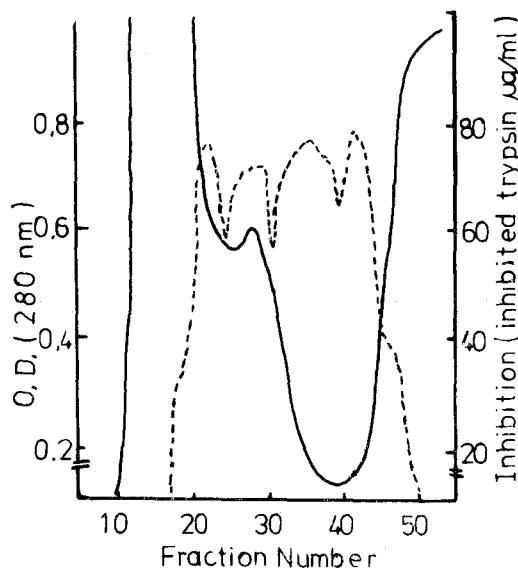


Fig. 3 Gel filtration of Suwon No. 82 on Sephadex G-75

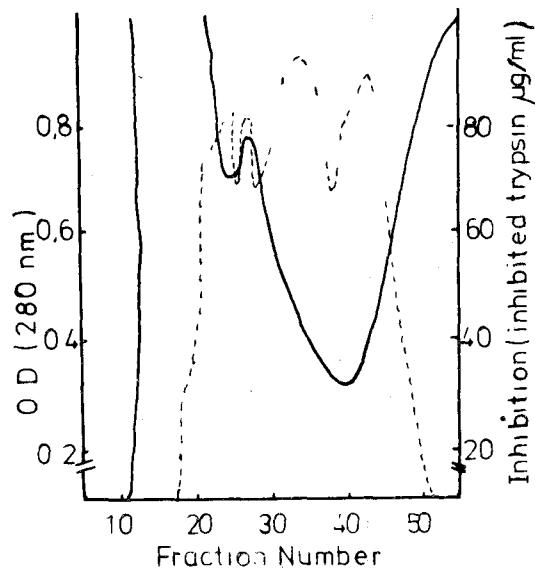


Fig. 4 Gel filtration of Suwon No. 83 on Sephadex G-75

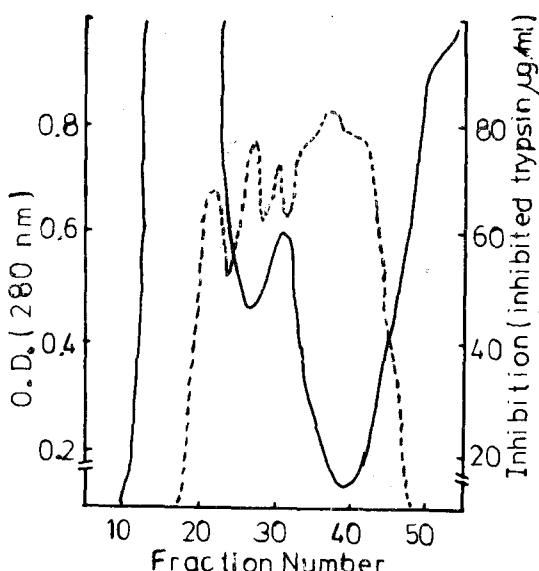


Fig. 5 Gel filtration of Kyungnam No. 3 on Sephadex G-75

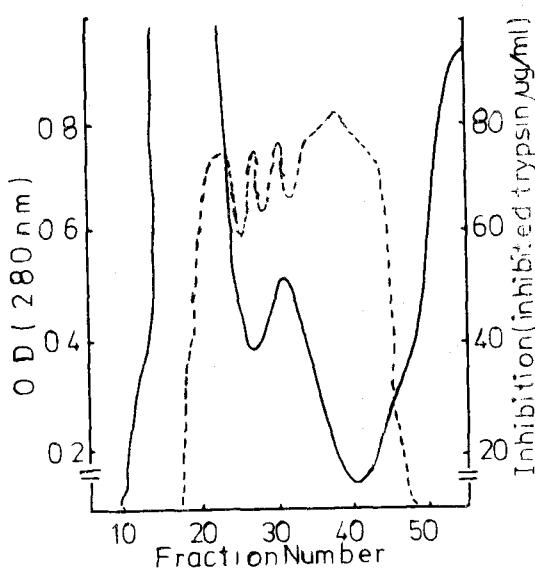


Fig. 6 Gel filtration of Suwon No. 62 on Sephadex G-75

수원83호와 경남3호는 모두 FⅣ이 가장 높은 TIA를 나타내 각각 1125.3과 883.1이었다.

수원62호는 FⅣ에서 가장 많은 TIA를 나타내 903.88이었고, 다음 FⅢ, FⅡ, FⅠ의 순서로 각각 710.0, 561.0, 237.1이었다.

3. 各 Fraction에 있어서 TI의 Heat Stability

Table 3에 나타난 바와 같이 加熱後 各 fraction에 있어서 수원81호는 FⅣ가 86.9로 16.80%의 残存活性을 나타냈고, FⅠ, FⅡ, FⅢ은 거의 비슷하게 残存活性을 나타내 각각 5.45, 5.53, 5.64%로서 다른 品種에

비해 대체로 낮은 殘存率을 나타냈다.

수원82호는 FⅢ가 298.6으로서 62.70% 殘存活性을 나타내어 가장 높게 나타났으며, FⅣ가 14.87%로서 가장 낮았다.

수원83호와 경남3호는 FⅦ가 35.86%와 33.3%로서 가장 강한 耐熱性을 나타냈고 경남3호의 FⅠ의 殘存活性은 完全히 소실되었다.

수원62호도 역시 FⅣ가 675.3으로서 74.72%의 殘存率을 나타내 가장 耐熱性이 강했다.

要 約

本 實驗은 韓國產 大豆 5品種(수원62호, 수원81호, 수원82호, 수원83호, 경남3호)의 水溶, 蛋白質을 gel filtration하여 trypsin inhibitor를 fractionation하여 大豆品種別 trypsin inhibitor의 pattern을 調査하고 또 이의 耐熱性을 살펴보기 위한 目的으로 시도하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

大豆의 水溶性 蛋白質을 抽出하여 sephadex G-75로 column chromatography하여 분획한 結果 3個의 peak를 얻었으며, TIA는 두번째 peak 부근에 걸쳐 있었고 trypsin inhibitor는 모두 4개의 fraction(FⅠ, FⅡ, FⅢ, FⅣ)으로 나뉘어졌으며, trypsin inhibitor pattern은 수원81호, 수원82호, 수원83호는 FⅢ의 TIA가 높았으며, 경남3호 및 수원62호는 FⅣ에서 높게 나타났다. gel filtration에서 分割한 4개의 fraction에 있어서蛋白質 mg當 TIA는 모두 FⅣ가 가장 높게 나타났으며 이 fraction의 耐熱性은 100°C에서 20分間 加熱處理를 기준으로 했을 때 대체로 수원81호가 가장 耐熱性이 약했으며 경남3호, 수원38호, 수원82호, 수원62호의 순서로 耐熱性이 강하게 나타났고 fraction별로는 수원82호를 제외하고는 모두 FⅣ가 가장 耐熱性이 강하게 나타났으며 대체로 FⅠ의 耐熱性이 약하였으며 경남3호의 FⅠ은 100°C 20分間 處理에서 完全히 소실되었다.

文 獻

- 1) Birk, Y. (1961): Biophys. Acta 54, 378
- 2) Bowthilet, R. I., W. L. Hunter, C. A. Luhman, D. Ambros and S. Lipkansky(1950): J. Poultry Sci. 29, 837
- 3) Colowick and Kaplan: Methods in Enzymology II, p. 32.
- 4) Ewart, J. A. D. (1973): J. Sci Food Agr., 24, 685
- 5) Frattali, V. and R. F. Steiner (1969): Anal. Biochem. 27, 285
- 6) Holm, H., K. Fossum and B. Eide(1973): J. Sci. Food Agr., 24, 333
- 7) Kunitz, M. (1945): Science, 101, 668
- 8) Kunitz, M. (1947): J. Gen. Physiol., 30, 311
- 9) Kwong, E., R. H. Barnes and E. Fiala(1962): J. Nutr., 77, 312
- 10) Nakamura, H., I. Kamoi, W. Tanimura and T. Obara (1975): 日本食品工業會誌, 22, 415
- 11) Obara, T., K. Kobayashi and Y. Watanabe (1970): Cereal Chem., 47, 597
- 12) Osborne, T. B. and L. B. Mendel(1917): J. Biol. Chem., 32, 369
- 13) Rackis, J. J. and R. L. Anderson (1964): Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 23
- 14) Rackis, J. J. (1965): Federation Proc., 24, 1488
- 15) Rackis, J. J. (1966): Food Technol., 20, 1842
- 16) Ryan, C. A. (1973): Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 1073
- 17) Son, H. S., J. R. Park and S. W. Lee(1977): J. Korean Agr. Chem. Soc., 20, 182
- 18) Steiner, R. F. and V. Frattali(1969): J. Agr. Food Chem., 17, 513