

하늘타리박의 뿌리로부터 분리 정제한 Trypsin Inhibitor들의 특성

박은주 · 윤두희 · 조은정* · 류병호 · 김희숙[†]

경성대학교 공과대학 식품공학과, *부산 보건환경연구소

Characterization of Trypsin Inhibitors Purified from *Trichosanthes kirilowii* Root

Eun Ju Park, Doo Hee Yun, Eun Jyung Cho*, Byung Hho Ryu and Hee Sook Kim[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungshung University

*Public Health Environment Institute of Pusan

Abstract

Two different trypsin inhibitors, TRTI-1 and TRTI-2, were purified to near homogeneity from *Trichosanthes kirilowii* root, by 0~90% saturated ammonium sulfate salting out, DEAE-Sephacel ion exchange chromatography, Sephadex G-50 gel filtration chromatography and trypsin-affinity chromatography. The molecular weight of TRTI-1 and TRTI-2 were estimated to be about 5,000 Da and 24,000 Da, respectively, by gel filtration and must be monomer and homodimer since they contain 4,000 Da and 10,000 Da each on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. TRTI-1 was stable after heating for at least 2 hr at 100°C but TRTI-2 was completely inactivated after heating for 10 min at 90°C. When Bz-dl-Arg-pNA was used as a substrate of TPCK-treated trypsin, half-maximal inhibitions of TRTI-1 and TRTI-2 were observed at 0.8 μM and 6 μM, respectively. Both TRTI-1 and TRTI-2 inhibited the hydrolysis of trypsin competitively and Km values were 0.97 μM and 0.63 μM, respectively. Both TRTI-1 and TRTI-2 specifically inhibited trypsin but they did not inhibit other proteases tested, chymotrypsin, papain, elastase, collagenase, thermolysin, Nagarase, pepsin, and thrombin.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*, TRTI-1, TRTI-2

서 론

Protease inhibitor들은 그들 작용기의 생화학적 특성에 따라 thiol, serine, carboxyl 및 metallo protease inhibitor들로 크게 4가지로 분류할 수 있고, 동·식물, 미생물 등에 광범위하게 분포되어 있으며 거의 단백질이다⁽¹⁾. Kassel⁽²⁾에 의하면 동 식물로부터 발견된 다수의 저해 물질은 모두 단백질이고, 이들 저해 물질은 산 및 열에 비교적 안정한 저분자(분자량 6,000~12,000)와 열에 불안정한 고분자(분자량 20,000~60,000)로 대별된다고 한다. Kunitz와 Northrop⁽³⁾에 의해 소 체장으로부터 trypsin-Kallikrein 저해 물질이 처음으로 분리된 이래 동 식물 조직에서 다수의 protease 저해 물질이 발견되었다. Protease 저해 물질의 상세한 생리적 기능은 아직 명확히 규명되지 않았지만 생체내에서의 주된 역할은 비정상적인 proteolysis를 방지하는 것으로 알려져 있다⁽⁴⁾. 혈장내에서 protease 저해 물질은 혈액 응고, 섬유소 분해, complement 및 kinin system과 밀접한 관련이 있는

것으로 알려졌으며 이들의 역할은 혈장내에 비정상적으로 증가한 protease와 결합하여 이를 불활성화시킨 다음 phagocytosis에 의해 분해됨으로써 혈장내의 protease양을 조절하고 또한 proenzyme의 활성화를 조절하는 것으로 알려졌다⁽⁵⁾. Protease 저해 물질은 생물체내에서 여러가지 생명현상에 관여하는 protease의 생물학적 기능을 분석하는데 유용하게 사용되며 여러 조직과 세포에 존재하는 protease의 유형 확인 및 affinity chromatography에서 특정 protease만을 분리하기 위한 ligand로 사용되기도 한다⁽⁶⁾.

본 실험은 protease 저해 물질의 생체내에서의 역할이 밝혀짐에 따라 그 중요성이 날로 커져가고 있는 실정 이므로 새로운 protease 저해물질을 개발하고자 우리나라 중남부에 야생하며 한방재료로 이용되는 식물인 하늘타리박(*Trichosanthes kirilowii*)의 뿌리인 팔루근(*Trichosanthis radix*)으로부터 trypsin inhibitor를 분리 정제하고 그 특성에 대해서 실험하였다.

재료 및 방법

재료

우리나라 중남부에 야생하며 박과에 속하는 다년생

Corresponding author: Hee-Sook Kim, Department of Food Science and Technology, Kyungshung University 110-1, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

덩굴식물인 하늘타리박(*Trichosanthes kirilowii*)의 뿌리인 팔루근(*Trichosanthis radix*)을 부산 한방 재료 시장에서 구입하여 사용하였다.

TR Trypsin Inhibitor의 추출, 분리 및 정제

팔루근 분말 1 kg에 2% NaCl 8 l를 가한 다음 4°C에서 8시간 동안 교반 추출한 후 10,000×g에서 20분간 원심하여 그 상등액을 얻고 침전물에 다시 2% NaCl 5 l를 가하여 8시간 교반하고 그 상등액을 얻어 합하였다. 이 추출물에 황산 암모늄을 90% 포화되게 천천히 교반하면서 가한 후 10,000×g에서 20분간 원심하여 0~90% 포화 침전물을 얻어 12시간 투석하여서(MWCO. 1,000) 그 상등액을 Amicon 한외 여과기(MWCO 3000)로 농축하였다. 농축한 crude inhibitor-용액을 DEAE-Sephacel column(4×30 cm)에 주입한 후 DEAE-Sephacel column에 결합되지 않는 물질은 tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 씻어내고 column에 결합되어 있는 물질은 0~1 M NaCl의 염농도 linear gradient를 행하였다. 이온교환수지 column에서 얻은 trypsin 저해 활성 분획 농축액을 Sephadex G-50 gel filtration column(2.5×70 cm)에 가하고 50 mM 중탄산 암모늄 완충용액으로 용출시켜 활성이 있는 획분을 모아 농축한 다음 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 평형 시켜 놓은 trypsin affinity column(bed volume 2 ml)에 결합한 trypsin inhibitor 획분을 50 mM citrate 완충용액(pH 3.0)으로 용출시켜 농축, TRTI(*Trichosanthis radix* trypsin inhibitor)라 칭하였다. 이때 사용한 trypsin affinity column은 Bio-Rad 사⁽⁷⁾의 방법으로 제조하였다.

순도 확인, 분자량 측정, 단백질 정량

Trypsin affinity chromatography에서 얻은 trypsin inhibitor 획분을 사용하여 Davis⁽⁸⁾ 등의 방법에 따라서 15% polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 그 정제 여부를 확인하였고, 분자량은 Andrews⁽⁹⁾의 gel filtration chromatography법과 Laemmli⁽¹⁰⁾의 SDS 함유 polyacrylamide 전기영동법으로 측정하였으며, 단백질은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Bradford 방법⁽¹¹⁾으로 595 nm에서 정량하였다.

TRTI들의 저해 활성 측정

TRTI(팔루근 trypsin inhibitor : *Trichosanthis Radix* Trypsin Inhibitor) 정제과정 및 반응에서 저해 활성은 10 mM CaCl₂ 함유한 0.1 M Tris-HCl 완충용액 1.1 ml, trypsin 용액(1 mg/ml in 5 mM HCl containing 5 mM CaCl₂) 0.03 ml, Inhibitor 용액 0.03 ml의 혼합액에 기질 Bz-dl-Arg-NA(5 mg/ml in dimethylsulfoxide) 0.1 ml를 섞은 후 37°C 항온조에서 10분 반응시키고 10% acetic acid 1 ml로 반응을 정지시킨 다음 410 nm에서 측정하였다. Inhibitor 저해능은 trypsin이 기질을 완전히 분해하였을 때에 대한 백분율로 나타내었다.

TRTI의 온도와 시간에 따른 안정성

TRTI를 37°C, 50°C, 70°C, 90°C, 100°C 등의 다양한 온도에서 10분, 30분, 60분 등으로 방치한 후 trypsin에 대한 저해 활성을 측정하고, inhibitor가 들어 있지 않는 대조군과 비교하였다.

TRTI의 농도에 따른 trypsin저해능

각각의 TRTI를 500, 250, 50, 25, 15 및 0.5 ng의 농도로 trypsin과 37°C에서 방치한 후 기질 Bz-dl-Arg-NA에 반응시켜 남아있는 저해 활성을 계산하였으며 다른 trypsin inhibitor의 저해능과 비교하기 위하여 상용화된 대두의 Bowman-Birk inhibitor(BBI)로도 실험하였다.

TRTI의 저해형(type) 결정

TRTI-1, TRTI-2가 어떤 type의 저해를 하는지 알아보기 위해 먼저 trypsin의 *p*-Nitroaniline(*p*NA)에 대한 가수 분해 반응 속도를 측정하였다. 즉, 기질 60 μM Bz-dl-Arg-*p*NA를 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 ml를 시험관에 넣고 3.3 μM trypsin 용액을 0.03 ml 가하여 위의 실험 방법대로 반응시킨 후 생성된 NA의 양을 410 nm에서 측정하고 그 반응 속도(10분 동안 1 ml의 반응 용액에서 생성된 *p*NA의 마이크로 몰수)를 구하였다. 기질의 농도를 몰농도 단위로 표시하고 Lineweaver-Birk 방법으로 도시하여 trypsin의 Bz-dl-Arg-*p*NA에 대한 V_{max}와 K_m값을 결정하였으며 TRTI의 저해형을 결정하기 위하여 정제된 TRTI를 trypsin과 반응시킨 후 여러 기질 농도에서 반응 속도를 측정하여 V_{max}와 K_m값을 구하였다.

각종 protease에 대한 TRTI의 저해도 측정

Serine protease인 chymotrypsin, elastase, Nagarse, thermolysin, thrombin과 metalloprotease인 collagenase 및 thiol protease인 papain 등에 대해 팔루근에서 정제한 TRTI가 저해능이 있는지 시험하기 위하여 기질로 casein (2% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5), Bz-dl-Arg-*p*NA, Bz-dl-Tyr-*p*NA 및 tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*NA 등을 사용하여 실험하였다. Casein을 기질로 사용한 경우, 기질, 완충용액, 효소, 저해제 등을 위 실험의 경우와 같이 각각 tube에 넣은 후 잘 섞어서 37°C 항온조에서 30분 동안 반응시킨 다음, 0.3 M trichloroacetic acid 2 ml를 가하고 1시간 동안 실온에서 방치하였다. 4000×g에서 20분 동안 원심분리하여 분해되지 않은 casein을 제거한 후 각각 상등액을 1 ml씩 취하여 0.5 M NaOH 2 ml와 phenol reagent 0.6 ml를 가하고 15분 동안 실온에서 방치한 후 578 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

TRTI의 분리 및 정제

TRTI를 분리 정제하기 위하여 팔루근으로부터 활성

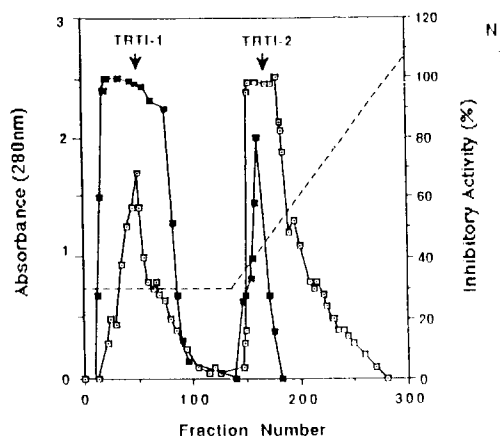


Fig. 1. DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography of *Trichosanthis radix* trypsin inhibitors. The inhibitor sample obtained by ammonium sulfate precipitation was applied on a DEAE-Sephacel column in Tris-HCl buffer (pH 7.4) and eluted with a linear gradient of NaCl (0~1 M in the same buffer) at a flow rate of 20 ml/hr

■—■; trypsin inhibitory activity, □—□; absorbance at 280 nm, ---; NaCl concentration

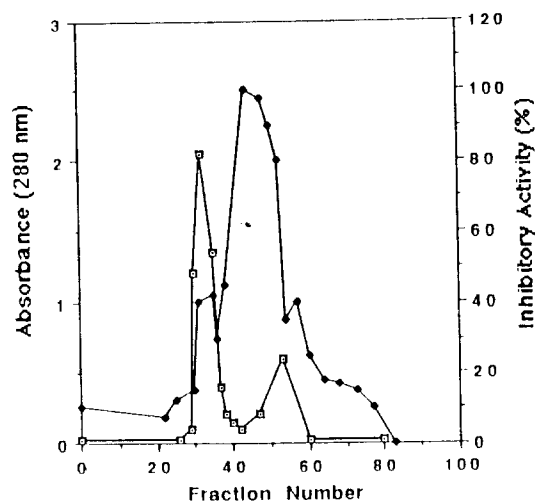


Fig. 3. Gel filtration chromatography of TRTI-2. The second inhibitor fraction obtained from DEAE-Sephacel was chromatographed on a Sephadex G-50 column as described for Fig. 2

■—■; trypsin inhibitory activity of TRTI-2, □—□; absorbance at 280 nm

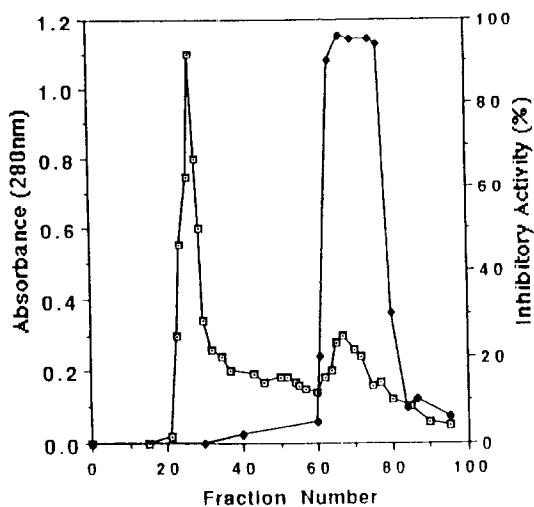


Fig. 2. Gel filtration chromatography of TRTI-1. The inhibitor fraction obtained from DEAE-Sephacel was chromatographed on a Sephadex G-50 column (2.5×70 cm) equilibrated with 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 7.5) at flow rate of 10 ml/hr

■—■; trypsin inhibitory activity of TRTI-1, □—□; absorbance at 280 nm

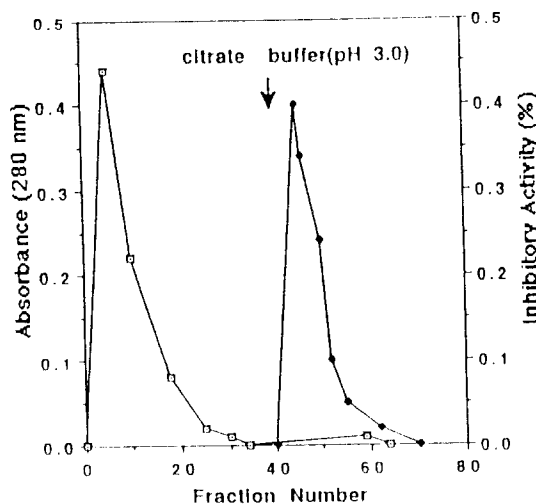


Fig. 4. Elution of TRTI-1 or TRTI-2 from the trypsin affinity column. This chromatography was carried on a trypsin affinity column (1 ml bed volume in 1×10 cm column) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). The active fraction was eluted by 50 mM sodium citrate buffer (pH 3.0)

■—■; trypsin inhibitory activity, □—□; absorbance at 280 nm

획분을 2% NaCl 용액으로 추출하고 고체황산암모늄으로 염석법을 행하였다. 0~90% 포화 황산암모늄 침전물을 DEAE-Sephacel 음이온 교환 chromatography, Sephadex G-50 gel filtration chromatography를 행한 결과 성질이

다른 두 trypsin inhibitor 획분들을 얻었다(Fig. 1~3). 저해 활성이 있는 분획들을 각각 다시 trypsin affinity column에 주입하고 결합된 단백질을 citrate 완충용액 (pH 3.0)으로 용출시켜, 정제된 TRTI-1, TRTI-2를 얻었다

Table 1. Purification of TRTI-1 and TRTI-2 from *Trichosanthes kirilowii* root

Sample	Procedure	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific activity (IU/mg protein)	Yield (%)	Purification ratio (fold)
Trichosanthis radix	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0~90%	12000	78500	6.5	100	1
TRTI-1 fraction	DEAE-Sephacel	289	42666	147.6	54.4	23
	Sephadex G-50 gel-filtration	14.7	5341	363.3	6.8	56
TRTI-2 fraction	Trypsin-Affigel	0.85	1215	1429.4	1.5	220
	DEAE-Sephacel	2142.2	18461	8.618	23.5	1.3
	Trypsin-Affigel	1.8	1300	722.2	1.6	111

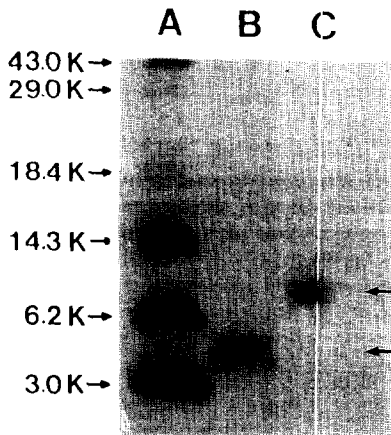


Fig. 5. SDS-polyacrylamide (20%) gel electrophoresis of TRTI-1 and TRTI-2 from *Trichosanthis radix*
 A; Standard proteins, B; TRTI-1, C; TRTI-2

(Fig. 4). 이렇게 여러 chromatography 방법으로 TRTI를 분리 정제한 결과는 Table 1과 같으며 TRTI-1은 220배 TRTI-2는 111배가 정제되었다. TRTI-1과 TRTI-2를 전기영동한 결과는 Fig. 5와 같으며 각각 하나의 주된 밴드가 나타났다.

분자량

TRTI-1과 TRTI-2의 분자량은 Sephadex G-50 gel filtration를 행한 결과 각각 5,000 Da과 24,000 Da으로 나타났다(Fig. 6) SDS-PAGE 전기영동 결과는 Fig. 7에서와 같이 subunit의 분자량이 TRTI-1은 4,000 Da TRTI-2는 10,000 Da으로 나타났으므로 TRTI-1은 약 4,000 Da의 subunit으로 구성되어 있는 monomer, TRTI-2는 10,000 Da의 subunit로 된 homodimer임을 알 수 있었다.

온도에 대한 안정성

TRTI-1과 TRTI-2의 분자량은 Sephadex G-50 gel filtration를 행한 결과 각각 5,000 Da과 24,000 Da으로 나타났을 때에도 저해능은 변하지 않아 아주 안정한 단백질로 생각된다. TRTI-2의 저해능은 70°C까지는 안정하였으나 80°C부터 저해능이 떨어지기 시작하면서 100

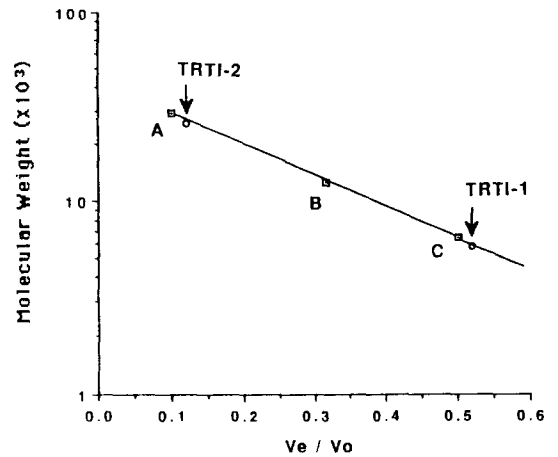


Fig. 6. Molecular weight estimation of TRTI-1 and TRTI-2 by Sephadex G-50 gel filtration chromatography

A: carbonic anhydrase (29,000), B: cytochrome c (12,400), C: aprotinin (6,500)

°에서 10분이상 가열시에는 저해 활성도가 완전히 소실되었다(Fig. 8).

Bradbury 등 쌀의 trypsin inhibitor가 70°C에서는 저해 활성도에 변화가 없었으나 90°C에서 10분 가열시 저해 활성도가 감소하기 시작하여 1시간 이상 가열하면 저해 활성도가 거의 소실되는 것으로 나타났다. 꿀은 물에서 giant taro의 trypsin inhibitor가 불활성되는 데는 30분, taro trypsin inhibitor와 giant swamp taro trypsin inhibitor는 10~20분 걸린다고 보고하였다⁽¹²⁾. Chung 등은 *E. coli*에서 정제한 protease inhibitor가 100°C에서 30분 동안은 안정하다고 보고하였다⁽¹³⁾.

정제된 TRTI의 농도에 따른 저해능

일정 농도의 trypsin에 TRTI-1, TRTI-2 및 soybean BBI의 농도를 증가시키면서 저해능을 측정된 결과 1 mg/ml trypsin 활성에 대하여 50% 저해능을 나타내는 농도는 TRTI-1의 경우 3.6 ng(0.8 μM), TRTI-2는 155 ng (6 μM)이었으며, BBI는 30 ng(4 μM) 이었다. TRTI-1의 저해능은 TRTI-2보다는 7.5배 soybean BBI보다는 5배

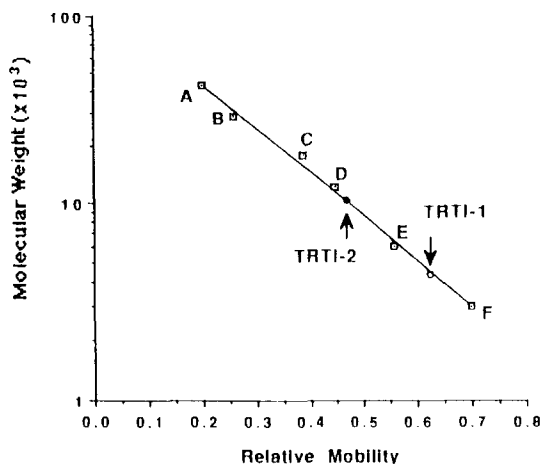


Fig. 7. Molecular weight estimation of TRTI-1 and TRTI-2 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A: ovalbumin (43,000), B: carbonic anhydrase (29,000), C: β -lactoglobulin (18,400), D: lysozyme (14,300), E: bovine trypsin inhibitor (6,200), F: insulin (α & β) (3,000)

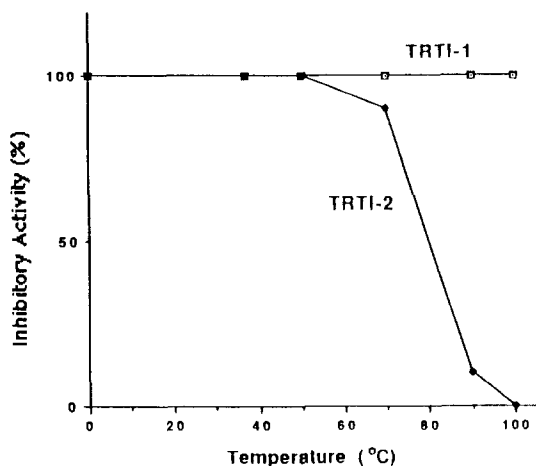


Fig. 8. Thermal stability of the purified TRTI-1 and TRTI-2. After TRTI-1 and TRTI-2 solution had been incubated at various temperature 10 min at pH 7.4, the remaining inhibitory activities for trypsin were measured

정도 강하게 나타났다(Fig. 9).

Yano 등⁽¹⁴⁾은 *Streptomyces* sp.에서 분리 정제한 protease inhibitor가 trypsin을 50% 저해하는데 필요한 농도는 6.9×10^{-10} M이고, Chung 등⁽¹³⁾은 *E. coli*에서 정제한 pancreatic protease inhibitor가 trypsin을 50% 저해하는데 필요한 농도는 22 nM이었다고 보고한 바 있다.

TR Trypsin inhibitor들의 저해형 결정

Bz-dl-Arg-pNA에 대한 trypsin의 가수 분해에 있어

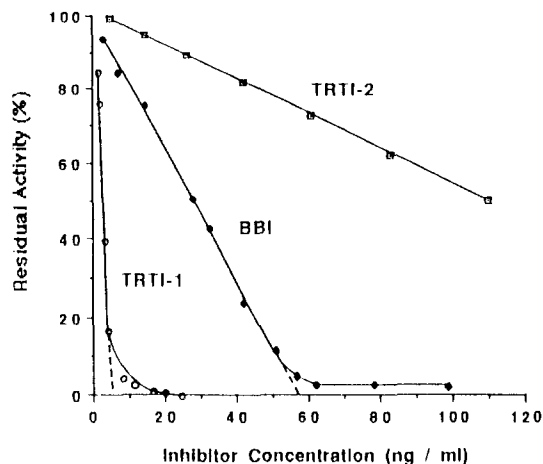


Fig. 9. Titration curve of TPCK treated-trypsin with purified TRTI-1, TRTI-2 and commercial soybean BBI. After a fixed amounts of trypsin (1 mg/ml 5 mM HCl) was mixed with increasing amounts of TRTI-1, TRTI-2 and BBI, the residual enzyme activity was measured with Bz-dl-Arg-pNA as a substrate at 37°C and pH 8.0

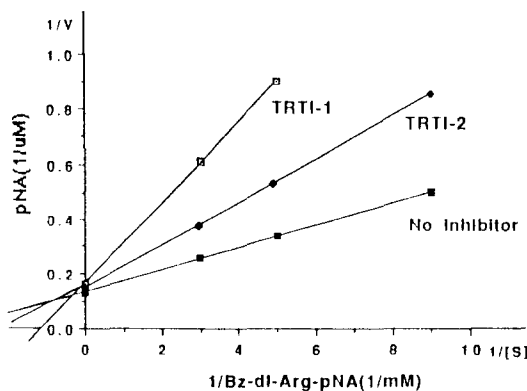


Fig. 10. Inhibition of *p*-nitroaniline formation by TRTI-1 and TRTI-2. Concentration of used TPCK treated-trypsin was 3.3 μ moles

저해제가 없을 때 V_{max} 는 8.07 μ M/10 min이었고 K_m 값은 0.37 μ M이었으며, 1.0 μ M의 TRTI-1과 12.70 μ M의 TRTI-2가 존재할 때 V_{max} 값은 각각 6.28과 7.69 μ M/10 min이었고 K_m 값은 0.97 및 0.63 μ M로 나타났다. 이 실험 결과로부터 $1/V_{max}$ 이 완전히 일치하지는 않았지만 거의 비슷함을 보임으로써 경쟁적 저해를 하는 것으로 추정할 수 있고 TRTI-1이 TRTI-2보다 trypsin 활성화에 대한 경쟁적 저해도가 큰 것으로 나타났다(Fig. 10).

각종 protease에 대한 TRTI의 저해능

여러 protease에 대한 TRTI-1과 TRTI-2의 저해능을

Table 2. Effects of TRTI on various protease

Protease (1 mg/ml)	Substrate	Inhibitors	
		TRTI-1	TRTI-2
Trypsin	2% Casein	100%	100%
Chymotrypsin	〃	no inhibition	no inhibition
Collagenase	〃	〃	〃
Nagarase	〃	〃	〃
Papain	〃	〃	〃
Pepsin	〃	〃	〃
Thermolysin	〃	〃	〃
Elastase	〃	〃	〃
Trypsin	Bz-dl-Arg-pNA	100%	100%
Pepsin	〃	no inhibition	no inhibition
Chymotrypsin	Bz-dl-Tyr-pNA	〃	〃
Thrombin	Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA	〃	〃

The concentrations of TRTI-1 and TRTI-2 were 1.0 μ M and 12.7 μ M respectively

조사하기 위하여 기질로 2% casein, Bz-dl-Arg-pNA, Bz-dl-Tyr-pNA 및 Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA를 사용하여 실험한 결과는 Table 2와 같다. TRTI-1 및 TRTI-2는 실험에 사용한 protease들 중 trypsin만을 저해하는 것으로 나타났다.

Yano 등⁽¹⁴⁾은 *Streptomyces* sp.에서 분리 정제한 protease inhibitor가 trypsin과 tissue-plasminogen activator만을 특이하게 저해한다고 하였고 Ctung 등⁽¹³⁾은 *E. coli*에서 분리 정제한 pancreatic protease inhibitor들은 trypsin 이외에도 chymotrypsin, elastase, rat mast cell chymase, human serosal urokinase 등을 저해한다고 보고하였다.

요 약

하늘타리박의 뿌리인 팔루근에서 분리 정제한 trypsin inhibitor는 TRTI-1과 TRTI-2 두 종류였으며, gel-filtration과 SDS-PAGE 전기영동에서 얻은 결과로부터 TRTI-1은 4,000~5,000 Da의 분자량을 가진 monomer이며 TRTI-2는 20,000~24,000 Da의 분자량을 가진 homodimer임을 알 수 있었다.

온도의 안정성에 있어서는 TRTI-1은 100°C에서 2시간 이상 안정하였으며, TRTI-2는 0~70°C의 온도에서는 안정하였으나 80°C에서부터는 안정성이 떨어지면서 100°C에서는 저해능이 완전히 소실되었다.

Trypsin 활성에 대해서 TRTI-1, TRTI-2 및 상품화된 soybean BBI의 농도에 따른 저해능을 보면 TRTI-1, TRTI-2 및 soybean BBI의 각각의 농도가 0.8 μ M, 6 μ M, 4 μ M일 때 1 mg/ml의 trypsin을 50% 저해하였으며, trypsin의 반응속도에 대한 TRTI의 저해 실험에서 TRTI-1과 TRTI-2 모두 trypsin의 가수분해를 경쟁적으로 저해하였으며 K_m 값은 저해제가 없는 경우 0.37 μ M에 대해 각각 0.97, 0.63 μ M이었다. 여러 protease에 대한 TRTI-

1과 TRTI-2의 저해능 실험 결과 elastase, pepsin, Nagarase, papain, thermolysin, chymotrypsin, thrombin 및 collagenase 등은 저해하지 못하였고 trypsin만을 특이하게 저해하였다.

문 헌

1. Toshi, A., Fumio, I., Isamu, T., Misao, T., Kimikazu, I. and Fumio, I.: Purification and Characterization of a Bowman-Birk Type Proteinase Inhibitor from Faba Beans (*Vicia Faba* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 55(3), 703-713(1991)
2. Kassell, B.: Naturally Occurring Inhibitors of Proteolytic Enzymes. *Methods in Enzymology part B*, 45, 839-906(1976)
3. Kunitz, M. and Northrop, J.H.: Inactivation of Crystalline Trypsin. *J. Gen. Physiol.*, 17, 591-615(1934)
4. Laskowski, M.J. and Kato, I.A.: Protein Inhibitors of Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 593-602(1980)
5. Fritz, H., Seemuller, V. and Tscheche, H.: Proteinase and Their Inhibitors, In "Methods of Enzymatic Analysis Vol. 55", General review (1984)
6. Aoyagi, T., Umezawa, H., Tkida, T. and Shiba, T.: *John W. & sons, Bioactive Peptides Produced by Microorganisms*. New York, (1978)
7. Protocol of Life Science Research Products, Bio-Rad Co.(1991)
8. Davis, B.J. and Ann, N.Y.: Disc Electrophoresis-II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Acad. Sci.*, 121, 404-427(1964)
9. Andrews, P.: The Gel Filtration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weight over a Wide Range. *Biochem. J.*, 96, 595-606(1965)
10. Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685(1970)
11. Bradford, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal.*

- Biochem.*, 72, 248-254(1976)
12. Bradbury, H.J., Brendon, C.H. and Sugani, I.: Heat Stability of Trypsin Inhibitors in Tropical Root Crops and Rice Its Significance for Nutrition. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 95-100(1992)
13. Chin-Ha, C., Harlan, E.I., Sheri, A. and Alfred, L.G.: Purification from *Escherichia coli* of a Periplasmic Protein That is a Potent Inhibitor of Pancreatic Pro-
teases. *J. Biol. Chem.*, 258(18), 11032-11038(1983)
14. Yano, T., Shimizu, A., Saito, Y., Iinuma, H., Takeuchi, T., Umezawa, H. and Inada, Y.: A Specific Protease Inhibitor from *Streptomyces*. *Chem. Pharm. Bull.*, 34 (9), 3936-3939(1986)
-
- (1993년 11월 26일 접수)