

경합 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay에 의한 대두 및 대두가공제품 중의 Bowman-Birk Protease Inhibitors의 함량 분석

홍희도* · 김성란 · 손동화 · 김수일¹

한국식품개발연구원, 서울대학교 응용생물화학부

초 록 : 대두가공제품 중에 존재하는 Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI) 함량을 protease 저해활성 측정 및 경합 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)로 살펴보았다. 항체제조를 위한 BBPI는 ion exchange chromatography와 전기영동 후 gel slicing 방법으로 시판 soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor로부터 순수, 분리하였다. 순수분리한 BBPI를 면역원으로 rabbit anti-BBPI antibody를 조제하였으며 단백질 농도별 titration방법으로 BBPI에 비교적 선택적으로 결합하는 항체를 확인하였다. 이를 이용한 경합 ELISA 방법으로 BBPI를 정량하기 위한 표준 정량곡선을 작성하였으며 시료용액중의 BBPI 함량이 0.03~30 µg/ml 범위일 경우에 정량적인 분석이 가능하였다. 대두품종별 chymotrypsin 저해활성은 8,462~12,428 U/g이었으며 BBPI 함량은 482~692 mg% 이었다. 시판 대두 가공제품 중에서 5종의 콩나물은 건물량 기준으로 10,695~13,249 U/g의 chymotrypsin 저해활성과 529~803 mg%의 BBPI 함량을 나타내었으며 일부 두부제품에서도 68.9 mg% 정도의 BBPI가 검출되었다. 그 밖의 두유, 된장, 고추장 및 간장 등의 대두발효식품, 탈지대두박 등에서는 chymotrypsin 저해활성 및 BBPI가 거의 검출되지 않았다. (1999년 6월 23일 접수, 1999년 8월 25일 수리)

서 론

대두(*Glycine max* L.)는 우수한 식물성 단백질원으로서 전세계적으로 식용 또는 사료로 널리 이용되어 왔다.¹⁾ 우리나라에서는 오래전부터 삶은 콩, 콩밥 등으로 조리하거나 콩나물, 두유, 두부 및 된장, 간장 등의 전통 발효식품으로 가공하여 섭취해 왔으며 콩기름, 농축 또는 분리 대두단백질 등으로 가공되어 이용되고 있다. 최근 들어 대두의 영양학적 가치 뿐만 아니라 대두가 지닌 다양한 생리활성에 대한 관심도 날로 커지고 있다. 특히 대두의 항암활성에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며 이러한 항암활성을 나타내는 성분으로는 isoflavone, Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI)와 같은 protease inhibitor, phytic acid, saponin, peptide류 및 polyphenol류 등이 알려져 있다.²⁾ 그 중에서도 protease inhibitor는 오래 전부터 항 영양인자로 알려져 왔으나 최근 들어 대두 protease inhibitor 중에서도 BBPI의 항암활성이 보고되면서 외국에서는 이에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.³⁾ 또한 이러한 항암활성은 주로 BBPI의 chymotrypsin 저해활성에 기인하는 것으로 보고되었다.^{3,4)}

초기에 대두 종실내에서 항영양인자로 알려진 protease inhibitor의 경우 크게 Kunitz trypsin inhibitor(KTI)와 Bowman-Birk protease inhibitor(BBPI)로 나눌 수 있으며 항암활성을 가진 것으로 알려진 BBPI는 71개의 아미노산으로 구성된 단일 펩타이드로서 분자량은 약 8000 정도이고^{5,6)} 7개의 disulfide bond를 형성하고 있어 열이나 산, 알칼리 등에 안정하며 trypsin

만을 저해하는 KTI와 달리 trypsin 과 chymotrypsin을 저해하는 두 개의 독립된 활성부위를 가지고 있어 trypsin 저해활성에 대한 chymotrypsin 저해활성의 비가 1.0인 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 국내의 경우 대두 protease inhibitor에 관한 연구는 주로 항영양인자로서의 trypsin inhibitor에 관한 것이 대부분을 차지하고 있으며 이러한 protease inhibitor의 함량과 활성을 구명하기 위하여 대개 trypsin 저해활성만을 측정하고 있다. 반면 BBPI나 그 항암활성에 관한 연구는 매우 미미하여 단지 일부 연구자들만이 생화학적 관점에서 국내산 대두 품종별 BBPI 함량 비교 및 cysteine 함량과 BBPI 함량의 상관관계 구명,⁷⁾ 대두 품종별 BBPI 및 isoinhibitor들의 분리 및 정제,⁸⁾ BBPI나 그 isoinhibitor들의 유전자 cloning 에 관한 연구^{9,10)}를 수행했을 뿐이며 식품학적인 관점에서 BBPI에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. 대두 중의 BBPI 함량을 측정하는 방법으로는 casein 이나 BAPNA, BTPNA 등을 기질로 하여 trypsin 또는 chymotrypsin의 저해 활성을 측정하는 효소적 방법을 일반적으로 이용하여 왔으나^{11,12)} BBPI와 함께 대두 중에 존재하는 Kunitz trypsin inhibitor(KTI) 또한 이들 protease에 대해서 저해활성을 나타내므로 선택적으로 BBPI 함량을 측정하기에는 다소 부적합하다.¹³⁾ 따라서 현재에는 KTI 또는 BBPI의 monoclonal 또는 polyclonal 항체를 제조하여 이를 대두 종실 및 대두 가공식품 중의 BBPI 함량 측정은 물론이고 가열처리와 같은 가공공정중의 함량변화를 살펴보기 위한 면역학적인 정량분석에 이용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾

따라서 본 연구에서는 순수 분리한 표준 BBPI를 면역원으로 항체를 조제하였으며 이를 이용한 효소면역학적 방법과 기존의 chymotrypsin 저해활성 측정 등을 통하여 국내에서 시판되고 있는 대두 가공제품 중의 BBPI 함량을 정량, 비교해 보고자 하

찾는말 : 대두, 대두가공제품, Bowman-Birk protease inhibitor, chymotrypsin 저해활성, competitive ELISA

*연락처

였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

대두 12 품종은 농촌진흥청 작물시험장 또는 밀양작물시험장에서 제공받거나 시중에서 구입한 후 40 mesh 정도로 분쇄하여, 대두 가공제품들은 시중에서 구입한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다. 항체제조용 표준 BBPI의 분리 정제를 위한 soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor(SBBPI), trypsin 및 chymotrypsin 저해활성 측정을 위한 trypsin, chymotrypsin 등의 효소류, N- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide, N-benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide 등의 기질, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, coomassie brilliant blue R 등의 전기영동 시약 및 DEAE-cellulose 등은 Sigma사(USA)의 것을 사용하였다. 면역학적 분석을 위한 시약으로 Freund's complete adjuvant와 incomplete adjuvant, phosphate buffered saline(PBS), Tween 20, phosphate-citrate buffer(PCB), Trizma pre-set crystal(pH 9.0), goat anti-rabbit IgG-HRP(horse raddish peroxidase) conjugate, sodium azide는 Sigma사(USA)의 것을, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine dihydrochloride (TMB)은 Pierce사(USA)의 것을 사용하였다. 실험동물로 사용한 토끼는 New Zealand White종으로 계통과학(유성)에서 4주령된 암컷을 면역하기 일주일전에 구입하여 사용하였으며, microtiter plate는 Nunc사(Denmark)의 MaxisorpTM(#446612)을, microplate reader는 Molecular Devices사(USA)의 THERMOmaxTM을 사용하였다.

추출

동결건조한 시료 약 0.5 g을 적당한 추출용기에 옮긴 후 0.25% 황산용액 20 ml를 첨가하고 25°C의 항온 진탕 추출기에서 1시간 동안 추출하였다. 이후 2,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻어진 상정액을 chymotrypsin 저해활성 측정을 위한 시료로 사용하였으며, 이를 다시 PBST(phosphate buffered saline-Tween 20)를 이용하여 20배 정도 희석하여 경합 ELISA에 의한 BBPI 함량 측정에 사용하였다.

Protease 저해활성

Trypsin 저해활성: 시료 추출물을 20 mM CaCl₂를 포함한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.2)로 희석하여 1.92 ml로 하고 여기에 50 μ l trypsin용액(0.25 mg/ml in 0.001 N HCl)을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 기질로 N-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide(BAPNA)용액 (20 mg/ μ l in DMSO) 0.3 ml를 첨가하고 37°C에서 정확하게 10분간 반응시킨 후 30% acetic acid 용액 0.5 ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 시료용액 대신 buffer를 첨가하고 BAPNA용액 첨가 전에 30% acetic acid 용액을 첨가한 것을 blank로 하여 410 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 시료용액 대신 buffer를 첨가한 것을 reference로 하여 아래 식에 따라 % trypsin 저해활성(%T.I.A.)를 계산하였다.

$$\%T.I.A. = [1 - (A_{410} \text{ of sample} / A_{410} \text{ of reference})] \times 100$$

Trypsin 저해활성 1 unit는 1 μ g의 trypsin를 저해하는, 즉 8% T.I.A.를 나타내는 inhibitor의 양으로 하였다.

Chymotrypsin 저해활성: 시료 용액을 20 mM CaCl₂를 포함한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.2)로 희석하여 1.92 ml로 하고 여기에 50 μ l chymotrypsin용액(0.5 mg/ml in 0.001 N HCl)을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 상온에서 10분간 방치하였다. 이후 기질로 N-benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide 용액(1.33 mg/ml in DMSO) 0.3 ml를 첨가하고 37°C에서 정확하게 10분간 반응시킨 후 30% acetic acid 용액 0.5 ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이후 %T.I.A.와 동일한 방법에 따라 % chymotrypsin 저해활성(%C.I.A.)을 계산하였다.

Chymotrypsin 저해활성 1 unit는 1 μ g의 chymotrypsin를 저해하는, 즉 4% C.I.A.를 나타내는 inhibitor의 양으로 하였다.

DEAE-cellulose ion exchange chromatography

DEAE-cellulose를 76 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)에 현탁시켜 상층의 불순물을 제거하고 2.6×10 cm column에 충전시킨 후 시료 50 mg을 5 ml의 상기 buffer에 녹여 column에 주입하였다. 용출은 상기 buffer 200 ml로 결합하지 않은 단백질 등을 제거한 후 상기 buffer 150 ml과 0.2 M NaCl을 포함하는 상기 buffer 150 ml로 0~0.2 M NaCl linear gradient를 만들어 행하였다. 용출속도는 10.5 ml/hr이었으며 3.5 ml씩 분획하여 280 nm에서의 흡광도와 chymotrypsin 저해활성을 측정한 후 각 peak의 분획을 모아 4°C 증류수에서 3일간 투석 후 동결건조하였다.

Native-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

Native-PAGE는 10% acrylamide 농도의 vertical type gel과 0.05 M Tris-0.384 M glycine buffer를 이용하여 수행하였다. 시료의 주입량은 5~10 μ l이었으며 20~25 mA에서 2시간 정도 전개하였다. 전개가 끝난 gel은 0.2% coomassie brilliant blue R(in methanol: acetic acid: H₂O=4.5:1:4.5, v/v/v)용액에 침지시켜 30분 정도 잘 흔들어 주면서 발색시켰고 methanol: acetic acid: H₂O(1:1:8, v/v/v)용액에 옮겨 단백질 band가 아닌 부분을 탈색시켰다.

Rabbit anti-BBPI antibody 제조

4주령 된 New Zealand White 종 암토끼 3마리를 사용하였으며 DEAE-cellulose ion exchange chromatography와 전기영동 후 band slicing 등으로 순수 분리한 BBPI를 1 mg/ml 농도가 되게 10 mM PBS buffer(pH 7.4)에 녹인 다음 중합시키고 동량의 Freund's adjuvant와 잘 혼합하여 유탁액을 만들어 토끼의 피하에 각각 6 군데씩 나누어 주사하였다. 면역는 2주 단위로 실시하였으며 면역 후 1주일 경과시에 일정량의 혈액을 토끼의 귀에서 채혈하여 anti-BBPI antibody의 생성을 확인하였다. 최종적으로 heart puncture 방법으로 혈액을 채취하였으며 항혈청은 상온에서 응고시킨 혈액을 4°C에서 하룻밤 보관한 후 상층부의 혈청 부분만을 분리하여 얻었다. 분리한 항혈청은 sodium azide를 최종농도가 0.02%가 되게 첨가하고 적정량씩 분취하여 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

경합 ELISA 에 의한 정량

BBPI를 coating시킨 microplate well에 적정 농도로 희석한 표준 BBPI 용액 50 μ l와 1/5000로 희석된 항혈청을 50 μ l씩을 각각 분주하고 상온에서 1시간 방치하여 coating된 BBPI와 첨가된 BBPI간의 항체에 대해 경쟁적 결합을 유도하였다. 이후 washing buffer(PBST)로 3회 세척하여 반응하지 않은 표준 BBPI를 제거하였다. 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG-HRP를 1/10000로 희석하여 100 μ l씩 첨가하고 상온에서 1시간 방치하여 항체와 반응시켰으며 이후 washing buffer(PBST)로 3회 세척하여 반응하지 않은 2차항체를 제거하였다. 기질로 TMB용액을 100 μ l씩 첨가하여 30분간 반응시키고 2 M 황산용액을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 측정된 흡광도로부터 BBPI를 첨가하지 않은 것을 reference로 하여 아래와 같이 저해율(% inhibition)을 계산한 다음 BBPI 첨가농도별 저해율을 도식화하여 시료중의 BBPI 함량 계산을 위한 표준곡선으로 나타내었다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{450} \text{ of sample solution}}{A_{450} \text{ of reference}} \times 100$$

표준용액 대신 시료 용액 50 μ l을 첨가하여 반응시켜 흡광도를 측정하고 %저해율을 계산한 다음 앞서 작성한 표준 정량 곡선으로부터 시료중의 BBPI 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

표준 BBPI의 분리 및 정제

Soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor(SBBPI)를 DEAE-cellulose column에 주입하고 chromatography 한 다음 280 nm에서의 흡광도와 chymotrypsin 저해활성을 측정해 본 결과는 Fig. 1과 같다.

280 nm에서 측정된 단백질 함량 기준으로 크게 3개 정도의 peak로 나누어 졌으나 세번째 peak를 다시 두 부분으로 나누어 Fr. I-IV 까지 총 4개의 분획을 얻었다. 이 중에서 Fr. III과 IV의 chymotrypsin 저해활성이 높게 나타나 이들 분획이

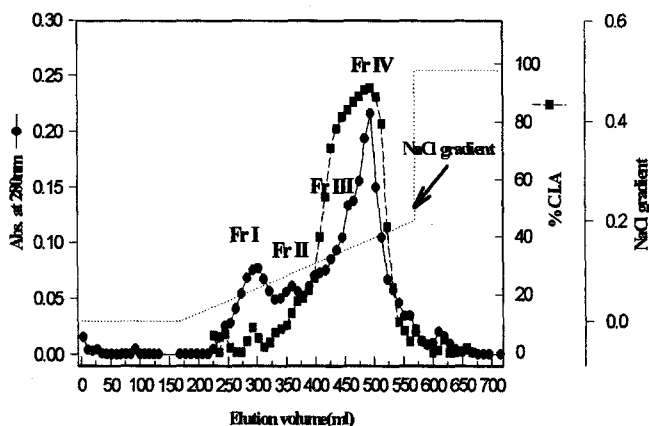


Fig. 1. DEAE-cellulose ion exchange chromatogram of SBBPI. Column: 2.6 \times 10 cm, eluent: 76 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6), gradient: 0-0.2 N NaCl linear gradient, flow rate: 10.5 ml/hr, fraction volume: 3.5ml, ●: absorbance at 280 nm, ■: C.I.A., ...: salt gradient.

Table 1. Protein contents and specific protease inhibiting activities of SBBPI and fractions separated on DEAE-cellulose

Fraction	Protein contents(mg)	Specific protease inhibiting activity(U/mg)		
		T.I.A. ¹⁾	C.I.A. ²⁾	C.I.A.
SBBPI ³⁾	100.0	4780.9	1882.3	2.5
Fr. I	2.4	5186.3	323.4	16.0
Fr. II	7.5	5166.4	341.0	15.1
Fr. III	17.9	5130.8	1893.6	2.8
Fr. IV	43.2	4944.7	3177.0	1.6

¹⁾T.I.A.: Trypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 μ g of trypsin for 10 min at 37 $^{\circ}$ C.

²⁾C.I.A.: Chymotrypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 μ g of chymotrypsin for 10 min at 37 $^{\circ}$ C.

³⁾Soybean Bowman-Birk inhibitor purchased from Sigma Co.

BBPI를 포함하는 주요 분획인 것으로 생각되었다.

DEAE-cellulose에서 분리된 각 분획들의 단백질 함량 및 trypsin과 chymotrypsin 비저해활성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. Fr. I과 II의 경우에는 trypsin에 대한 비저해활성은 SBBPI나 다른 분획과 유사하거나 다소 높게 나타났지만 chymotrypsin에 대한 비저해활성은 상대적으로 낮아 각각 323.4, 341.0 U/mg 이었다. 또한 수율도 매우 낮아 10% 이하였으며 T.I.A./C.I.A.값이 10.0 이상으로 이들 분획에는 변형된 BBPI 및 그 iso인hibitor들 또는 KTI가 일부 혼입되어 있는 것으로 판단되었다. 반면 Fr. III의 단백질 수율과 chymotrypsin에 대한 비저해활성은 17.9%, 1,843.6 U/mg이었으며 T.I.A./C.I.A. 값도 2.8로 Fr. I과 II에 비해 낮은 값을 나타내었다. Fr. IV의 경우에는 단백질 수율이 43.2%로 4개의 분획중에 가장 높은 값을 나타내었으며, chymotrypsin에 대한 비저해활성이 3,177.0 U/mg으로 SBBPI의 1,882.3 U/mg에 비해 2배 정도 높은 값을 나타내었다. 또한 T.I.A./C.I.A. 값도 1.6으로 전형적인 BBPI의 1.0과 거의 유사한 값을 나타내었다.

이상의 결과로 Fr. IV가 정제된 BBPI 분획인 것으로 생각되었으며 Fr. III의 경우에는 BBPI의 iso인hibitor들이거나 또는 BBPI가 일부 혼입된 분획인 것으로 판단되어졌다.

DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 분리한 4개의 분획을 SBBPI와 함께 native-PAGE 한 결과는 Fig. 2와 같다.

초기 SBBPI에서는 크게 5개의 주 band와 2-3개의 작은 band들이 나타났으며 이 중에서 주 band들을 이동 속도가 늦은 순서로 band a에서 band e로 명명하였다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 가장 정제도가 높았던 Fr. IV의 경우에 5개의 초기 band와 유사한 전기영동 양상을 나타내었으나 band d가 상대적으로 매우 많이 포함되어 있는 것으로 나타나 Fr. IV 중에서 band d가 BBPI 일 것으로 추정되었다. 이를 확인해 보고자 Fr. IV을 전기영동한 gel로부터 각 band들을 분리, 추출한 후 그 protease 저해 특성을 살펴보았다.

Fr. IV을 전기영동한 후, band a-c, d 및 e를 각각 gel slicing하여 분리하고 76 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)로 추출한 후 protease 저해활성을 측정해 본 결과는 Table 2와 같다.

Trypsin 저해활성은 band d가 479.4 U/ml로 band a-c의

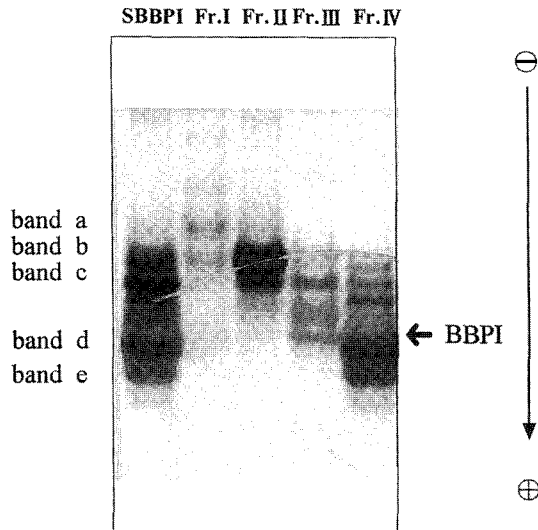


Fig. 2. Native-PAGE of soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor (SBBPI) fractions separated from DEAE-cellulose column.

Table 2. Protease inhibiting activities of separated bands from native PAGE of Fr. IV

	T.I.A. ¹⁾ (U/ml of ext.)	C.I.A. ²⁾ (U/ml of ext.)	T.I.A. C.I.A.
band a-c	37.3	157.0	0.2
band d	479.4	540.2	0.9
band e	104.4	164.7	0.6

¹⁾T.I.A. : Trypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 µg of trypsin for 10 min at 37°C.

²⁾C.I.A. : Chymotrypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 µg of chymotrypsin for 10 min at 37°C.

37.3 U/ml, band e의 104.4 U/ml에 비해 매우 높게 나타났으며 chymotrypsin 저해활성도 band d가 540.2 U/ml로 band a~c와 e의 157.0, 164.7 U/ml에 비해 4배 정도 높게 나타났다. 또한 band d의 T.I.A./C.I.A.값은 0.9로서 전형적인 BBPI의 1.0과 거의 유사한 값을 나타내었다. 또한 BBPI로 생각되어지는 band d의 열안정성을 검토해 본 결과에서도 band d의 경우 trypsin 과 chymotrypsin 저해활성은 95°C에서 3시간 가열시 각각 60%와 80%의 잔류 활성을 나타내어 매우 열에 안정된 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 DEAE cellulose Chr.와 전기영동 후 gel slicing 방법으로 분리한 band d가 BBPI임을 알 수 있었으며 이를 anti-BBPI antibody 제조용 항원으로 사용하였다.

Rabbit anti-BBPI antibody의 조제 및 적정 희석농도 결정

BBPI를 면역시킨 토끼로부터 5차 면역후 1주일 경과시에 혈액을 일정량 채혈하여 얻은 항혈청과 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP를 1/1,000에서 1/300,000까지 순차적으로 희석한 후 비경합 ELISA를 수행하여 적정 희석 농도를 검토해 본 결과, 1차, 2차 항체 모두를 1/10,000 배 정도로 희석했을 때 ELISA 값이 적정 수준인 1.5 정도를 나타내었다. 따라서 이후 competitive ELISA에 의한 BBPI 정량시에 1, 2차 항체의 최종 희석비율을 1/10,000로 하여 사용하였다.

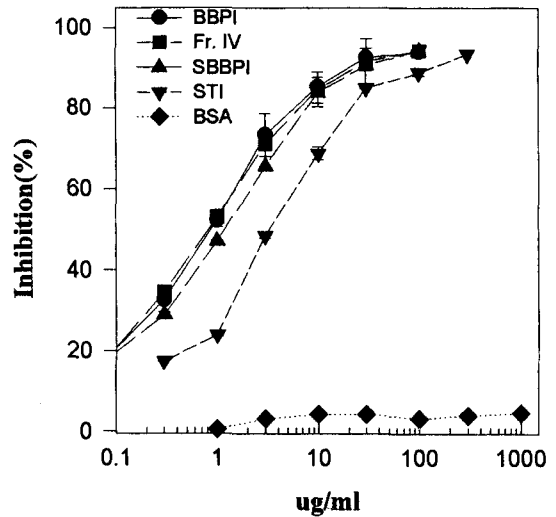


Fig. 3. Inhibition of proteins to antibody binding as determined by competitive ELISA. BBPI: purified BBPI used as immunogen, Fr. IV: purified BBPI fraction from DEAE-cellulose ion exchange chromatography of SBBPI, SBBPI: soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor, STI: soybean trypsin inhibitor, BSA: Bovine serum albumin.

Table 3. Cross-reactivity of anti-BBPI antibody to proteins as determination by competitive ELISA

Protein	Conc. to inhibit 50% Ab. binding(µg/ml)	Cross-reactivity(%)
BBPI(band d) ¹⁾	0.47	100.0
Fr. IV ²⁾	0.58	81.7
SBBPI ³⁾	0.62	76.8
STI ⁴⁾	2.75	17.3
BSA	N.D. ⁵⁾	0.0

¹⁾Purified BBPI(band d) from native-PAGE gel of Fr. IV.

²⁾Fr. IV from DEAE-cellulose ion exchange chromatography of SBBPI.

³⁾Soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor.

⁴⁾Soybean trypsin inhibitor.

⁵⁾Not determined.

Anti-BBPI antibody의 교차반응률 (Cross-reactivity, %)

Sigma사의 SBBPI, 이를 ion exchange chromatography에서 정제한 Fr. IV, gel slicing의 방법으로 순수 분리하여 면역원으로 사용한 BBPI(band d), trypsin 대한 저해활성이 높고 chymotrypsin에 대한 저해활성이 매우 낮아 주로 KTI가 함유되어 있는 것으로 나타난 Sigma사의 soybean trypsin inhibitor (STI) 및 BSA에 대한 anti-BBPI antibody의 교차반응률을 competitive ELISA로 조사하였다. 각 단백질 용액의 농도에 대한 저해율을 Fig. 3에 나타내었으며 여기에서 50% 저해율을 나타내는 농도와 교차반응률을 구하여 Table 3에 나타내었다.

BBPI에 대한 antibody에 대해서 Fr. IV는 81.7%, SBBPI는 76.8%로 비교적 높은 교차반응률을 나타내었으며 정제단계가 높은 것이 교차반응률도 높게 나타났다. 반면 STI의 경우에도 약 17%의 교차반응률을 나타내었는데 이는 Choi⁸⁾의 경우에 3.5% 이었던 것과 비교할 때 다소 높은 값이었다. 그러나 순수 분리된 KTI를 이용한 Choi⁸⁾의 경우와 달리 본 연구에서는 시판 STI를 사용하였으므로 STI에 일부 혼입된 BBPI 및 그 isoinhibitors들에 의해서 교차반응이 나타난 것으로 생각되었

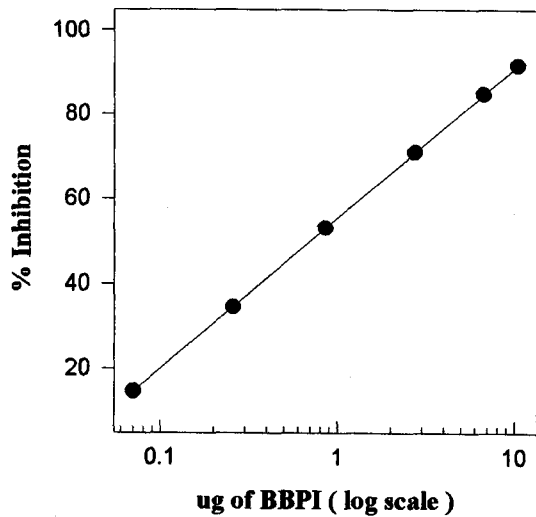


Fig. 4. Standard curve of competitive ELISA for the determination of BBPI contents.

다. BSA의 경우에는 전체적인 저해율이 5% 이하이며 농도증가에 따른 변화가 거의 없었다. 따라서 본 연구에서 제조한 anti-BBPI antibody가 BBPI에 비교적 선택적으로 결합하는 항체인 것으로 판단되었으며 이를 면역학적 방법에 의한 BBPI 정량에 이용하였다.

BBPI의 면역학적 정량을 위한 표준 곡선 작성

대두 및 대두가공제품중에 존재하는 BBPI를 정량하기 위하여 표준 정량곡선을 작성해 본 결과는 Fig. 4와 같다. 그 결

Table 4. Chymotrypsin inhibiting activities and BBPI contents in soybean cultivars

Cultivars	Source ¹⁾ & cultivation year	C.I.A. ²⁾ (U/g)	BBPI contents ³⁾ (mg%)
Heugtae	C, '96	8,462	482 ± 16
Seolitae	C, '96	9,849	575 ± 20
Yakkong	C, '96	11,380	626 ± 16
Jinuni-kong	C, '97	10,614	588 ± 7
Geomjeung-kong #1	S, '96	10,251	537 ± 8
Perking	M, '97	11,140	609 ± 13
Eunha-kong	M, '96	12,428	692 ± 17
Orialtae	M, '96	10,032	525 ± 10
US No. 1	I, '96	11,557	575 ± 9
Sinpaldal No. 2	S, '95	10,013	498 ± 9
Hwanggeom-kong	S, '96	11,645	568 ± 9
Baegtae	C, '96	9,818	522 ± 16

¹⁾C; Commercial market, M; National Crop Experiment Station in Milyang, S; National Crop Experiment Station in Suwon, I; imported.

²⁾C.I.A.: chymotrypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 µg of chymotrypsin for 10 min at 37°C.

³⁾means ± standard deviation.

과, BBPI 농도가 0.03~30 µg/ml의 범위일 때 저해율과 BBPI 함량이 직선적인 관계를 나타내어 대두나 대두 가공제품 중에 존재하는 미량의 BBPI 까지 분석 가능한 것으로 나타났다.

대두품종별 BBPI 함량

대두 12 품종의 chymotrypsin 저해활성 및 BBPI 함량을 비교해 본 결과는 Table 4와 같다. Chymotrypsin 저해활성은

Table 5. Chymotrypsin inhibiting activities and BBPI contents in commercial soybean products

Products	Company	C.I.A. ¹⁾ (U/g)	BBPI contents (mg%)	Products	Company	C.I.A.(U/g)	BBPI contents (mg%)
Soybean sprout	A	13,249	803 ± 13	Doenjang	A	trace	<10
	B	12,462	718 ± 18		B	trace	<10
	C	10,695	588 ± 12		C	N.D. ³⁾	<10
	D	10,834	529 ± 15		D	trace	<10
	E	11,608	690 ± 9		E	N.D.	<10
Tofu	A	trace ²⁾	<10		F	trace	<10
	B	1,767	69 ± 2	Gochujang	A	N.D.	<10
	C	trace	24 ± 0		B	trace	<10
Defatted soybean	A	trace	<10		C	trace	<10
	B	trace	<10		D	trace	<10
SPI	A	trace	13 ± 0.3		E	N.D.	<10
SPC	A	trace	12 ± 0.0	Soy sauce (Ganjang)	A	N.D.	N.D.
Soy Milk	A-1	trace	<10		B	N.D.	N.D.
	A-2	trace	<10		C	N.D.	N.D.
	S-1	trace	<10		D	N.D.	N.D.
	S-2	trace	<10		E	N.D.	N.D.

SPI : soy protein isolate, SPC : soy protein concentrates.

¹⁾C.I.A.: chymotrypsin inhibiting activity, 1 unit is the amount of inhibitor to inhibit 1 µg of chymotrypsin for 10 min at 37°C.

²⁾C.I.A. was less than 1000 units.

³⁾not detected.

8,462~12,428 U/g정도의 값을 나타내었으며 콩나물 제조용 소립콩인 은하콩의 chymotrypsin 저해활성이 가장 높게 나타났다. 항체를 이용한 효소면역학적 방법으로 BBPI 함량을 살펴본 결과에서는 482~692 mg% 정도의 BBPI 함량 분포를 나타내었으며 대체로 chymotrypsin 저해활성이 높은 대두 품종에서 BBPI 함량도 높게 나타났다.

시판 대두 가공제품 중의 BBPI 함량

대두 가공제품 중에 잔존하는 BBPI 함량수준을 살펴보기 위하여 대상시료로서 콩나물, 두부, 탈지대두박, soy protein isolate, soy protein concentrate 등의 중간소재 제품, 된장 등의 장류 등을 선정하고 효소면역학적 방법으로 BBPI 함량을 살펴본 결과는 Table 5와 같다.

콩나물의 경우 10,695~13,249 U/g의 chymotrypsin 저해활성과 529~803 mg%의 BBPI 함량을 나타내었으며 이들 두 측정치간에는 비례적인 관계가 성립하는 것으로 나타났다. 시판 두부 제품의 경우 B사의 제품에서만 1,767 U/g의 chymotrypsin 저해활성과 68.9 mg%의 BBPI 함량을 나타내었을 뿐 그 밖의 두부제품에서는 BBPI 함량이 매우 낮게 나타났다. 이는 두부 제조시 수침, 마쇄, 가열, 성형 등의 다양한 공정을 거치면서 BBPI가 용출, 변성되었기 때문인 것으로 생각되었다. 그 밖에 탈지대두박, SPI, SPC 등의 중간소재 제품, 두유 및 된장, 고추장과 간장 등의 시판 장류에서는 BBPI가 거의 검출되지 않았다.

DiPietro 등¹⁶⁾은 효소적 분석방법과 rocket immunoelectrophoresis 방법을 이용하여 다양한 대두 식품종의 KTI와 BBPI 함량을 측정해 본 결과 대두분말, soy concentrate, soy isolate 등에서 상당량의 KTI와 BBPI가 함유되어 있으며 대두 가공제품에도 검출 가능한 수준의 KTI와 BBPI가 함유되어 있음을 보고한 바 있다. 또한 우리나라와 식품 문화가 유사한 일본의 경우 Miyagi 등¹⁸⁾은 대두 가공제품종의 KTI와 가공공정 중의 함량변화를 측정한 연구결과에서 몇가지 두부제품 중에는 2.5~7.9%, 두유에는 13%, natto, soy sauce, miso 등에는 0.3~0.8% 정도의 KTI가 잔존하였으며 두유를 가열처리시에도 가열처리 조건에 따라 5~35%의 KTI가 잔존하는 것으로 보고한 바 있다.

감사의 글

본 연구는 1997년도부터 수행한 농림수산특정연구과제인 "콩 생리활성 배당체의 기능성 탐색 및 활용기술 연구"에 관한 연구의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 농림수산기술관리센터에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Rackis, J. J. and Gumbmann, M. R. (1981) Protease inhibitors : Physiological properties and nutritional significance, In Antinutrients and natural toxicants in foods, Ory, R.L., Ed., Food and Nutrition Press, CT, U.S.A.
 2. Sung, M. K. (1996) The anticarcinogenic properties of soybeans. *Kor. Soybean Soc.* **13**, 19-31.

3. Kennedy, A. R. (1993) Cancer prevention by protease inhibitors. *Preventive Medicine* **22**, 796-811.
 4. Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W. and Kennedy, A. R. (1985) Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **82**, 5395-5399.
 5. Birk, Y. (1985) The Bowman-Birk inhibitor : Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int. J. Peptide Protein Res.* **25**, 113-131.
 6. Odani, S. and Ikenaka, T. (1972) Studies on soybean trypsin inhibitor. IV. Complete amino acid sequence and anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J. Biochem.* **71**, 839-848.
 7. Rho, B. S., Lee, H. S. and Kim, S. I. (1989) Variation in Bowman-Birk type protease inhibitors of soybeans. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 116-125.
 8. Choi, K. B. (1989) Isolation, characterization and immunological analysis of soybean Bowman-Birk trypsin inhibitor and iso-inhibitors. MS thesis. College of Agriculture. Seoul National Univ.
 9. Baek, J. M. and Kim, S. I. (1993) Nucleotide sequence of a cDNA encoding soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. *Plant Physiol.* **102**, 687.
 10. Baek, J. M., Song, J. C., Choi, Y. D. and Kim, S. I. (1994) Nucleotide sequence homology of cDNA encoding soybean Bowman-Birk type protease inhibitor and its iso-inhibitors. *Bio-sci. Biotech. Biochem.* **58**, 843-846.
 11. Doell, B. H., Ebden, C. J. and Smith, C. A. (1981) Trypsin inhibitor activity of conventional foods which are part of the British diet and some soy products. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.* **31**, 139-150.
 12. Rackis, J. J., Wolf, W. J. and Baker, E. C. (1986) Protease inhibitors in plant foods : Contents and inactivation, In Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods, Friedman, M. ed., chap. 19, Plenum Pub., NY, U.S.A.
 13. Lehnhardt, W. L. and Dills, H. G. (1984) Analysis of trypsin inhibitors in soy products : Evaluation of methodology and improvements. *JAOCS* **61**, 691.
 14. Brandon, D. L., Bates, A. H. and Friedman, M. (1989) Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybeans. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1192-1196.
 15. Brandon, D. L., Bates, A. H. and Friedman, M. (1988) Enzyme-linked immunoassay of soybean Kunitz trypsin inhibitor using monoclonal antibodies. *J. Food Sci.* **53**, 97-101.
 16. DiPietro, C. M. and Liener, I. E. (1989) Soybean protease inhibitors in foods. *J. Food Sci.* **54**, 606-609, 617.
 17. Wan, X. S., Koch, C. J., Loed, E. M., Manzone, H., Billings, P. C., Donahue, J. J., Odell, C. S., Miller, J. H., Schmidt, N. A. and Kennedy, A. R. (1995) Monoclonal antibodies differentially reactive with native and reductively modified Bowman-Birk protease inhibitor. *J. Immunol. Meth.* **180**, 117-130.
 18. Miyagi, Y., Shinjo, S., Nishida, R., Miyagi, C., Takamatsu, K., Yamamoto, T. and Yamamoto, S. (1997) Trypsin inhibitor activity in commercial soybean products in Japan. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **43**, 575-580.

Quantification of Bowman-Birk Protease Inhibitors in Soybeans and Soybean Products by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Hee-Do Hong*, Sung-Ran Kim, Dong-Hwa Shon and Su-II Kim¹(*Korea Food Research Institute, Sungnam, 463-420, Korea; ¹College of Agriculture and Life Science, S.N.U., Suwon, 441-744, Korea*)

Abstract : BBPI contents in domestic soybean and soybean products were investigated by the measurement of chymotrypsin inhibiting activity(C.I.A) and competitive ELISA method. In order to produce polyclonal antibody, BBPI was purified from soybean trypsin-chymotrypsin inhibitor by ion exchange chromatography and electrophoretic gel slicing. Rabbit anti-BBPI polyclonal antibody was produced with the purified BBPI as immunogen. This antibody showed relatively specific binding to BBPI and then used for the establishment of competitive ELISA method to measure BBPI contents in extracts of soybean and soybean products. The standard curve for the measurement of BBPI in soybean extracts was drawn up within the range 0.03 to 30 µg/ml of BBPI. The C.I.A. and BBPI contents of 12 soybean cultivars were 8,462~12,428 U/g and 482~692 mg%, respectively. The C.I.A. and BBPI contents were not detected in most of soybean products except soybean sprouts, which contained 10,695~13,249 U/g of C.I.A. and 529~803 mg% of BBPI.

Key words : soybean, soybean products, Bowman-Birk protease inhibitor, chymotrypsin inhibiting activity, competitive ELISA

*Corresponding author