

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 大豆活性成分分析與抗老化之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNAL94-01

執行期間：94年1月1日至94年12月31日

計畫總主持人：范晉嘉

子計畫主持人：范晉嘉（子計畫1）

陳麗珠（子計畫2）

計畫參與人員：陳佳慧、程台生

執行單位：生活應用與保健系

中華民國95年2月28日

# 大豆活性成分分析與抗老化之研究

計畫編號：CNAL94-01

子計畫(1)大豆製品中異黃酮之 ELISA 分析

計畫總主持人：范晉嘉

子計畫主持人：范晉嘉

執行機關：嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

## 摘要

近年來，國人罹患心血管疾病之比例日漸提高，飲食習慣是原因之一。根據報告指出，西方國家居民罹患乳癌、大腸癌和前列腺癌的機率較亞洲國家高出許多，學者們普遍認為這與東方人的飲食習慣有關，而非遺傳的影響。Lee *et al.* (1991) 的實驗結果，證明新加坡國民的大豆飲食與減少癌症風險有直接相關。大豆含豐富的營養成分及一些機能性成分，如：異黃酮、皂素、植酸、固醇、卵磷脂等。本研究使用 ELISA 方法利用其快速、簡便、靈敏的優點分析國產大豆和市面上販售大豆之異黃酮含量。結果顯示，國產大豆種中毛豆高雄 6 號總異黃酮含量高達 47.71( $\mu\text{g/g}$  FW)，是其中含量最高者。針對國產之黑豆比較發現以青仁黑豆台南 3 號總異黃酮量高於黃仁台南 5 號。在市售大豆方面，以妙鷹牌黑豆最高，達 110.56( $\mu\text{g/g}$  FW)。整體而言，其中 daidzein 含量比 genistein 含量要高。將市售大豆與國產大豆做比較，發現除了妙鷹黑豆外，其黑豆的異黃酮含量低於黃豆。

## 前言

大豆(soybean)學名為 *Glycine max* (L.) Merrill，它屬於豆科(Leguminosae)大豆屬(*Glycine*)一年生草本植物。大豆品種甚多，依種皮顏色不同取名，包如：黃豆、黑豆皆屬大豆，而毛豆則是大豆豆莢發育至八分飽滿時採收(R6)的鮮果莢，此時因為豆莢附有許多絨毛，因而稱之為毛豆(吳和連，1998)。大豆含有豐富及高營養價值的蛋白質和脂質，其中蛋白質含量約為 34%，係由 18 種人體所需胺基酸構成，其中以麩氨酸(glutamic acid)、天冬胺酸(aspartic Acid)及白胺酸(leucine)的含量較高(Friedman, 2001)；脂肪含量約 18%，其中不飽和脂肪酸高達 86%(高，2002)；另外還含有一些微量成份，包含在約 5%的灰份中，如：鉀、磷、鈣等。大豆尚含有一些特殊的機能性成份，如：卵磷脂(lecithin)、皂素(saponins)、固醇(sterols)、植酸、異黃酮(genistein, daidzein and glycitein)和蛋白酶抑制劑(BBI)等(張，2002)。近年來許多研究證實大豆具有預防癌症的特性，尤其是與荷爾蒙有關的癌症，如：乳癌、前列腺癌及肺癌。除了抑癌作用之外，異黃酮特殊的結構使其具有雌激素的功能及具抗氧化活性等，因此異黃酮在近幾年逐漸受到重視。本研究採用免疫酵素結合分析法(ELISA)分析自台南農改場及高雄農改場提供之大豆以及市面上所販售之大豆其異黃酮含量。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本研究所使用的國產大豆品種有：毛豆台南選 1 號、青仁黑豆台南選 3 號、黃仁黑豆台南選 5 號、綠肥大豆台南選 6 號、毛豆高雄 5 號、毛豆高雄 6 號以及毛豆高雄 7 號。市售大豆包括：日正大豆、義美大豆、日正黑豆、政豐黑豆、妙鷹黑豆。

### 二、試驗方法

#### 1. 大豆異黃酮之萃取

取大豆種子 15 g，用磨豆機磨碎。秤取 2 g 大豆粉置於 15ml 離心管，加入 10 ml n-hexane 進行脫脂，共一小時 (每 30 min 更換萃取液)。其粉末自離心管中挖出，置於秤藥盤上，使其在抽氣櫥中自然揮發風乾，待粉末風乾後，精秤 1 g，置於 15 ml 離心管中，並加入 7 ml 萃取液。均勻混合後，置於水平式震盪器上搖 1 hr 後，離心 (3000 rpm) 15 min，取上清液。其上清液經減壓濃縮後，剩下液體用氮氣吹乾，置於 -20 °C 下冷凍備用。

#### 2. ELISA 分析

96 well plate 中每一 well 加入 200µl 的 Thyr conjugates solution，4°C 反應 overnight。PBS-T-PS-DMSO buffer 37°C 反應 30 min 後 PBS-T-DMSO buffer wash 3 次，每次 3 min，加入樣品和 1° Antibody 於 37°C 反應 2 hr，1° Antibody 洗掉加入 2° antibody 於 37°C 反應 30 min 後洗掉，加 Substrate solution，室溫下反應 30 min 在加 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中止反應並以 ELISA reader 偵測 OD 490。

#### 3. 統計分析

本研究之統計方法主要採用 SPSS 10.0 (1999) 系統，使用 One Way ANOVA (analysis of variance) 及 LSD (least significant difference) 分析各組間的差異性。

## 結果與討論

由表一得知國產大豆的總異黃酮含量以毛豆高雄 5 號較高，黃仁台南 5 號較低。另外將青仁黑豆與黃仁黑豆做比較發現其青仁黑豆之異黃酮含量較黃仁黑豆高。在市售大豆(表二)方面則以妙鷹牌黑豆之異黃酮含量位居第一，且 daidzein 含量比 genistein 含量要高。將市售大豆與國產大豆做比較發現除了妙鷹黑豆外，整體而言，黑豆的異黃酮含量低於黃豆。其中台南 1 號是國產大豆中含量最高者，與市售大豆相比仍比市售大豆來的低。

表一、國產大豆各品種之異黃酮含量

序號	品種	genistein 含量 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	daidzein 含量 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	異黃酮含量 <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )
1	毛豆台南選 1 號 (茶豆)	3.44 $\pm$ 0.11	8.63 $\pm$ 0.26	12.07
2	青仁黑豆台南 3 號	3.53 $\pm$ 0.15	6.61 $\pm$ 0.24	10.14
3	黃仁黑豆台南 5 號	3.12 $\pm$ 0.14	2.16 $\pm$ 0.05	5.28
4	綠肥大豆台南 6 號	4.02 $\pm$ 0.16	7.40 $\pm$ 0.22	11.42
5	毛豆高雄 5 號	10.44 $\pm$ 0.20	9.73 $\pm$ 0.11	20.17
6	毛豆高雄 6 號	16.48 $\pm$ 0.37	31.23 $\pm$ 1.13	47.71
7	毛豆高雄 7 號	5.01 $\pm$ 0.08	3.77 $\pm$ 0.05	8.78
F values <sup>c)</sup>		1760.12***	1374.75***	

a) Data are means  $\pm$  S.D. for 3 trials

b) Isoflavone content = genistein + daidzein

c) Levels of significance of ANOVA; \*\*\*, significant at 0.1 %

表二、市售大豆之異黃酮含量

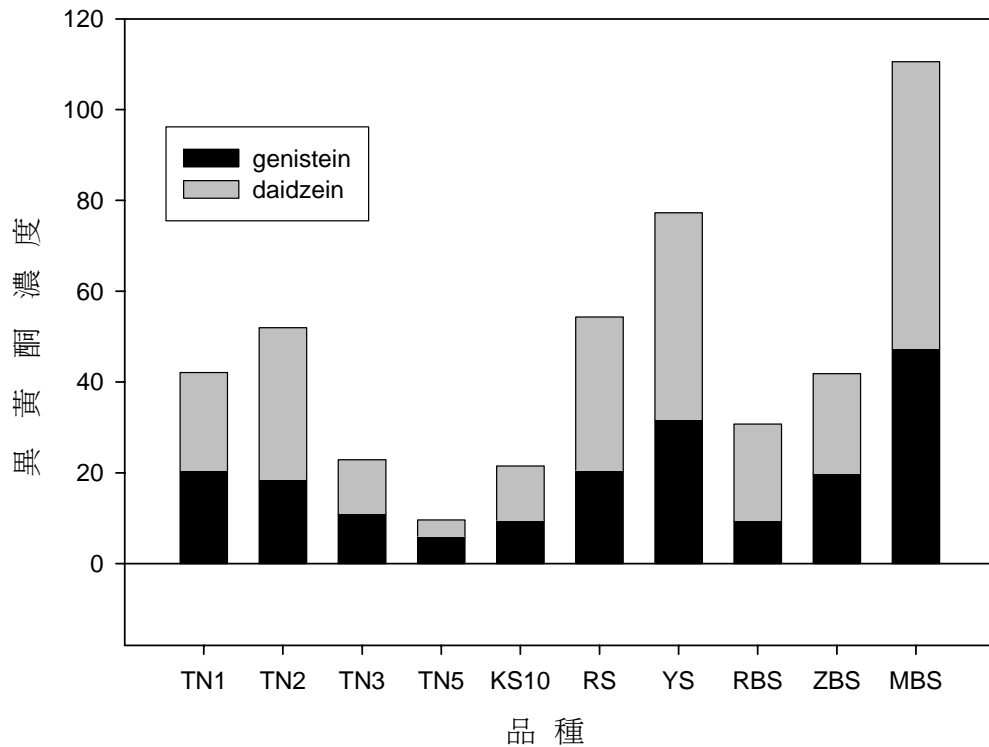
序號	材料	genistein 含量 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	daidzein 含量 <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )	異黃酮含量 <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/g FW}$ )
1	市售日正牌大豆	20.60 $\pm$ 1.21	33.73 $\pm$ 0.93	54.33
2	市售義美牌大豆	31.64 $\pm$ 1.19	45.67 $\pm$ 1.05	77.31
3	市售日正牌黑豆	9.35 $\pm$ 0.44	21.40 $\pm$ 0.88	30.75
4	市售政豐牌黑豆	19.81 $\pm$ 0.45	22.03 $\pm$ 0.54	41.84
5	市售妙鷹牌黑豆	47.25 $\pm$ 0.80	63.31 $\pm$ 1.78	110.56
F values <sup>d)</sup>		1264.18***	1387.46***	

a) Data are means  $\pm$  S.D. for 3 trials

b) Isoflavone content = genistein + daidzein

c) Not detected

d) Levels of significance of ANOVA; \*\*\*, significant at 0.1 %



圖一、市售大豆與國產大豆之異黃酮含量比較

TN1：毛豆台南選一號(茶豆)；TN2：大豆台南二號；  
 TN3：青仁黑豆台南三號；TN5：黃仁黑豆台南五號；  
 KS10：大豆高雄選十號；RS：市售日正牌大豆；  
 YS：市售義美牌大豆；RBS：市售日正牌黑豆；  
 ZBS：市售政豐牌黑豆；MBS：市售妙鷹牌黑豆

### 參考文獻

1. Messina M, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. Soy intake and cancer risk : a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer*.1994 ; 21:113-131.
2. Kennedy AR, Wan XS.Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *The Prostate*. 2002 ; 50:125-133.
3. Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*.1991 ; 337: 1197-1200.
- 4.林士祥、彭湘琦、簡怡雯，市售黃豆製品之主要異黃酮素含量及分布。中華民國

國學會雜誌，

pp.139-146，2002。

5.江文德，簡介大豆中的異黃酮素。食品工業月刊，30：6-12，1998。

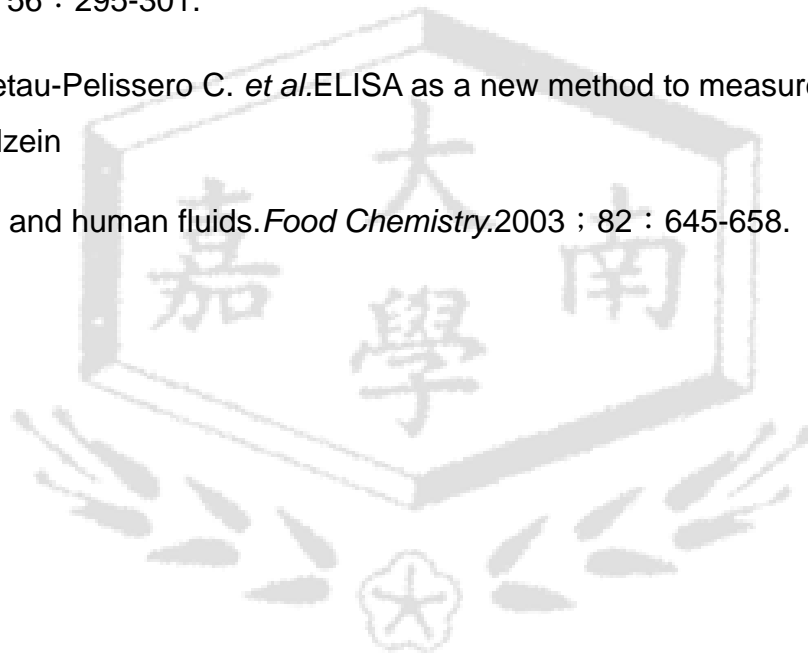
6.Houero CL. *et al.*Syntheses of novel hapten-protein conjugates for production of

highly specific antibodies to formononetin,daidzein and genistein. *Tetrahedron.*

2000；56：295-301.

7.Bennetau-Pelissero C. *et al.*ELISA as a new method to measure genistein and daidzein

in food and human fluids. *Food Chemistry.*2003；82：645-658.



# 大豆活性成分分析與抗老化之研究

計畫編號：CNAL94-01

子計畫（2）大豆 Bowman-Birk 蛋白水解酵素抑制素之定量分析研究

計畫總主持人：范晉嘉

子計畫主持人：陳麗珠

執行機關：嘉南藥理科技大學生活應用與保健系

執行期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

## 摘 要

大豆的機能性成分，如：蛋白水解酵素抑制素(Bowman-Birk protease inhibitor, BBI)、木質素、植酸、皂素和異黃酮等，均被認為是有益人體生理機能與健康的重要成分。本實驗選擇以台灣目前推廣之黑豆及毛豆做為研究材料，針對國產、市售黑豆及毛豆內之BBI進行定量分析，並分別探討品種、栽種年份和栽種地點對BBI含量的影響。研究結果顯示，大豆BBI含量會受到品種及種植年份的影響而不同。不同栽種地區所採收的毛豆高雄五號，其BBI含量不同( $p < 0.05$ )。此外，種植年份與栽種地區間具有明顯的交互影響。整體而言，黑豆之BBI含量較黃豆高。非黑色種皮的國產大豆中，只有毛豆台南選一號與黑豆的BBI含量相當。最後，市售大豆的品質參差不齊，甚至驗出非大豆品種的有機黑豆，顯示進口大豆品質的不穩定性，也代表消費者在選購大豆產品時，必須更加留意小心。

關鍵字：蛋白水解酵素抑制素、大豆、SDS-PAGE、西方墨點

## 前 言

台灣加入世界貿易組織(World Trade Organization, WTO)後，農業經營方式的轉型已是勢在必行(WTO農業研究中心，2002)。政府為了減少因為加入世貿對農業造成的衝擊，正努力推行「少量多樣化的精緻農業」，以幫助農民進行農業經營方式的轉型。在眾多推廣的農作物中，以具有黑色種皮的大豆，即黑豆以及在豆莢成熟飽滿度達八成採收的大豆(*Glycine max* L.)，即毛豆，被視為是具有發展潛能的重點作物(連等人，2005)。此外，由於黑豆具有比黃豆更佳的營養成分，且中醫普遍認為黑豆入藥的保健功效高於黃豆，使得黑豆近年來頗受社會大眾喜愛(郭士榮，1998; 連等人，1999)。另一方面，毛豆向來是我國重要的外銷作物，其出口值占全國冷凍蔬菜出口值的88%，具有舉足輕重的地位(連和吳，2004)。

大豆成份，如：蛋白水解酵素抑制素、木質素、植酸、皂素和異黃酮等，均被認為具有抑癌能力及其它有益健康的生理機能，其中又以蛋白水解酵素抑制素(protease inhibitors)及異黃酮(isoflavone)最受大家注目。雖然國外針對大豆 BBI 的分析研究很多，可惜國內對市售及國產大豆，有關 BBI 的定量研究卻很少。當國民所得提高後，消費者選購農產品時，主要關心的是品質的優劣及多樣化的選擇(Lang *et al.*, 2003)，因此必須加強國產大豆的品種改良與機能性成分研究，才能與廉價的進口大豆競爭。本研究為增加國產大豆(黑豆、毛豆)的競爭力，針對國產大豆各品種進行 BBI 定量分析研究，並與進口大豆比較兩者之差異。另一方面，由於不同種植年份，植物所遭遇的環境因子不同，變異性極大，極有可能改變大豆內機能性成分的含量。因此不同的種植年份、地區對 BBI 含量的影響，亦為本實驗的探討重心之一。

## 材料與方法

本研究使用由台南區、高雄區農業改良場及亞洲蔬菜研究發展中心所提供之國產秋作大豆、黑豆、毛豆及紅豆等13個品種，以及購自一般生鮮超市之進口、市售豆子計7個品牌豆子(表一)。實驗材料取回後，儲存於4°C冰箱備用。

### (一)、大豆BBI之SDS-PAGE及西方墨點定量分析：

豆子可溶性蛋白以緩衝液(Tris-EDTA-Triton-X100-PMSF, pH7.0)，並使用均質器(McCulloch MD41010)來萃取。蛋白質定量係參照 Bradford (1976)，以 BSA (Bovine serum albumin; Pierce 23209)為標準品，利用內插法求得各樣品之蛋白質含量。SDS-PAGE 膠體電泳則依 Laemmli (1970)的方法，以 15%SDS-PAGE 膠片進行蛋白質電泳。每次電泳時大豆 BBI (T9777, Sigma-Aldrich Corporation)蛋白標準品 3 μg 也一併電泳，作為定量分析比對之用。電泳結束後，膠片以 Gel-Code (Pierce 24590)或 Coomassie brilliant blue G-250 染色。BBI 西方墨點分析是用 Towbin transfer buffer 將蛋白轉印至硝酸纖維紙上(Towbin, 1979, 1984)。一次抗體是由台大農化系所代製的 BBI 多株抗體，二次抗體 Anti-Mouset IgG AP coujugate 則購自 Promega (S372B)，利用 AP (Western Blue<sup>®</sup>, Promega S3841)呈色劑顯影。電泳膠片與轉漬膜上的呈色結果，均以掃描器 (UMAX Astra 1200S)掃描成影像檔，配合膠片影像處理系統(SigmaGel<sup>™</sup> Gel Analysis Software; Sigma Z36, 561-0, Jandel)進行 BBI 定量。BBI 含量的計算方式(μg/mg 粗萃蛋白)：

$$\text{BBI 含量} = \frac{\text{樣本點數(經 Sigmagel 換算)} \times 3\mu\text{g (BBI 標準品含量)}}{\text{標準品點數(經 Sigmagel 換算)} \times 0.015 \text{ mg (每個樣本槽所加之蛋白質量)}}$$



## (二)、統計分析：

本研究之統計方法採用 SPSS 10.0 (Jandel)套裝軟體，使用 One Way ANOVA (analysis of variance)及 LSD (least significant difference)分析各樣本之組間差異。

## 結果與討論

BBI 是由 70-80 個胺基酸組成，結構上因為含有七個雙硫鍵，在種子內的化學性質較穩定，而其分子量範圍依文獻記載為 8 kDa 左右 (Lajolo and Genovese, 2002)。本研究的目的是運用 SDS-PAGE 及西方墨點法並配合電泳膠片分析軟體來定量豆子內的 BBI 含量，因為實驗設計需要先找出適合 BBI 蛋白電泳分析的條件，並確定 BBI 蛋白質在膠片上的位置，才能正確進行定量分析。針對這些問題，研究者分別以 15%及 20%SDS-PAGE 裝載不同數量之 BBI 進行電泳。從圖一的實驗結果得知，購自 Sigma Chemicals (T-9777)的大豆 BBI 蛋白標準品，其主要成分之分子量 $>6.5$  kDa，而次要成分的分子量則 $>16$  kDa(圖 1A)。進一步以 20%SDS-PAGE 與低分子量標準蛋白分析時，其主要成分之分子量近 8.1 kDa，而次要成分的分子量則是在 14.4 kDa 左右(圖 1B)。至於次要成分產生的原因，通常和高濃度 BBI 在液體中容易產生三元體(圖 1A，箭頭)或雙元體(圖 1B，箭頭)有關(Ford *et al.*, 1982; Birk, 2003)。因此，解決這些干擾的方法，可以在電泳樣本準備時，運用加熱處理、少用 SDS (Millar *et al.*, 1969)、降低 BBI 濃度或減少樣本裝載量，以獲得較理想的分析效果(圖 1B)。BBI 蛋白質在膠片上的位置，是採用由台大農化系所代製的 BBI 多株抗體，與 15%SDS-PAGE 蛋白質電泳配合進行西方黑點分析。由圖 1C 和 D，針對毛豆高雄 5 號樣本的分析結果，BBI 主要成分的分子量約為 8 kDa (Sessa and Wolf, 2001)。至於分子量較大的幾個次要成分，因為抗體反應呈現不反應或訊號微弱的現象，可以在定量上捨去不計(圖 1D)。此外，雖然 BBI 樣品在分子量約 9~10 kDa 的次要成分，於西方黑點分析時反應訊號夠強(圖 1D，箭頭)。但是，在所有分析過的國產與市售豆子，均無此成分，定量上不予採計。

### (一)、大豆各品種之 BBI 含量分析

由 2002 年秋作國產大豆各品種 BBI 含量的分析結果顯示，大豆 BBI 的含量會受品種不同而影響(表二)。其中以毛豆高雄六號、七號之 BBI 含量，明顯高於其它品種；其次為毛豆台南選一號(茶豆)，而 BBI 含量最低的是大豆高雄選十號。其餘各品種之 BBI 含量約在 168.29~201.79 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  粗萃蛋白)之間。將 2002 年及 2003 年秋作大豆各品種的 BBI 定量結果，進行相互比較後，發現由台南區農改場取得的四個品種，均以

2003 年秋作的 BBI 含量較高(圖 2)。另一方面，自高雄區農改場取得的大豆品種，除了毛豆高雄五號外，則是 2002 年秋作的 BBI 含量顯著高於 2003 年秋作。

#### (二)、不同種植年份對國產大豆 BBI 含量之影響

不同採收年份的黑豆，其 BBI 含量之差異極顯著(表 3)。黑豆台南三號的 BBI 含量在 2001 年秋作最低，經換算後，每毫克(mg)粗萃蛋白含有 143.8 微克( $\mu\text{g}$ )的 BBI。而 2003 年秋作最高，為 246.92  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，兩者差異達 1.7 倍。

#### (三)、市售大豆與國產大豆之 BBI 含量比較

因為市售各廠牌的豆子，其品種、採收期及栽種條件不一，使得其 BBI 含量的差異極大(表 4)。但是，市售黑豆的 BBI 含量高於市售大豆( $p<0.001$ )。再以 2003 年秋作的國產大豆與市售豆子進行比較，結果與先前一致(圖 2)。無論是市售或國產，黑色種皮大豆的 BBI 含量普遍高於黃豆。

#### (四)、市售有機黑豆的 BBI 含量分析

有機農業是台灣非常熱門的一個新興農業經營型態，由於作物種植過程中不加化學肥料、農藥，因此，農產品的機能性成分含量或許跟其他市售產品不同。本研究針對市售有機黑豆進行 BBI 分析，從分析結果可發現，它與其它大豆的蛋白質電泳色帶完全不同(Data not shown.)。由於蛋白質為基因之產物，且其包裝上顯示每 100 克含有 20 克的蛋白質，與一般大豆的蛋白質含量有很大差異，據此推斷它應非大豆家族成員。

### 執行成果與效益評估

本實驗選擇以台灣目前推廣之黑豆及毛豆做為研究材料，並針對市售黑豆及毛豆之 Bowman-Birk 蛋白水解酵素抑制素進行西方墨點與 SDS-PAGE 蛋白質定量分析。一般而言，黑豆的 BBI 含量都比毛豆高出許多，原因可能和黑豆的總蛋白量較高有關。唯毛豆台南選一號(茶豆)的 BBI 含量與黑豆相當，在命名推廣後，值得推薦給消費者。此外，有關品種、栽種年份和栽種地點對 BBI 含量影響的探討顯示，栽種年份對 BBI 含量的重要性，大過栽種地點。至於品種不同，對 BBI 含量的影響，從黑豆的 BBI 含量比毛豆高出許多可見一般。

由於傳統上，黑豆或大豆是非常優良的保健食品，只是缺乏完整的學理依據。本計畫發現國產鮮豆與市售進口黑豆、大豆之抑癌物 BBI 的含量確有差異，隨著貯藏時間的增加，BBI 含量有減少的趨勢，藉此能澄清國人對「進口貨」過度依賴的不正確觀念，達到促進大眾愛用國產黑豆、大豆之目的，以提高農民收益為目標。而市場上

因為出現單價較貴，而成份可能不是黑色種皮的「有機黑豆」。因此，建議消費者須要小心辨認包裝上的說明，以保障自身權益。

## 誌 謝

感謝國立台南大學自然科學教育學系，提供實驗場所與支持；台南區農業改良場、高雄區農業改良場及亞洲蔬菜研究發展中心提供黑豆、大豆種子；林哲彥教授與陳文雄研究員細心指導，對本研究幫助極大。特別感謝嘉南藥理科技大學提供部分經費，使得本研究能順利進行。

## 參 考 文 獻

1. 連大進、吳昭慧。2004。毛豆外銷市場的前景與未來。永續農業，21：11-14。  
<http://www.tndais.gov.tw/Dryland/毛豆外銷市場的前景與未來.pdf>
2. 連大進、周國隆、蔡竹固、吳昭慧。2005。毛豆企業化省工及大面積栽培技術研究。92年國科會專案計畫成果報告，NSC92-3114-P-055-001-Y，台南區農業改良場。
3. 連大進、吳昭慧、吳振碩、王裕權。1999。黑豆新品種台南3號之育成。台南區農業改良場研究彙報，35：14-24。
4. 程台生、陳惠美、陳麗珠、連大進。2005。大豆Bowman-Birk 蛋白水解酵素抑制素之定量分析研究。南大學報，39，45-60。
5. 郭士榮。1998。黑豆豆腐及豆漿加工中抗氧化力與異黃酮之改變。中國文化大學碩士論文，134pp.
6. 戴文禎。1997。黑豆萃取物之抗氧化效用。中國文化大學碩士論文，110pp.
7. Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
8. Birk, Y. (2003). *Plant protease inhibitors*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
9. Eldridge, A.C. and W.F. Kwolek. 1983. Soybean isoflavones : effect of environment and variety on composition. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 31:394-396.
10. Ford, D. E., Gutay, P. A., Ladin, B., Beachy, R. N., and Larkins, B. A. (1982). In vitro synthesis of the Bowman-Birk and related soybean proteinase inhibitor. *Plant Molecular Biology*, 1:227-243.
11. Head KA (1998) Isoflavones and other soy constituents in human health and disease. *Alternative Medicine Review*, 3: 433-450.
12. Huang, LJ (2003) Studies on the Genetic and Breeding Behaviors of Quality Characters of the Soybean Varieties Released in Taiwan, p.73. MS Thesis, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
13. Lang, J. T., O' Neill, K. M., and Hallman, W. K. (2003). Expertise, trust, and communication about food biotechnology. *AgBioForum*, 6:185-190.
14. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
15. Lajolo, F. M., and Genovese, M. I. (2002). Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50: 6592-6598.

16. Lee, S.J., K.A. Joung, H.K. Seung, T.K. Jung, J.H. Sang, Y.J. Mun and M.C. Ill. 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51:3382-3389.
17. Millar, D. B. S., Willick, G. E., Steiner, R. F., and Frattali, V. (1969). Soybean inhibitors. IV. The reversible self-association of a soybean proteinase inhibitor. *Journal Biological Chemistry*, 244:281-284.
18. Nakamura Y, A Kaihara, K Yoshii, Y Tsumura, S Ishimitsu, Y Tonogai (2001) Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan. *Journal of Health Science*, 47: 394-406.
19. Sessa, D. J. and Wolf, W. J. (2001). Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. *Industrial Crops and Products*, 14:77-83.
20. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings National Academic Science USA*, 79:4350-4354.
21. Towbin, H., and Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and outlook. *Journal of Immunology Methods*, 72:313-340.
22. Wan, X.S. T.C. Hamilton, J.H. Ware, J.J. Donahue, A.R. Kennedy. 1998. Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentration in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 31:8-17.
23. Wang, H. and P.A. Murphy. 1994a. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 42:1666-1673.
24. Wang, H. and P.A. Murphy. 1994b. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop year, and location. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 42:1674-1677.

# SDS-PAGE Analysis of Soybean (*Glycine max* L.) Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI)

Lee-Ju Cheng and Jin-Jia Fan

Department of Applied Life Science and Health  
Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan (ROC)

## Abstract

Soybean functional ingredients, such as: protease inhibitors, lectin, phytic acid, saponin and isoflavones all have been proved useful in human health and some physiological functions. In these studies, we first analyzed and compared several domestic and commercial soybeans with their Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) content using SDS-PAGE protein gel electrophoresis and western blot. Investigation of varieties, cultivation year, and plant area effect to the BBI content for soybeans were performed. Results indicated that the amount of BBI in soybean seed is determined by varieties and planting year. The manifestation difference ( $p < 0.05$ ) of BBI content in vegetable soybean Kaohsiung No. 5 that collected from Tainan and Kaohsiung was mainly due to their plant area. In fact cultivation year and plant area are obviously correlated and interacted to each others. In general, the BBI content in the black soybeans is higher than non-black soybeans, however, the amount of BBI in vegetable soybean Tainan selected No. 1 is comparable to the black soybeans.

Key words: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI), SDS-PAGE, western blotting, soybean

表 1、BBI 定量分析研究所使用的國產與市售大豆

Table 1. Domestic and commercial soybeans used for BBI analysis

Variety	Number	Crop Use	Crop year	Source	Remarks
Tainan selected #1 (TS85-21V)	TNS1-2002	Green soybean	2002	TDARES*	Brown seed
Tainan selected #1	TN1-2003	Green soybean	2003	TDARES	Brown seed
Tainan #2	TN2-2002	Soybean	2002	AVRDC**	
Tainan #3	TN3-1998	Black soybean	1998	TDARES	
Tainan #3	TN3-1999	Black soybean	1999	TDARES	
Tainan #3	TN3-2000	Black soybean	2000	TDARES	
Tainan #3	TN3-2001	Black soybean	2001	TDARES	
Tainan #3	TN3-2002	Black soybean	2002	TDARES	
Tainan #3	TN3-2003	Black soybean	2003	TDARES	
Tainan #4	TN4-2002	Soybean	2002	TDARES	Yellow seed coat
Tainan #5	TN5-1998	Black soybean	1998	TDARES	
Tainan #5	TN5-2002	Black soybean	2002	TDARES	
Tainan #5	TN5-2003	Black soybean	2003	TDARES	
Tainan #6	TN6-2002	Soybean	2002	TDARES	Black seed coat
Tainan #6	TN6-2003	Soybean	2003	TDARES	Black seed coat
Kaohsiung #5	KS5-2002-TN	Green soybean	2002	TDARES	
Kaohsiung #5	KS5-2002-KS	Green soybean	2002	KSARES***	
Kaohsiung #5	KS5-2003	Green soybean	2003	KSARES	
Kaohsiung #6	KS6-2002	Green soybean	2002	KSARES	
Kaohsiung #6	KS6-2003	Green soybean	2003	KSARES	
Kaohsiung #7	KS7-2002	Green soybean	2002	KSARES	Black seed coat
Kaohsiung #7	KS7-2003	Green soybean	2003	KSARES	Black seed coat
Kaohsiung selected #10	KS10-2002	Soybean	2002	AVRDC	
Five Leaf	WYB	Black soybean	2002	TDARES	Taiwan native
Heng Chun	HCB	Black soybean	2002	TDARES	Taiwan native
X Sun Foods	RS	Soybean	Purchased in 2002	USA	GMO
X-Mei Foods	YS	Soybean	Purchased in 2002	Australia	Non GMO
X Sun Foods	RBS	Black soybean	Purchased in 2002	China	Green seed coat
X Hong	ZBS	Black soybean	Purchased in 2002	South East Asian	Green seed coat
X Eagle	MBS	Black soybean	Purchased in 2002	China	Green seed coat
XX Cruz Organic Foods	SOBS	Black soybean	Purchased in 2003	USA	Organic soybean
Kaohsiung #8	KS8	Azuki bean	2002	KSARES	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PV	-	2003	Local market	

\*TDARES: 台南區農業改良場;

\*\*AVRDC: 亞洲蔬菜研究發展中心;

\*\*\*KSARES: 高雄區農業改良場

表 2、2002 與 2003 年秋作國產大豆各品種之 BBI 含量分析

Table 2. Analysis of BBI content among domestic soybeans collected in 2002 and 2003

序號	品種	BBI 含量 <sup>a)</sup> (µg/mg 粗萃蛋白)	
		2002 年	2003 年
1	TNS1	217.65 ± 7.12	251.32 ± 5.52
2	TN2	188.66 ± 8.88	ND
3	TN3	168.29 ± 7.99	246.92 ± 1.84
4	TN4	201.79 ± 6.17	202.94 ± 5.45
5	TN5	173.41 ± 6.58	244.06 ± 7.41
6	TN6	153.78 ± 3.60 <sup>b)</sup>	ND
7	KS5-TN	183.58 ± 2.10	ND
8	KS5-KS	169.99 ± 3.32	170.08 ± 2.46
9	KS6	284.16 ± 8.05	175.87 ± 8.00
10	KS7	248.24 ± 6.41	178.22 ± 4.20
11	KS10	148.61 ± 7.03	ND
12	WYB	ND	151.09 ± 5.90
13	HCB	ND	246.53 ± 5.98
<i>F</i> values <sup>c)</sup>		115.64***	156.01***

a) Data are means ± S.D. for 3 trials

b) n=2

c) Levels of significance of ANOVA; \*\*\*, significant at 0.1 %

表 3、不同採收年份之青仁黑豆台南三號BBI含量分析

Table 3. The content of BBI on black soybean variety of Tainan 3 in different crop years

品種	採收年份	BBI 含量(藍染定量) (µg/mg 粗萃蛋白) <sup>a)</sup>
TN3	1999	206.77 ± 9.94
	2000	204.41 ± 8.46
	2001	143.80 ± 5.19
	2002	168.29 ± 7.99
	2003	246.92 ± 1.84
<i>F</i> values <sup>b)</sup>		88.62***

a) Data are means ± S.D. for 3 trials

b) Levels of significance of ANOVA; \*\*\*, significant at 0.1 %

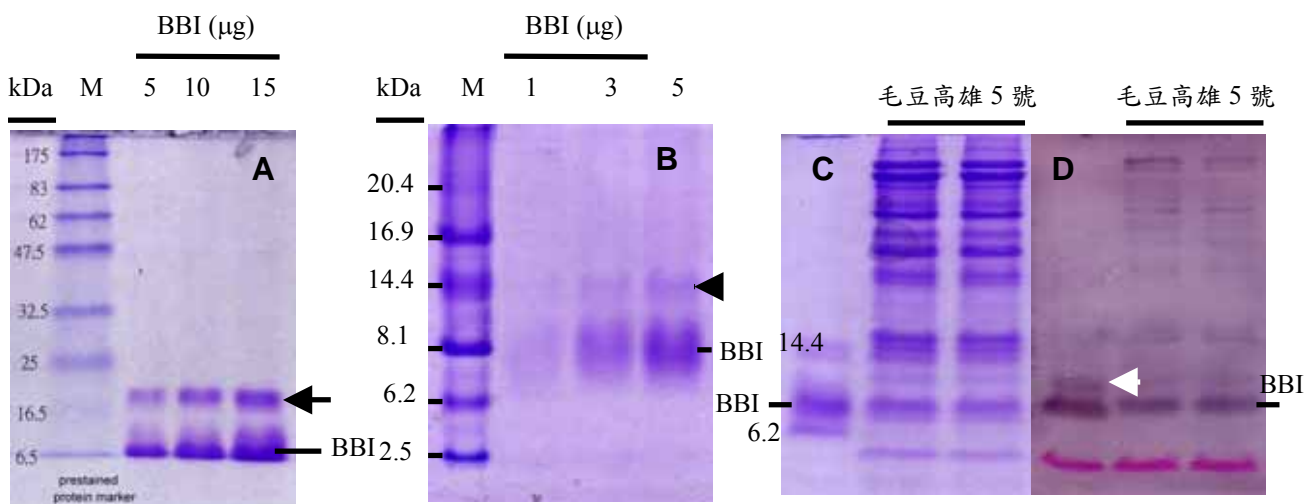


圖 1、大豆 BBI 之 SDS-PAGE 電泳藍染及西方黑點分析

Fig 2. SDS-PAGE protein gel electrophoresis and western analysis of soybean BBI

A. 15% SDS-PAGE B. 20% SDS-PAGE C. 15% SDS-PAGE D. 西方黑點分析

M = protein marker, A 和 B 圖之 BBI 樣品用量如標示, C 和 D 圖之 BBI 樣品用量為 3  $\mu\text{g}$ , 毛豆高雄 5 號樣品用量為 15  $\mu\text{g}$ 。

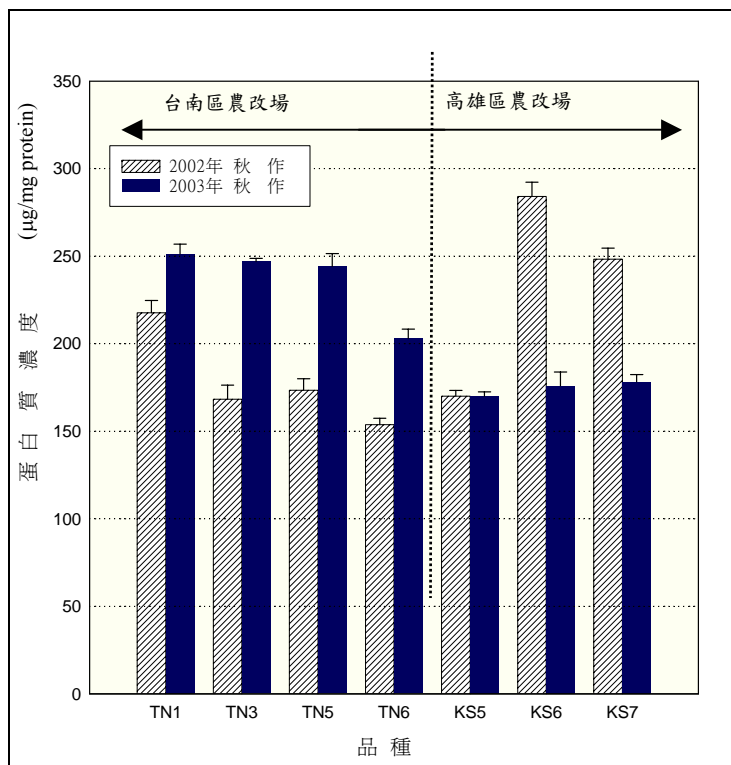


圖2、2002年及2003年秋作國產大豆各品種之BBI含量比較

Fig 2. Comparison of the BBI content among domestic soybeans in two crop years