

DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA, JERZY R. WARCHALEWSKI

**ZBOŻOWE, BIAŁKOWE INHIBITORY ENZYMÓW
HYDROLITYCZNYCH I ICH ZNACZENIE.
CZĘŚĆ II: BIAŁKOWE INHIBITORY PROTEINAZ**

Streszczenie

W pracy przedstawiono przegląd danych literaturowych na temat zbożowych, białkowych inhibitorów enzymów proteolitycznych. Szczególną uwagę zwrócono na ich właściwości, formy wielorakie, a także ich znaczenie biochemiczne, fizjologiczne i żywieniowe.

Wstęp

W ziarnie zbóż występują w znacznych ilościach białkowe substancje o aktywności antyproteolitycznej [2, 26]. Substancje te wykazują głównie aktywność antytrypsynową w odniesieniu do enzymów ssaków, owadów i bakterii. Wykazano jednak również obecność inhibitorów endogennych proteinaz [11, 28]. Obecność inhibitorów białkowych proteinaz stwierdzono w ziarniakach prawie wszystkich gatunków zbóż, z wyjątkiem sorgo [9]. Występują one zarówno w bielmie, jak i w zarodkach. Ich aktywność związana jest z białkami o niskich masach cząsteczkowych występujących w albuminach i globulinach zbóż.

Ilość inhibitorów w ziarnie zależy głównie od gatunku i odmiany zboża. Jest też w znacznym stopniu kształtowana przez warunki klimatyczno-glebowe i czas przechowywania po zbiorze [32]. Wyższą aktywność antytrypsynową stwierdzono w obrębie zbóż jarych niż ozimych [12]. Badając ziarno pszenicy, żyta i pszenżyta, stwierdzono największą aktywność inhibitora trypsyny w ziarnie żyta, zaś najmniejszą w ziarnie pszenicy [9, 21, 32]. Jego aktywność w ziarnie pszenżyta jest zbliżona do aktywności w ziarnie żyta.

Inhibitory proteinaz ziarniaków pszenicy

Wyizolowane z ziarna pszenicy inhibitory proteinaz wykazują wysoką aktywność w stosunku do trypsyny oraz proteinaz bakteryjnych i pleśniowych. Nie hamują wcale lub tylko w niewielkim stopniu proteinazy endogenne oraz alfa-chymotrypsynę, papainę i pepsynę [3, 18]. Badania wykazały, że białko hamujące trypsynę stanowi 0,16% wszystkich białek ziarniaków pszenicy [19]. Białko to jest monomerem o masie cząsteczkowej 9105 Da i punkcie izoelektrycznym 9,35; jest odporne na działanie podwyższonych temperatur, gdyż w 80°C nie traci swojej aktywności. Należy do inhibitorów trypsyny typu argininowego, a najwyższą aktywność wykazuje przy pH 4,4. Ma małe znaczenie antyodżywcze, gdyż jego aktywność antyproteolityczna jest niewielka.

Ziarno pszenicy zawiera również inhibitory trypsyny o masach cząsteczkowych 12300 Da [4] oraz 22000 Da i 37000 Da [5]. Natomiast kielki pszenne zawierają co najmniej pięć inhibitorów o masach cząsteczkowych od 10000 Da do 17000 Da [15].

Jak już wspomniano w części I, ziarno pszenicy zawiera również inhibitory wykazujące aktywność dwufunkcyjną, tzn. hamujące aktywność endogennych α -amylaz oraz aktywność proteinazy bakteryjnej – subtilizyny (inhibitor WASI) lub trypsyny z trzustki wieprzowej (inhibitor A/T-WI) [22].

Inhibitory proteinaz ziarniaków żyta

Aktywność antyproteolityczną ziarniaków żyta badał Polanowski [23, 25]. Całkowita aktywność inhibitorowa żyta zgromadzona jest w endospermie [31]. Zdaniem Polanowskiego ekstrakt z białek endospermy żyta nie wykazuje aktywności proteolitycznej, ponieważ enzym jest związany z inhibitorem, a aktywność proteolityczna wystąpi po dysocjacji kompleksu enzym – inhibitor na dwa komponenty. Mikola i Kirsi [14] określili masę cząsteczkową inhibitora z żyta – wynosi ona 43500 Da. Centrum aktywne tego inhibitora stanowi wiązanie peptydowe Arg-Ala [3].

Dojczew i Kączkowski [cyt. za 7] uważają, że typowy inhibitor izolowany z żyta hamuje aktywność trypsyny, subtilizyny oraz endopeptydazy wołka zbożowego i skórka zbożowego, a nie hamuje aktywności chymotrypsyny i peptydaz roślinnych. Ponieważ nie hamuje równocześnie działania alfa-amylaz, nie należy do grupy inhibitorów dwufunkcyjnych.

Inhibitory proteinaz ziarniaków pszenżyta

Wyizolowane z ziarna pszenżyta inhibitory trypsyny hamowały działanie proteinazy pochodzenia bakteryjnego i pleśniowego, nie hamowały natomiast aktywności alfa-chymotrypsyny, papainy i pepsyny [17]. W celu identyfikacji rodziny inhibitorów trypsyny w ziarnie pszenżyta zastosowano immunoenzymatyczną metodę ELISA [18].

Do identyfikacji użyto monoklonalne przeciwciała mysie, wyhodowane przeciw następującym antygenom: inhibitor trypsyny z pszenicy, inhibitor trypsyny z żyta, trzy różne inhibitory trypsyny z jęczmienia. Stwierdzono obecność inhibitorów trypsyny wszystkich badanych rodzin, jednakże najwyższe stężenie wykazywał inhibitor z żyta.

Znaczenie inhibitorów proteinaz

Funkcja fizjologiczna naturalnych inhibitorów białkowych nie została dotychczas w pełni wyjaśniona, mimo że stanowią one znaczną część białek roślinnych [26]. Stwierdzono, że lokalizacja wewnątrzkomórkowych inhibitorów białkowych wiąże się ściśle z ich funkcją fizjologiczną. Mogą one być wykorzystywane jako białko zapasowe lub regulować działanie endogennych proteinaz, a także kontrolować metabolizm białek. Biosynteza inhibitorów dokonuje się podczas rozwoju ziarna, wyprzedzając nagromadzanie się białek zapasowych [30]. Zawartość ich w tkankach młodych jest większa niż w starych. Przypuszcza się, że zgromadzone we wczesnym okresie formowania ziarna w bielmie inhibitory są jednym z czynników chroniących syntetyzujące się białka zapasowe przed niepożądaną proteolizą, a tym samym odgrywają ważną rolę w metabolizmie białek [10].

W ziarniakach zbóż funkcje inhibitorów proteinaz sprowadzają się nie tylko do regulacji procesów proteolizy, lecz także do współdziałania w kształtowaniu mechanizmów obronnych przed patogenami i szkodnikami. Ogromne znaczenie może mieć stwierdzona zdolność hamowania aktywności niektórych proteinaz bakteryjnych i pleśniowych przez białkowe inhibitory zbóż [16]. Wskazywałoby to na funkcję fizjologiczną tego białka jako specyficznego roślinnego związku chroniącego roślinę przed infekcją wirusową lub bakteryjną [27].

W okresie anabiozy wiele nasion charakteryzuje się wysoką aktywnością antyproteolityczną [29]. Stwierdzono, że inhibitory w nich występujące hamują głównie działanie proteinaz owadów, które są szkodnikami tych nasion, stanowią więc ważny mechanizm obronny rośliny [8].

Badania wykazały, że wyższa aktywność antytrypsynowa ziarna odmian zbóż powodowała wzrost intensywności żerowania wołka zbożowego objawiający się przyrostem wytworzonego pyłu [21]. Wydzielanie enzymów proteolitycznych u wołka zbożowego nie odbywa się w sposób ciągły i jest uzależnione od pobranego pokarmu [1], stąd podwyższona aktywność antytrypsynowa pokarmu mogła hamować trypsynę wydzielaną przez tego owada. Dlatego zrozumieliśmy wydaje się zwiększenie intensywności żerowania chrząszczy w przypadku odmian ziarna zbóż o podwyższonej aktywności antytrypsynowej.

Powszechnie wiadomo, że inhibitory proteinaz są czynnikami ograniczającymi możliwość wykorzystania surowców na cele paszowe. Aktywność antytrypsynowa zbóż jest niższa w porównaniu z roślinami strączkowymi. Jednakże stwierdzono, że

strawność białka ziarna pszenicy, pszenżyta, jęczmienia i żyta przez drób oraz pszenicy, jęczmienia i owsa przez trzodę chlewną jest ujemnie skorelowana z aktywnością inhibitorów trypsyny [12]. Natomiast Rakowska [24] w swoich badaniach wykazuje, że aktywność antytrypsynowa ziarna zbóż nie jest skorelowana ze strawnością białka przez zwierzęta.

Znaczenie inhibitorów proteinaz dla organizmu człowieka jest trudne do ustalenia ze względu na niemożność przeprowadzenia doświadczeń *in vivo*. Ludzka trypsyna występuje w dwóch formach: anionowej i kationowej. Badania wykazały, że tylko anionowa forma trypsyny hamowana jest przez inhibitory [13], zaś forma kationowa, która zawiera ponad 2/3 całkowitej aktywności, jest niewrażliwa na ich działanie [6]. Na podstawie powyższych obserwacji można przypuszczać, że trzustka ludzka jest niewrażliwa na wpływ inhibitorów.

LITERATURA

- [1] Baker J.E., Woo S.M., Byrd R.V.: Ultrastructural features of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes of distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. *Can. J. Zool.*, **62**, 1984, 1251-1259.
- [2] Birk Y.: Protein proteinase inhibitors in food. Proc. of the Int. Euro Food Tox IV Conf. Bioactive Substances in Food of Plant Origin. Ed. by H. Kozłowska, J. Fornal, Z. Zduńczyk. Olsztyn 1994, 202-213.
- [3] Boisen S., Djurtoft R.: Trypsin inhibitor from rye endosperm. Purification and properties. *Cereal Chem.*, **58**, 1981, 194-198.
- [4] Boisen S., Djurtoft R.: Trypsin inhibitor from wheat endosperm. Purification and characterization. *Cereal Chem.*, **58**, 1981, 460-463.
- [5] Chang C. R., Tsen C.C.: Isolation of trypsin inhibitors from rye, triticale and wheat samples. *Cereal Chem.*, **58**, 1981, 207-210.
- [6] Figarella C., Negri G.A., Guy O.: The two human trypsinogens. Inhibition spectra the two human trypsins derived from their purified zymogens. *Eur. J. Biochem.*, **53**, 1975, 457-466.
- [7] Gąsiorowski H., Kączkowski J., Kołodziejczyk P.: Skład chemiczny ziarna żyta. W: *Żyto chemia i technologia*. Pod redakcją H. Gąsiorowskiego. PWR i L Poznań, 1994, 52-107.
- [8] Green T.R., Ryan C.A.: Wound induced proteinase inhibitor in plant leaves; A possible defense mechanismes against insects. *Science*, **175**, 1972, 776-777.
- [9] Grzesiuk S., Kulka K.: *Biologia ziarniaków zbóż*. PWN Warszawa, 1988.
- [10] Janicki J., Warchalewski J., Skupin J., Kowalczyk J.: Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego. *Post. Biochem.*, **16**, 1970, 101-118.
- [11] Jones B.L.: Purification and partial characterization of low MW Barley and malt proteins that inhibit malt endoproteinases. Proc. of ESEGP-1. The first European Symposium of enzymes and grain processing. Noordwijkerhout 1997, 257-258.
- [12] Korol W., Jaśkiewicz H., Nieścior H., Przegalińska B., Matyka S.: Aktywność antytrypsynowa zbóż krajowych. *Biul. Inf. Przem. Pasz.*, **1**, 1992, 47-63.

- [13] Mallory P.A., Travis J.: Human pancreatic enzymes. Characterization of anionic trypsin. *Biochemistry*, **12**, 1973, 2847-2851.
- [14] Mikola J., Kirsi M.: Differences between endospermal and embryonal trypsin inhibitors in barley, wheat and rye. *Acta Chem. Scand.*, **26**, 1972, 787-795.
- [15] Mitsunaga T.: Isolation and characterization of trypsin inhibitors from wheat germ. *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 1969, 43-52.
- [16] Mossor G.: Identyfikacja i charakterystyka biochemiczna substancji antyodżywczych typu inhibitorów trypsyny ziarniaków pszenicy. Praca doktorska AR w Poznaniu, 1986.
- [17] Mossor G.: Identyfikacja substancji antyodżywczych typu inhibitorów trypsyny w wybranych odmianach pszenżyta. Materiały XXIV Sesji Naukowej KTiChŻ PAN, Wrocław, 1993, 292.
- [18] Mossor G.: Zastosowanie metody ELISA do identyfikacji inhibitorów trypsyny w wybranych odmianach pszenżyta. Materiały XXX Zjazdu P.T. Bioch., Szczecin, 1994, 267.
- [19] Mossor G., Skupin J.: Isolation and identification of trypsin inhibitors from wheat grain, Beta variety. *Die Nahrung*, **34**, 1990, 115-123.
- [20] Mossor G., Skupin J.: Biochemical characteristics of trypsin inhibitor from wheat grain, Beta variety. *Die Nahrung*, **34**, 1990, 431-438.
- [21] Piasecka-Kwiatkowska D.: Rola rodzimych inhibitorów enzymów hydrolitycznych w kształtowaniu odporności ziarna zbóż o zróżnicowanej jakości na owadzie szkodniki magazynowe. Praca doktorska AR w Poznaniu, 1999.
- [22] Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R.: Zbożowe, białkowe inhibitory enzymów hydrolitycznych i ich znaczenie. Część I. Białkowe inhibitory alfa-amylaz. *Żywność* (zaakceptowano do druku 2000).
- [23] Polanowski A.: Preparacja oraz charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna inhibitorów z ziarniaków żyta (*Secale cereale* L.). *Acta Univ. Vratislav.*, **371**, 1976, 3-28.
- [24] Rakowska M.: Antinutritive compounds in rye grain. *Hod. Rośl. Aklim. Nasien.*, **38**, 1994, 21-42.
- [25] Richardson M.: Protein inhibitors of enzymes. *Food Chem.*, **6**, 1981, 235-253.
- [26] Ryan C.A.: Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 1973, 173-196.
- [27] Ryan C.A.: Proteinase inhibitors. The proteins and nucleic acids. In: *The biochemistry of plants*. Eds by Stumpf P.K., Conn E.E. Academic Press, N.Y., **6**, 1981, 321-345.
- [28] Shain Y., Meyer A.M.: Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. *Physiol. Plantarum*, **18**, 1965, 853-859.
- [29] Sobieraj B., Kulka K., Rejowski A.: Aktywność inhibitorów trypsyny w dojrzewającym, spoczynkowym i kiełkującym ziarnie jęczmienia jarego. *Biul. IHAR*, **140**, 1980, 17-22.
- [30] Tanner D.G., Reinbergs E.: Genetic analyses of the trypsin inhibitor activity of triticale and rye. *Z. Pflanzenzüchtg.*, **88**, 1982, 177-184.
- [31] Tan-Wilson A.L., Wilson K.A.: Nature of proteinase inhibitors released from soyabeans during imbibition and germination. *Phytochemistry*, **21**, 1982, 1547-1551.
- [32] Warchalewski J.R., Kuśnierz R., Piasecka-Kwiatkowska D., Klockiewicz-Kamińska E., Madaj D., Gralik J.: Quantitative determinations of antyamylolytic and antyproteolytic activities as well as gluten content in new lines of cereal seeds. *Sci. Pap. Agric. Univ. Pozn. Food Sci. Technol.*, **2**, 1998, 49-59.

**THE CEREAL PROTEIN INHIBITORS OF HYDROLYTIC ENZYMES AND THEIR ROLE
PART II
PROTEIN INHIBITORS OF PROTEINASES**

S u m m a r y

The present state of knowledge on cereal proteinacious inhibitors of proteolytic enzymes is reviewed. Particular attention was given on their properties, multiple forms as well as significance from nutritional, physiological and biochemical point of view. ☒

KOMUNIKAT

W dniach 8–12 lipca 2001 r. odbędzie się w Krakowie 4. Europejska Konferencja AEP nt.: „Produkcja i wykorzystanie nasion strączkowych”. Współorganizatorami Konferencji są: Wydział Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Krakowie oraz Oddział Małopolski PTTŻ.

Oficjalnym językiem Konferencji będzie angielski. W trakcie konferencji przewidzianych jest: 9 sesji plenarnych, sesja plakatowa oraz warsztaty tematyczne. Warsztaty będą prowadzone w formie dyskusji w 17 małych grupach.

Informacje dotyczące Konferencji można uzyskać bezpośrednio w Komitecie Organizacyjnym: tel.: (012) 411-78-88;
e-mail: rrpisule@cyf-kr.edu.pl lub rtsurowk@cyf-kr.edu.pl.