

DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA, JERZY R. WARCHALEWSKI

**ZBOŻOWE BIAŁKOWE INHIBITORY ENZYMÓW
HYDROLITYCZNYCH I ICH ZNACZENIE
CZĘŚĆ I. BIAŁKOWE INHIBITORY ALFA-AMYLAZ**

Streszczenie

W ziarnie zbóż występują w znacznych ilościach białkowe substancje o charakterze inhibitorów enzymów hydrolitycznych.

Pomimo, iż występowanie tych substancji w ziarnie zbóż stwierdzono już w latach trzydziestych, to do tej pory nie udało się dokładnie ich poznać. W pracy tej scharakteryzowano inhibitory enzymów amylolytycznych występujące w ziarnie pszenicy, żyta i pszenżyta oraz przedstawiono współczesne poglądy na temat ich znaczenia.

Wstęp

Ziarno zbóż jest jednym z podstawowych źródeł pożywienia człowieka dostarczającym jego organizmowi 56% energii oraz 50% białka. Dlatego od dawna próbuje się dokładnie poznać, a następnie racjonalnie wykorzystać jego właściwości. Wiele z nich już poznano, lecz nadal pozostają liczne niewiadome. Do takich z całą pewnością należy jednoznaczne określenie roli rodzimych białek zbóż o właściwościach hamujących działanie enzymów hydrolitycznych różnego pochodzenia. Białka te występują w ziarnie w znacznych ilościach i przypisuje się im różnorodne funkcje [1, 7, 10, 15, 29, 33, 36, 39, 46, 50, 56]. Uważa się, że w ziarnie zbóż występują dwa rodzaje inhibitorów alfa-amylaz [45]:

- regulujące – znajdujące się głównie w otrębach, hamujące tylko działanie alfa-amylazy specyficznej dla kiełkującego ziarna,
- obronne – występujące głównie w endospermie, hamujące tylko działanie alfa-amylaz egzogennych.

Inhibitory endogennych alfa-amylaz zbóż

Pierwsza praca donosząca o występowaniu w gryce związków o aktywności hamującej aktywność rodzimych amylaz ukazała się już w latach trzydziestych [9]. Jednakże dopiero od początku lat siedemdziesiątych rozpoczyna się ożywiony okres badań nad inhibitorami alfa-amylaz zbóż. Wskazano po raz pierwszy na hamowanie aktywności endogennej alfa-amylazy pszenicy przez trzy termostabilne białka rozpuszczalne typu albumin, wyekstrahowane z tego ziarna [47]. Następnie stwierdzono występowanie i przebadano właściwości inhibitorów endogennych alfa-amylaz w innych zbożach [39, 51]. Wyizolowano, oczyszczono i dobrze poznano budowę i właściwości inhibitorów rodzimych alfa-amylaz z ziarna jęczmienia [25, 55], pszenicy [26, 48, 49, 51], pszenżyta [58] i żyta [13, 45]. Wśród tych inhibitorów, inhibitory występujące w ziarnie pszenicy (oznaczone symbolami WASI, A/T-WI), inhibitor występujący w jęczmieniu (oznaczony symbolem BASI), a także dwa inhibitory otrzymane z pszenżyta wykazywały aktywność dwufunkcyjną [51, 58]. Dodatkowo inhibitory WASI i BASI oraz te z pszenżyta hamowały aktywność bakteryjnej proteiny – subtilizyny, a inhibitor A/T-WI hamował działanie trypsyny z trzustki wieprzowej. Aktywność antytrypsynowa inhibitora A/T-WI przynajmniej częściowo tłumaczy, dlaczego ekstrakty uzyskane z ziarna pszenicy, w których stwierdzono hamujące działanie wobec rodzimych alfa-amylaz, również wykazywały aktywność antytrypsynową [50, 51, 53]. Badanie kinetyki hamowania sugeruje odwracalny, niewspółzawodniczy charakter inhibicji [1]. Endogenne inhibitory alfa-amylaz charakteryzują się dość znaczną termostabilnością.

Inhibitory egzogennych alfa-amylaz ziarniaków pszenicy

Ziarno pszenicy zawiera wiele pokrewnych białek wykazujących aktywność hamującą wobec alfa-amylaz ssaków i owadów, lecz nieaktywnych w stosunku do alfa-amylaz roślinnych, bakteryjnych i grzybowych. Deponte i wsp. [10], zaproponowali podział inhibitorów alfa-amylaz występujących w albuminach heksaploidalnych pszenic. Z ziarna pszenicy uzyskano trzy albuminowe frakcje, o masach cząsteczkowych 60000, 24000 i 12000 Da, w których występowały inhibitory alfa-amylaz. Białka o masie cząsteczkowej 12000 Da hamują działanie różnych alfa-amylaz owadów i na podstawie ruchliwości elektroforetycznej głównego składnika są określane jako rodzina izoinhibitorów „0,28” [41]. W jej składzie wyodrębniono liczne inhibitory oznaczone: 0,28; 0,32; 0,35; 0,39; 0,48 [41], AmI₁ [38]; 0,30; 0,42 [35]. Łączy je podobieństwo składu aminokwasowego, właściwości fizykochemicznych i specyficzności inhibitorowej [39].

Grupa białek o masie cząsteczkowej 24000 Da hamuje działanie alfa-amylaz ludzkich i owadzych, a na podstawie ruchliwości elektroforetycznej głównego składni-

ka jest określana jako rodzina izoinhibitorów „0,19” [10]. Do tej grupy zalicza się inhibitory AmI₂ [38], inhibitory I i II [37], In2 i In3 [28], inhibitor 0,53 [22], inhibitor 0,55 [14]. Wszystkie frakcje białek należące do tej rodziny dysocjują na dwa monomery o masie cząsteczkowej 12000 Da. Na podstawie oznaczonej sekwencji aminokwasów stwierdzono znaczne podobieństwo w budowie monomerów. Niewielkie różnice w ich składzie wyjaśniają fakt różnej mobilności elektroforetycznej poszczególnych dimerów [21].

Trzecią rodzinę inhibitorów stanowi albuminowa frakcja o masie cząsteczkowej 60000 Da, hamująca głównie alfa-amylazy ludzkie [31]. Po oczyszczeniu [28] stwierdzono, że frakcja ta składa się z czterech podjednostek, a ruchliwość elektroforetyczna głównego składnika wynosi 0,45. Również inhibitory należące do tej frakcji podlegają odwracalnej dysocjacji do monomerów o masie cząsteczkowej 12000 Da [10].

Chociaż wymienione grupy izoinhibitorów różnią się między sobą niektórymi właściwościami, zauważalne są również liczne podobieństwa pomiędzy nimi. Badania fizykochemiczne i składu aminokwasowego dwóch grup izoinhibitorów („0,19” i „0,28”) wykazały, że oba mają taką samą temperaturę denaturacji 93°C [42], podobną zawartość mostków dwusiarczkowych (około 5 mostków przypada na monomer 12000 Da) i cukrów redukujących (1 mol cukrów przypada na monomer 12000 Da), wykazują identyczną entalpię denaturacji i odporność na ekstremalne pH [30, 32]. Analiza sekwencji aminokwasów wskazuje również na znaczne podobieństwo tych inhibitorów [17, 21]. Wynika z niej, że albuminowe inhibitory są kodowane przez stosunkowo niewielką liczbę strukturalnie spokrewnionych genów, różniących się między sobą często tylko jednym nukleotydem [39].

Nieliczni badacze donoszą o występowaniu w frakcji gliadynowej zbóż inhibitorów alfa-amylaz [44, 52]. Silano [39] uważa, że użycie do ekstrakcji typowych rozpuszczalników dla frakcji gliadynowych (70% etanol, roztwory kwasów) nie jest wystarczającym dowodem na to, że inhibitory te są pochodzenia gliadynowego. Rozpuszczalniki te mogą również ekstrahować albuminy z ziarna zbóż [29]. Analiza elektroforetyczna frakcji białek wymytych z ziarna pszenicy oraz badania ich aktywności inhibitorowej sugerują, że aktywność w białkach typu gliadyn może pochodzić od zaadsorbowanych w tej frakcji albumin [20, 54].

Inhibitory egzogennych alfa-amylaz ziarniaków żyta

Kneen i Standstedt [18, 19] pierwsi zidentyfikowali białkowy inhibitor egzogennych amylaz w życie, aktywny w stosunku do alfa-amylaz śliny ludzkiej, trzustki oraz alfa-amylaz bakteryjnych. Strumeyer [43] częściowo oczyścił inhibitor alfa-amylaz z żyta, a Marshall [23, 24] wykazał istnienie dwóch inhibitorów alfa-amylaz w ogrzewanych ekstraktach z mąki żytniej. Pierwszy z nich był aktywny w odniesieniu do alfa-amylaz trzustki ludzkiej i wieprzowej oraz larw mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*).

tor). Drugi wykazywał aktywność wobec alfa-amylaz śliny ludzkiej, larw mącznika, młynarka i bakterii *Bacillus subtilis*. Oba inhibitory nie wykazywały aktywności w stosunku do endogennych alfa-amylaz. Natomiast Granum [13] wyodrębnił inhibitor z ziarna żyta i określił jego masę cząsteczkową (28000 Da). Ponadto stwierdził, że składa się on z dwóch podjednostek, jego ruchliwość elektroforetyczna wynosi 0,42, a punkt izoelektryczny wynosi 5,8. Wyodrębniony inhibitor hamował działanie alfa-amylazy śliny ludzkiej oraz trzustki wieprzowej. Pod względem specyficzności hamowania, fizykochemicznych właściwości i składu aminokwasowego inhibitory te są podobne do inhibitora „0,19” pszenicy [14].

Inhibitory egzogennych alfa-amylaz ziarniaków pszenżyta

W ziarnie pszenżyta stwierdzono obecność sześciu białkowych izoinhibitorów alfa-amylaz [16, 58]. Dla dwóch z nich udowodniono dwufunkcyjny charakter inhibicji [58]. Ich właściwości były podobne do endogennego dwufunkcyjnego inhibitora WASI otrzymanego z pszenicy. Wykazywały one aktywność wobec rodzimych alfa-amylaz i subtilizyny, natomiast nie hamowały aktywności alfa-amylaz bakteryjnych, śliny ludzkiej i trypsyny. Dwa inne izoinhibitory, o masach cząsteczkowych 39200 i 29200 Da, działają specyficznie w stosunku do alfa-amylaz śliny ludzkiej oraz trzustki wieprzowej, nie hamują natomiast działania endogennych amylaz oraz alfa-amylaz bakteryjnych [16].

Znaczenie inhibitorów alfa-amylaz

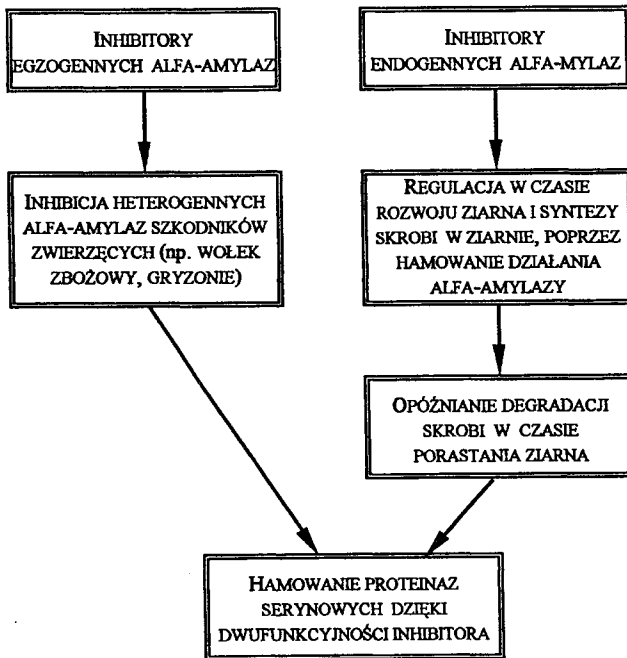
Biologiczne funkcje zbożowych inhibitorów endogennych i egzogennych alfa-amylaz przedstawiono na rysunku 1. Rola tych pierwszych sprowadza się do regulacji endogennych procesów enzymatycznych, natomiast tych drugich to obrona przed czynnikami zewnętrznymi.

Inhibitory mogą np. zwiększać odporność roślin na szkodniki [27, 36, 50, 56].

Wykazano, że dodanie ekstraktu białkowego uzyskanego z otrąb pszennych do sztucznie spreparowanych pokarmów powoduje wzrost śmiertelności larw mącznika, młynarka (*Tenebrio molitor*) [3]. Hipotezę, że albuminowe inhibitory występujące w pszenicy prowadzą do zwiększenia odporności na owady, potwierdzili Silano i wsp. [40]. Wykazali oni, że enzymy trawienne większości owadów, które atakują ziarno i mąkę pszenną, mają wysoką aktywność amylolityczną, która może być hamowana przez albuminy pszenicy. W przypadku owadów, które normalnie nie żerują na pszenicy takiej zależności nie zaobserwowano.

Stwierdzono, że aktywność natywnej alfa-amylazy w przewodzie pokarmowym wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae*) jest 3 razy wyższa niż u wołka zbożowego (*Sitophilus granarius*) i 8 razy wyższa niż u wołka kukurydzianego (*Sitophilus zeamais*)

[4]. Daje to przewagę adaptacyjną temu szkodnikowi w przypadku żerowania na pokarmie zawierającym inhibitory alfa-amylaz. Zaobserwowano, że średni czas rozwoju larw wołka ryżowego na ziarnie odmian o wysokiej i niskiej zawartości inhibitorów alfa-amylaz jest różny (odpowiednio $36,6 \pm 0,1$ i $35,9 \pm 0,2$ dni) [5]. Choć opóźnienie rozwoju w przypadku ziarna o wyższej zawartości inhibitorów z pozoru wydaje się niewielkie (zaledwie 0,7 dnia), to jednak powoduje znaczną, bo wynoszącą 20,9%, redukcję chrząszczy po 180 dniach przechowywania ziarna.



Rys. 1. Biologiczne funkcje zbożowych inhibitorów alfa-amylaz [12].

Fig. 1. Biological functions of alpha-amylase inhibitors in cereals [12].

Proces trawienia uzależniony jest także od kształtu, rozmiarów i własności fizycznych ziaren skrobi [6]. Wołek zbożowy (*Sitophilus granarius*) rozkłada 15,9 razy szybciej skrobię kukurydzianą niż ziemniaczaną. Duże ziarenka skrobi pszennej (15–20 μm) są 2,4 razy bardziej wrażliwe na rozkład przez enzymy układu trawiennego owadów niż małe (5–10 μm).

W ostatnich latach badania koncentrują się na ustaleniu składu chemicznego i struktury przestrzennej inhibitorów oraz badaniu ich aktywności w stosunku do enzymów trawiennych owadów i człowieka. Znalaziono inhibitory w nasionach fasoli [34]

o szczególnie wysokiej aktywności wobec enzymów trawiennych niektórych szkodników magazynowych. Wyizolowano z ziarna pszenicy cztery związki o właściwościach inhibitorów, z których dwa hamują aktywność alfa-amylaz wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae*), trojszyka ulca (*Tribolium confusum*) i mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), ale nie hamują działania alfa-amylaz człowieka [11]. Ich działanie na owady po dodaniu do pokarmu objawia się wydłużeniem czasu rozwoju i jest prawdopodobnie czynnikiem selekcyjnym w pokonywaniu barier pokarmowych przez owady. Stosując metody inżynierii genetycznej, można otrzymać ziarno zbóż zawierające szczególnie wysoki poziom inhibitorów aktywnych w stosunku do owadzich alfa-amylaz trawiennych. Utrudni to rozwój tych szkodników powodujących ogromne straty w czasie magazynowania ziarna, a nie zmniejszy jego wartości odżywczych.

Obiecujące wydaje się zastosowanie wiedzy o białkowych inhibitorach alfa-amylaz ziarna zbóż w pracach hodowlanych nad selekcją odmian żyta, pszenicy i pszenżyta. odpornych na porastanie [1]. Porośnięte ziarno ze względu na wysoką aktywność alfa-amylazy traci zdolność kiełkowania, a mąka otrzymana z takiego ziarna ma obniżoną wartość technologiczną. Odmiany odporne na porastanie charakteryzują się wyższą zawartością inhibitorów, a niższą zawartością alfa-amylazy w ziarnie w stosunku do odmian wrażliwych [2]. Aby uzyskać odporne odmiany dokonano przeniesienia genu kodującego białko inhibitora z ziarna jęczmienia do ziarna pszenicy [15].

Wyniki niektórych prac sugerują, że naturalne inhibitory alfa-amylaz mogą wspomagać bądź wręcz umożliwić wytworzenie chleba dobrej jakości z mąki uzyskanej z ziarna porośniętego, o zbyt wysokiej aktywności alfa-amylaz [57]. Białkowy inhibitor wyizolowany z ziarna zbóż działa specyficznie w stosunku do alfa-amylazy, a nie oddziałuje na strukturę glutenu, dlatego wydaje się być odpowiednim, lepszym od innych, czynnikiem powodującym inaktywację alfa-amylazy w porośniętym ziarnie.

Dwufunkcyjny charakter inhibitorów ziarna zbóż, wyrażający się zdolnością do hamowania alfa-amylaz oraz proteinaz bakteryjnych i trypsyny, wskazuje na ich funkcję ochronną przed atakiem drobnoustrojów podczas kiełkowania i późniejszego porostania, kiedy to przez otwarte pory w okrywie owocowo-nasiennej możliwość ich przenikania jest znacznie ułatwiona [1].

Liczne badania żywieniowe z zastosowaniem zbożowych diet bogatych w inhibitory alfa-amylaz wykazały, że ich aktywność biologiczna ma wyraźny wpływ na metabolizm skrobi w tych organizmach. Preparaty inhibitorów alfa-amylaz mogą być użyteczne w leczeniu cukrzycy insulinozależnej i insulinoniezależnej oraz otyłości poprzez efektywne hamowanie alfa-amylazy trzustki wydzielanej do dwunastnicy [8, 50]. Z drugiej strony zaobserwowano, że długotrwała dieta bogata w aktywne inhibitory może doprowadzić do przerostu trzustki i jej zmian histologicznych, które świadczą o

degeneracji tego organu. Dlatego z punktu widzenia toksykologii, zbożowe inhibitory alfa-amylaz należy uznać za związki szkodliwe dla zdrowia. Ma to szczególne znaczenie przy produkcji żywności dla niemowląt czy osób chorych z objawami niedostatecznego wytwarzania własnych enzymów.

LITERATURA

- [1] Andrzejczuk-Hybel J.: Białkowe inhibitory alfa-amylazy ziarniaków zbóż. *Wiadomości Botaniczne*, **39**, 1995, 59-68.
- [2] Andrzejczuk-Hybel J., Bartoszewicz K., Bielawski W., Kączkowski J.: Changes of activity of some hydrolase during Triticale grain development differentiated in pre-harvest sprouting resistance. *Acta Physiol. Plant.*, **16**, 1994, 279-284.
- [3] Appelbaum S.W.: The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. *J. Insect. Physiol.*, **10**, 1964, 897-903.
- [4] Baker J.E., Woo S.M.: Purification, partial characterization, and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **2**, 1985, 415-428.
- [5] Baker J.E., Woo S.M., Throne J.E., Finney P.L.: Correlation of alpha-amylase inhibitor content in Eastern Soft wheats with development parameters of the rice weevil (*Coleoptera: Curculionidae*). *Environ. Entomol.* **20**, 1991, 53-60.
- [6] Baker J.E., Woo S.M.: Digestion of starch granules by alpha-amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage and detergent treatment. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **22**, 1992, 529-537.
- [7] Bedetti C., Bozzini A., Silano V., Vittozzi L.: Amylase protein inhibitors and the role of Aegilops species in polyploid wheat speciation. *Biochem. Biophys. Acta* **362**, 1974, 299-307.
- [8] Choudhury A., Maeda K., Murayama R., Dimagno E.P.: Character of a wheat amylase inhibitor preparation and effects on fasting human pancreaticobiliary secretions and hormones. *Gastroenterology*, **111**, 1996, 1313-1320.
- [9] Chrząszcz T., Janicki J.: "Sisto-amylase", ein natürlicher paralytator der amylase. *Biochem.*, **260**, 1933, 354-368.
- [10] Deponte R., Parlamenti R., Petrucci T., Silano V., Tomasi M.: Albumin alpha-amylase inhibitor families from wheat flour. *Cereal Chem.*, **53**, 1976, 805-820.
- [11] Feng G.H., Richardson M., Chen M.S., Kramer K.J., Morgan T.D., Reeck G.R.: Alpha-amylase inhibitors from wheat: amino-acid sequences and patterns of inhibition of insect and human alpha-amylases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**, 1996, 419-426.
- [12] Gabor R., Tafel A., Behnke U., Heckel J.: Studies on the germination specific alpha-amylase and its inhibitor of rye (*Secale cereale*). I. Isolation and characterization of the enzyme. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **192**, 1991, 230-233.
- [13] Granum P.E.: Purification and characterization of alpha-amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.* **2**, 1978, 103 - 120.
- [14] Granum P.E., Whitaker J.R.: Purification and characterization of alpha-amylase inhibitors in wheat (*Triticum aestivum* var. *Anza*). *J. Biochem.*, **1**, 1977, 385401.

- [15] Henry R.J., Mckinnon G.E., Haak J.C., Brennar P.S.: Use of alpha-amylase inhibitors to control sprouting. In: Preharves Sprouting in Cereals. Ed. by Walker-Simmons M., Ried J.C., 1992, 232-235.
- [16] Ida E.L., Finardi-Filho F., Lajolo F.M.: Purification and partial characterization of two proteinaceous alphaamylase inhibitors from Triticale. J. Food Biochem., **18**, 1994, 83-102.
- [17] Kashlan N., Richardson M.: The complete aminoacid sequence of a major wheat protein of alpha-amylase. Phytochemistry, **20**, 1981, 1781-1784.
- [18] Kneen E., Standstedt R.M.: An amylase inhibitor from certain cereals. J. Am. Chem. Soc., **65**, 1943, 1247.
- [19] Kneen E., Standstedt R.M.: Distribution and general properties of an amylase inhibitor in cereals. Arch. Biochem., **9**, 1946, 235-249.
- [20] Konarev A.V.: Identification of albumin 0,19 in grain proteins of cereals. Cereal Chem., **55**, 1978, 927-936.
- [21] Maeda K., Kakabayashi S., Matsubara H.: Complete amino acid sequence of an alpha-amylase inhibitor in wheat kernel. Biochem. Biophys. Acta., **828**, 1985, 213-221.
- [22] Maeda K., Takamoń Y., Oka O.: Isolation and properties of an alpha-amylase inhibitor (0.53) from wheat (*Triticum aestivum*). Agric. Biol. Chem., **46**, 1982, 2873.
- [23] Marshall J.J.: Alpha-amylase inhibitors from plants. Am. Chem. Soc. Symp. Ser., **16**, 1975, 244 - 266.
- [24] Marshall J.J.: Pancreatic alpha-amylase inhibitors in cereals. Carbohydr. Res., **57**, 1977, C27.
- [25] Mundy J., Svendsen L, Hejgaard J.: Barley alpha-amylase / subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. Carlsberg Res. Commun., **48**, 1983, 81-90.
- [26] Mundy J., Hejgaard , Svendsen L: Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous alpha-amylase and subtilisin. FEBS Lett., **167**, 1984, 210-214.
- [27] Nawrot J., Warchalewski J.R., Stasińska B., Nowakowska K.: The effect of grain albumins, globulins and gliadins on larval development and longevity and fecundity of some stored product pests. Entomol. Exp. Appl., **37**, 1985, 187-192.
- [28] O'Connor C.M., McGeeney K.F.: Isolation and characterization of four inhibitors from wheat flour which display differential inhibition specificities for human salivary and human pancreatic alpha-amylases. Biochim. Biophys. Acta, **658**, 1981, 387-396.
- [29] Pace W., Parlamenti R., Ur Rab A., Silano V., Vittozzi L.: Protein alpha-amylase inhibitors from wheat flour. Cereal Chem., **55**, 1978, 244-254.
- [30] Petrucci T., Sannia G., Parlamenti R, Silano V.: Structural studies of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors of alpha-amylase. Biochem. J., **173**, 1978, 229.
- [31] Petrucci T., Tomasi M., Cantagalli P., Silano V.: Comparison of wheat albumin inhibitor of alpha-amylase and trypsin. Phytochemistry, **13**, 1974, 2487-2495.
- [32] Petrucci T., Ur Rab A., Tomasi M., Silano V.: Further characterization studies of the alpha-amylase protein inhibitor of gel electrophoretic mobility 0,19 from the wheat kernel. Biochim. Biophys. Acta, **420**, 1976, 288.
- [33] 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.
- [34] Pueyo J.J., Morgan T.D., Ameenuddin N., Liang C., Reeck G.R., Chrispeels M.J., Kramer K.J.: Effects of bean and wheat alpha-amylase inhibitors on alpha-amylase activity and growth of stored product insect pests. Entomol. exp. appl., **75**, 1995, 237-244.
- [35] Redman D.G.: Structural studies on wheat (*Triticum aestivum*) proteins lacking phenylalanine and histidine residues. Biochem. J., **149**, 1975, 725-730.

- [36] Ryan C. A. : Proteinase inhibitors. In: Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Ed. by: G.A. Rosenthal, D.H. Janzen. Academic Press, New York, 1979, 599-618.
- [37] Saunders R.M., Lang J.A.: Alpha-amylase inhibitors in *Triticum aestivum*: Purification and physical-chemical properties. *Phytochemistry*, **12**, 1973, 1237-1241.
- [38] Shainkin R., Birk Y.: Alpha-amylase inhibitors from wheat: Isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 1970, 502-513.
- [39] Silano V.: Alpha-amylase inhibitors. In: Enzymes and their role in cereal technology. Ed. by: J.E. Kruger, D. Lineback, C.E. Stauffer. AACC Inc., 1987, 141-200.
- [40] Silano V., Furia M., Gianfreda L., Macri A., Palescandolo R., Rab A., Scardi V., Stella E., Valfre F.: Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Bioch. Biophys. Acta*, **391**, 1975, 170-178.
- [41] Silano V., Pocchiari F., Kasadra D.D.: Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 1973, 139-148.
- [42] Silano V., Zahnely J.C.: Association of *Tenebrio molitor* L. alpha-amylase with two protein inhibitors - one monomeric, one dimeric - from wheat flour. Differential scanning calorimetric comparison of heat stabilities. *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 1978, 181.
- [43] Strumeyer D.H.: Protein amylase inhibitors in the gliadin fraction of wheat and rye flour: Possible factors in coeliac disease. *Nutr. Rep. Int.*, **5**, 1972, 45-52.
- [44] Strumeyer D.H., Fisher B.R.: Purification and characterization of an amylase inhibitor from wheat gliadin. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **32**, 1973, 624.
- [45] Täufel A., Behnke U., Emmer L, Gabor R: Studies on the germination specific alpha-amylase and its inhibitor of rye (*Secale cereale*). 2. Isolation and characterization of the inhibitor. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **193**, 1991, 9-14.
- [46] Vitozzi L., Silano V.: The phylogenesis of protein alpha-amylase inhibitors from wheat seed and the speciation of polyploid wheats. *Theor. Appl. Genet.*, **48**, 1976, 279.
- [47] Warchalewski J.R.: Preliminary investigation on purification of native alpha-amylase inhibitors from durum wheat. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **24**, 1976, 559-563.
- [48] Warchalewski J.R.: Isolation and purification of native alpha-amylase inhibitors from winter wheat. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **25**, 1977, 725-729.
- [49] Warchalewski J.R.: Isolation and purification of native alpha-amylase inhibitors from malted winter wheat. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **25**, 1977, 731-735.
- [50] Warchalewski J.R.: Present-day studies on cereal protein nature alpha-amylase inhibitors. *Die Nahrung*, **27**, 1983, 103-117.
- [51] Warchalewski J.R.: Purification and characteristics of an endogenous alpha-amylase and trypsin inhibitor from wheat seeds. *Die Nahrung* **31**, 1987, 1015-1031.
- [52] Warchalewski J.R., Madaj D., Skupin J.: The varietal differences in some biological activities of proteins extracted from flours of wheat seeds harvested in 1986. *Die Nahrung*, **33**, 1989, 805-821.
- [53] Warchalewski J.R., Mossor G.M., Kokot A.: Influence of sprouts and gamma irradiation on biochemical changes in wheat grain. II. Changes in alpha-amylases inhibiting activity and in the activity of accompanying enzymes. *Acta Aliment. Pol.*, **10**, 1984, 219-229.
- [54] Warchalewski J.R., Piasecka D., Madaj D.: Czy białka ziarna pszenicy typu gliadyny wykazują aktywność biologiczną? Materiały XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin 1991, 106.
- [55] Weselake R.J., MacGregor A.W., Hill R.D.: An endogenous alpha-amylase inhibitor in barley kernel. *Plant Physiol.*, **72**, 1983, 809.
- [56] Yetter M.A., Saunders R.M., Boles H.P.: Alpha-amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. *Cereal Chem.*, **56**, 1979, 243-244.

- [57] Zawistowska U., Langstaff J., Bushuk W.: Improving effect of a natural alpha-amylase inhibitor on the baking quality of wheat flour containing malted barley flour. *J. Cereal Sci.*, **8**, 1988, 207-209.
- [58] Zawistowska U., Langstaff J., Friesen A.D.: Purification and characterisation of two double-headed Triticale iso-inhibitors of endogenous alpha-amylase and subtilisin. *J. Food Biochem.*, **13**, 1989, 215-239.

THE CEREAL PROTEIN INHIBITORS OF HYDROLYTIC ENZYMES AND THEIR ROLE PART I PROTEIN INHIBITORS OF ALPHA-AMYLASE

Summary

Cereal seeds contain a lot of protein substances which are inhibitors of hydrolytic enzymes. Although, they were discovered in the early 1930's till today remain a number of question to be answer. In this paper protein nature alpha-amylase inhibitors found in grain of wheat, rye and triticale were discussed on the grounds of the present-day knowledge. ❖