

IRENA LORENC-KUBIS

INHIBITORY TRYPSYNOWE ROŚLIN

Dojrzałe i żywotne nasiona cechuje stan spoczynku. W ciągu tego okresu nasiona nie tracą żywotności i nie są atakowane przez mikroorganizmy (Grzesiuk 1967). Przyczyną tego zjawiska jest obecność w nasionach substancji hamujących kiełkowanie.

Badania nad substancjami hamującymi procesy wzrostu oraz kiełkowania nasion sięgają końca XIX wieku, kiedy to Wiesner sugerował występowanie wewnątrz owoców jemioli inhibitorów kiełkowania. Oppenheimer (1922) był jednym z pierwszych, który eksperymentalnie próbował wykazać obecność substancji inhibitorowych w soku pomidorowym.

Wzrost zainteresowania tymi substancjami obserwuje się szczególnie w ostatnim pięćdziesięcioleciu. Przebadano szereg nasion, owoców i wydzielono z nich drobno-cząsteczkowe organiczne substancje o właściwościach inhibitorów (Ferency 1957, Sumere 1958).

Do najczęściej spotykanych inhibitorów występujących w organach spoczynkowych, a więc w nasionych, pąkach, bulwach, cebulach, kłączach należą związki cyjanowodorowe, olejki eteryczne, kwasy organiczne, aldehydy, estry, nienasycone laktony i fenole. Te ostatnie podobnie jak kumaryna są najbardziej rozpowszechnionymi inhibitorami w przyrodzie. Van Sumere (1960) uważa, że substancje fenolowe z uwagi na powszechne ich występowanie w nasionach można zaliczyć do naturalnych inhibitorów kiełkowania warunkujących stan spoczynku. Mimo wielu doniesień (Grzesiuk 1967, Hemberg 1961, Mayer i Poljakoff-Mayber 1963) odnośnie roli inhibitorów w dojrzewaniu i kiełkowaniu nasion mechanizm ich działania nie został wyjaśniony. Wielu autorów, między innymi Mayer, Poljakoff-Mayber (1963), Grzesiuk (1967) przypuszcza, że działanie ich może z jednej strony polegać na hamowaniu procesów wzrostowych przez inaktywowanie substancji wzrostowych typu auksyn, z drugiej zaś strony — na inaktywowaniu niektórych enzymów. Za przykład może służyć wpływ kumaryny na aktywność lipaz (Mayer, Poljakoff-Mayber 1963) względnie proteaz (Shain, Mayer 1965).

W ostatnich latach stwierdzono w nasionach wielu gatunków roślin obecność białek lub polipeptydów (Rackis, Sasame 1962) posiadających zdolność tworzenia

nieaktywnych kompleksów z trypsyną. Białka te przypuszczalnie mogą odgrywać pewną rolę w procesie inaktywacji własnych proteaz. Taką aktywnością charakteryzują się białka nasion sałaty (Shain, Mayer 1965) i żyta (Polanowski 1967), które inaktywują nie tylko trypsynę, ale również własną proteazę, z którą tworzą nieaktywne kompleksy.

Badania nad inhibitorami trypsynowymi roślin zostały zapoczątkowane przez Borchersa i Ackersona (1947), którzy wykazali aktywność antytrypsynową w nasionach niektórych gatunków roślin motylkowych. Od tego czasu przebadano szereg gatunków i podjęto próby wydzielenia i scharakteryzowania roślinnych inhibitorów trypsynowych.

Najlepiej zbadanym pod względem chemicznym inhibitorem trypsynowym jest wykrystalizowany i opisany przez Kunitza (1946, 1947, 1948) inhibitor z nasion soi. Inhibitor ten jest jedynym z tych inhibitorów, które posłużyły do badania mechanizmu hamowania trypsyny (Finkenstat, Laskowski 1953, 1965; Laskowski, Wu 1953; Davie, Neurath 1955; Ozawa, Laskowski 1966). Inhibitor z soi jest białkiem o masie cząsteczkowej 21000 zbudowanym z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego mostki dwusiarczkowe (Steiner 1965). Aminokwasem N-końcowym jest kwas asparaginowy, lub asparagina, natomiast C-końcowym leucyna (Davie, Neurath 1955). Inhibitor ten wykazuje aktywność zarówno w stosunku do trypsyny, jak i α chymotrypsyny, przy czym aktywność w stosunku do tej drugiej proteazy jest znacznie mniejsza (Birk 1961).

W nasionach soi stwierdzono obecność kilku inhibitorów trypsynowych. W 1961 r. Birk wyizolował z nasion soi, a następnie scharakteryzował (Birk, Gertler, Khalef 1963) inhibitor trypsynowy, który różnił się od inhibitora Kunitza. Inhibitor ten nie ulegał inaktywacji w obecności kwasu solnego, nie trawił się pepsyną i wykazywał znacznie wyższą aktywność antytrypsynową. W cząsteczce tego białka o masie cząsteczkowej 24000 nie stwierdzono obecności tryptofanu (Birk, Gertler, Khalef 1963) podczas gdy inhibitor Kunitza zawiera znaczne ilości tryptofanu (Laskowski, Laskowski 1954). Cztery dalsze inhibitory trypsynowe zostały wyizolowane z nasion soi przez Rackisa i współpracowników (Rackis, Sasame 1962, Rackis, Anderson 1964). Inhibitory te oznaczone jako A₁, A₂, B₁, B₂ różniły się znacznie właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością antytrypsynową. Inhibitor A₂ o masie cząsteczkowej 21600 (Rackis, Sasame 1962) okazał się identycznym z krystalicznym inhibitorem Kunitza. Duża stosunkowo liczba i różnorodność inhibitorów trypsynowych występujących w nasionach soi spotykana jest również w innych gatunkach roślin. Z nasion *Phaseolus lunatus*, Jones i współpracownicy (1963) wydzielili cztery inhibitory trypsynowe i podali ich skład aminokwasowy. W cztery lata później Haynes i Feeney (1967) frakcjonując białka różnych odmian *Phaseolus lunatus* za pomocą chromatografii na DEAE sephadexie otrzymali we wszystkich przypadkach 8 frakcji, z których 6 wykazywało aktywność antytrypsynową. W składzie aminokwasowym poszczególnych frakcji występowały nieznaczne różnice w zawartości fenyloalaniny, cysteiny, seryny

i kwasu glutaminowego. Minimalny ciężar cząsteczkowy oznaczony na podstawie składu aminokwasowego dla dwóch inhibitorów wynosił 9670 i 9050. Inhibitory trypsynowe izolowane z nasion *Phaseolus lunatus* hamowały również chymotrypsynę natomiast nie hamowały pronazy i proteinazy grzybów. Podwójna aktywność inhibitorów w stosunku do dwóch proteaz jest cechą nie tylko większości inhibitorów pochodzenia roślinnego, ale również często spotykaną wśród inhibitorów pochodzenia zwierzęcego. Taką aktywnością charakteryzuje się inhibitor trzustkowy (Wu, Laskowski 1955) owoinhibitor jaja kurzego (Feeney, Stevens, Osuga 1963) i owomukoid jaj różnych gatunków ptaków (Rhodes, Bennet, Feeney 1960).

Z nasion innych gatunków rodziny motylkowych wydzielono i scharakteryzowano inhibitory trypsynowe: bobiku — *Vicia faba* (Sohonie, Huprikar, Joshi 1958), *Vigna sinensis* (Ventura, Filho 1967), *Phaseolus aureus* (Chu, Chi 1963; Chu, Lo, Jen, Chi 1965; Wang, Chi, Wu 1966) i licznych odmian *Phaseolus vulgaris*: navy bean (Wagner, Reihm 1967), kidney bean (Pusztai 1966) i white bean (Czernikow, Abramowa 1966). Z nasion *Vigna sinensis* (Ventura, Filho 1967) wydzielono inhibitor trypsynowy, który wykazywał aktywność zarówno w stosunku do trypsyny, jak i chymotrypsyny. Inhibitor ten o masie cząsteczkowej 17000 nie zawierał metioniny.

Inhibitor trypsynowy wydzielony z nasion *Phaseolus aureus* (Chu, Lo, Jen, Chi 1965) został rozdzielony na dwa składniki A i B różniące się ilością grup amidowych. Badania przeprowadzone na świeżych wyciągach z nasion wykazały, że inhibitor w nich zawarty występuje głównie w formie B, charakteryzującej się znacznie wyższym procentem azotu amidowego w porównaniu z inhibitorem A. Przejście składnika B w A związane jest z odczepieniem grup amidowych. Inhibitor trypsynowy *Phaseolus aureus* o masie cząsteczkowej 8000 zawiera 72 reszty aminokwasowe z aminokwasem N-końcowym seryną. 8 reszt cysteinowych obecnych w łańcuchu polipeptydowym połączonych jest za pomocą mostków dwusiarczkowych (Chu, Lo, Jen, Chi 1965). Rozerwanie 2 mostków dwusiarczkowych powoduje spadek aktywności inhibitora powyżej 70% (Chou, Chi 1965).

W 1967 roku Wagner i Reim wydzielili i scharakteryzowali inhibitor trypsynowy z *Phaseolus vulgaris* — navy bean. Inhibitor ten jest jedynym z dotychczas poznanych inhibitorów trypsynowych roślin, który hamuje aktywność trypsyny w stosunku molarnym 1:2, co świadczyć może o obecności dwóch centrów w cząsteczce tego białka. Podobną właściwością charakteryzują się niektóre inhibitory pochodzenia zwierzęcego, jak np. owoinhibitor jaja kurzego (Tomimatsu, Clary, Bartulovich 1966), owomukoid jaja kaczki (Rhodes, Bennet, Feeney 1960).

Inhibitor trypsynowy *Phaseolus vulgaris* — navy bean o masie cząsteczkowej 23000 składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego znaczną ilość reszt cysteiny, kwasu asparaginowego, seryny, proliny, małą ilość metioniny i zupełny brak tryptofanu.

Prócz roślin motylkowych obecność inhibitorów trypsynowych stwierdzono w nasionach sałaty (Shain, Mayer 1965), ziemniakach (Ryan 1966) i kilku gatunkach rodziny traw.

Z ziemiaków otrzymano w formie krystalicznej dwa inhibitory trypsynowe różniące się aktywnością w stosunku do trypsyny i proteazy bakteryjnej (Yoshikawa, Kiyohara, Ito 1966). Inhibitor I wysalający się z wyciągów chlorkowych poniżej 0,3 nasycenia siarczanem amonu wykazywał większą aktywność w stosunku do proteazy bakteryjnej niż do trypsyny. Natomiast inhibitor II wysalający się od 0,3 do 0,6 nasycenia siarczanem amonu charakteryzował się znacznie wyższą aktywnością antytrypsynową.

W rodzinie traw aktywność antytrypsynową stwierdzono w wyciągach z nasion pszenicy (Shyamala, Kennedy, Lyman 1961; Learmonth, Wood 1963) i żyta (Polanowski 1967).

Inhibitor trypsynowy pszenicy oczyszczony i częściowo scharakteryzowany przez Shyamala i Lymana (1964) wykazywał aktywność jedynie w stosunku do trypsyny, nie hamował natomiast chymotrypsyny i pepsyny. Nieco odmienne własności wykazuje inhibitor żyta (Polanowski 1967), który w odróżnieniu od inhibitora pszenicy wytrąca się kwasem sulfosalicylowym i wykazuje aktywność nie tylko w stosunku do trypsyny, ale tworzy nieaktywny kompleks z własną proteazą. Badania przeprowadzone na nasionach 8 gatunków traw należących do 5 podrodzin: kostrzewowatych, mietlicowatych, jęczmieniowatych, owsowatych i prosowatych wykazały obecność inhibitorów trypsynowych w nasionach wiechliny łąkowej, kostrzewy łąkowej, tymotki łąkowej, rajgrasu włoskiego, jęczmienia browarnianego, owsa siewnego, kukurydzy i prosa (Lorenc-Kubis 1969).

Duża powszechność i różnorodność inhibitorów trypsynowych w świecie roślinnym może wskazywać z jednej strony na znaczną ich rolę w procesie dojrzewania i kiełkowania nasion. Niektórzy autorzy jak np. Shain, Mayer (1965) oraz Polanowski (1967) wskazują na ich rolę w inaktywacji własnych proteaz. Być może istnienie tych nieaktywnych kompleksów proteaza-inhibitor uniemożliwia stwierdzenie obecności proteaz w nasionach. Z drugiej strony duża powszechność występowania białek o aktywności antytrypsynowej w nasionach różnych gatunków wskazywać może na podobieństwa w budowie pewnych fragmentów łańcucha polipeptydowego, dzięki którym białka znacznie różniące się budową i właściwościami fizyko-chemicznymi posiadają wspólną cechę jaką jest zdolność inaktywowania trypsyny.

Katedra Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego i Katedra Chemii Fizjologicznej Wydziału Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu

LITERATURA

- Birk Y., 1961. *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 378.
 Birk Y., Gertler A., Khalef S., 1963. *Biochem. J.* 87, 281.
 Borchers R., Ackerson C. W., Kimett L., 1947. *Arch. Bioch.* 13, 291.
 Czernikow M. P., Abramowa E. P., 1966. *Vopr. Pitaniya* 25, 59.
 Chou Y. T., Chi C. W., 1965. *Chem. Abstr.* 63, 13635d.

- Chu H. M., Chi C. W., 1963. Chem. Abstr. 59, 10405.
- Chu H. M., Lo S. S., Jen M. H., Chi C. W., 1965. Chem. Abstr. 62, 16537g.
- Davie E. W., Neurath H., 1955. J. Biol. Chem. 212, 507.
- Feeney R. E., Stevens F. C., Osuga D. T., 1963. J. Biol. Chem. 238, 1415.
- Ferency L., 1957. Acta Biol. Hung. 8, 31.
- Finkenstat W. R., Laskowski M., 1953. J. Biol. Chem., 204, 797.
- Finkenstat W. R., Laskowski M., 1965. J. Biol. Chem. 240, 962 PC.
- Grzesiuk S., 1967. Fizjologia nasion. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Haynes R., Feeney R. E., 1967. J. Biol. Chem. 242, 5378.
- Hemberg T., 1961. Handbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg 14, 1162
(cyt. za Grzesiukiem S., 1967, Fizjologia nasion).
- Jones G., Moore S., Stein W. H., 1963. Biochemistry 2, 1, 66.
- Kunitz M., 1946. J. Gen. Physiol. 29, 149.
- Kunitz M., 1947. J. Gen. Physiol. 30, 291.
- Kunitz M., 1948. J. Gen. Physiol. 32, 249.
- Laskowski M., Laskowski M., 1954. Advanc. Protein. Chem. 9, 203.
- Laskowski M., Wu F. C., 1953. J. Biol. Chem. 204, 797.
- Learmonth E. M., Wood J. C., 1963. Cereal Chem. 40, 63.
- Lorenc-Kubis I., 1969. Acta Soc. Bot. Polon. 38, 165
- Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., 1963. The Germination of Seeds. Pergamon Press Oxford London-New York-Paris.
- Oppenheimer H., 1922. Sitz. Akad. Wiss. Vien Abt. 1, 131, 279. (cytowane za Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., 1963. The Germination of Seeds. Pergamon Press Oxford London-N. York-Paris).
- Ozawa K., Laskowski M., 1966. J. Biol. Chem. 241, 3955.
- Polanowski A., 1967. Acta Biochim. Polon. 14, 389.
- Pusztai A., 1966. Biochim. J. 101, 379.
- Rackis J. J., Anderson R. L., 1964. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 230.
- Rackis J. J., Sasame H. A., 1962. Archiw. Biochem. Biophys. 98, 471.
- Rhodes M. B., Bennet M., Feeney R. F., 1960. J. Biol. Chem. 235, 1686.
- Ryan C. A., 1966. Biochemistry 5, 1952.
- Shain Y., Mayer A. M., 1965. Physiol. Plantarum 18, 853.
- Shyamala G., Kennedy B. M., Lyman R. L., 1961. Nature, 192, 360.
- Shyamala G., Lyman R. L., 1964. Canad. J. Biochem. 42, 1825.
- Sohonie K., Huprikar S. V., Joshi M. R., 1958. J. Sci. Ind. Res. 18C, 95. (cytowane za Haynes R., Feeney R. E., 1967, J. Biol. Chem. 242, 5378).
- Steiner R. F., 1965. Biochim. Biophys. Acta, 100, 111.
- Sumere van C. F., 1960. Phenolics in Plants in Health and Disease. Pergamon Press, Oxford.
- Sumere van C. F., Hilderson H., Massart L., 1958. Naturwiss. 45, 292
- Tomimatsu Y., Clary J. J., Bartulovich J. J., 1966. Arch. Biochem. Biophys. 115, 536.
- Ventura M. M., Filho J. X., 1967. Chem. Abstr. 67, 105497d.
- Wagner L. P., Reihm J. F., 1967. Arch. Biochem. Biophys. 121, 672.
- Wang K. I., Chi Ch. W., Ts'ae T. Ch., 1966. Chem. Abstr. 64, 13000b.
- Wu F. C., Laskowski M., 1955. J. Biol. Chem. 213, 609.
- Yoshikawa M., Kiyohara T., Ite K., 1966 Chem. Abstr. 64, 17937e, g.