Białka ziarniaków niektórych gatunków rodziny Gramineae i ich własności antytrypsynowe

Seed proteins of some species of Gramineae and their antitryptic properties

I. LORENC-KUBIS

Nasiona wielu gatunków roślin charakteryzują się obecnością białek lub polipeptydów (Rackis, Sasame 1962) posiadających zdolność tworzenia nieaktywnych kompleksów z trypsyną.

Szczególnie bogatym źródłem inhibitorów trypsynowych okazały się nasiona roślin motylkowych (*Papilionaceae*). W rodzinie tej obecność inhibitorów trypsynowych stwierdzono w nasionach soi (Kunitz 1946; Birk 1961; Rackis, Sasame 1962; Rackis, Anderson 1964). *Phaseolus lunatus* (Haynes, Feeney 1967), *Vicia faba* (Sohonie, Huprikar, Joshi 1958), *Vigna sinensis* (Ventura, Filho 1967), *Phaseolus aureus* (Chu, Chi 1963) i licznych odmian *Phaseolus vulgaris*: navy bean (Wagner, Reim 1967), kidney bean (Pusztai 1966) i white bean (Czerwikow, Abramowa 1966). W rodzinie traw (*Gramineae*) aktywność antytrypsynową stwierdzono jedynie w wyciągach z nasion pszenicy (Shyamala, Kennedy, Lyman 1961; Learmonth, Wood 1963) i żyta (Polanowski 1967). Brak jest natomiast w literaturze danych odnośnie białek i ich aktywności antytrypsynowej w przypadku wielu gatunków traw. Z tych względów interesujące wydało się przeanalizowanie różnych gatunków traw pod względem zawartości białek ekstrahujących się wodą, 0,9 % roztworem chlorku sodu i 0,15 M kwasem sulfosalicylowym i zbadanie ich własności antytrypsynowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na nasionach 8-miu gatunków traw ze zbioru 1963, 1965 i 1966 roku, pochodzących z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin we Wrocławiu. Nasiona przechowywano przy wilgotności względnej powietrza od 45 do 55 %. Siła kiełkowania analizowanych odmian w okresie przeprowadzania doświadczeń wynosiła dla zbioru z 1963 roku od 70 do 82 %, natomiast dla zbioru 1965 i 1966 roku od 89 do 98 %.

Ekstrakcja białek nasion wodą, 0,9 % roztworem chlorku sodu i 0,15 M kwasem sulfosalicylowym: 5 do 10 g nasion mielono w młynku nożowym przez 3 do 4 minuty po czym 1 do 2 g próbki zmielonego ziarna ekstrahowano 10 ml wody, 0,9 % roztworu chlorku sodu lub 10 ml 0,15 M kwasu sulfosalicylowego. Po godzinnym mie-

szaniu na wytrząsarce w temperaturze pokojowej, próby wirowano przy 12 tys. obrotów na minutę w ciągu 20 minut. W wyciągach oznaczano białko turbidymetryczną mikrometodą taninową wg Mejbaum-Katzenellenbogen (1955) w fotometrze Pulfricha przy filtrze S_{61} . Do sporządzania krzywej standardowej używano wysuszonej do stałej wagi żelatyny f-my Grübler, której czystość sprawdzono przez oznaczenie N-białkowego metodą Kjeldahla.

Aktywność antytrypsynową w wyciągach z nasion oznaczano w teście peptydowym i polipeptydowym wg Mejbaum-Katzenellenbogen i współpracowników (1966). Za jednostkę trypsynową przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 5 minut w 30° w pH 7,6 rozkłada 25 μ g kazeiny do produktów nieoznaczających się taniną. Taką aktywność antytrypsynową posiada 1 μ g białka preparatu trypsyny f-my Merck. Za jednostkę antytrypsynową przyjęto taką ilość białka wyciągu, która hamuje działanie 1 μ g trypsyny.

Elektroforezę bibulową białek przeprowadzano w 0,1 M moderatorze octanowym o pH 5,1 w ciągu 5 godzin przy napięciu 300 V. Na paski bibuły Schleicher-Schüll 2043 a o wymiarach 3×36 cm nanoszono w odległości 4 cm od środka paska w kierunku katody od 200 do 350 μ g białka. Elektroforogramy barwiono błękitem bromofenolowym w odczynniku taninowym wg Mejbaum-Katzenellenbogen i Dobryszczyckiej (1959). Elektroforogramy niebarwione eluowano 0,9 % roztworem chlorku sodu w ciągu 24 godzin i w poszczególnych frakcjach oznaczano aktywność antytrypsynową w teście peptydowym wg Mejbaum-Katzenellenbogen i współpracowników (1966).

Odczynniki

Tanina czysta — import Anglia 9/65 (Cefarm-Katowice) zawierająca w 80 % gallotaninę.

Trypsyna firmy Merck A. G., Darmstadt o aktywności 20 000 jednostek Fulda-Grossa na gram.

Kazeina biała rozpuszczalna firmy British Drug Houses, Poole, England.

Pozostałe odczynniki były cz.d.a. i pochodziły z Polskich Odczynników Chemicznych — Gliwice.

WYNIKI

I. Charakterystyka białek ziarniaków traw

Ziarniaki przebadanych 8-miu gatunków traw z 5-ciu podrodzin: kostrzewowatych (*Festuceae*), mietlicowatych (*Agrostideae*), jęczmieniowatych (*Hordeae*), owso-watych (*Aveneae*) i proso-watych (*Panicorideae*) należą do nasion niskobiałkowych. Nasiona te zawierają od 6,0 do 10 % białek w przeliczeniu na suchą masę ziarna. Białka ekstrahujące się wodą lub 0,9 % roztworem chlorku sodu stanowią od 0,3 do 2,0 %, a 0,15 M kwasem sulfosalicylowym od 0,1 do 0,76 % suchej masy ziarna.

Zawartość białek ekstrahujących się wodą, 0,9 % roztworem chlorku sodu 0,15 M kwasem sulfosalicylowym przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 — Table 1

Stężenie białek ekstrahujących się wodą, roztworem chlorku sodu i kwasu sulfosalicylowego z nasion różnych gatunków traw

The content of water, sodium chloride and sulphosalicylic acid extractable — proteins in some species of *Gramineae* seeds

Podrodzina Subfamily	Gatunek Species	Białka ekstrahujące się do: Proteins extracted with:		
		wody water g/100 g s.m.	0,9% chlorku sodu 0,9% sodium chloride g/100 g s.m.	0,15 M SSA g/100 g s.m.
<i>Festuceae</i> Kostrzewowate	<i>Festuca pratensis</i> Kostrzewa łąkowa	0,42±0,02	0,82±0,08	0,29±0,03
	<i>Poa pratensis</i> Wiechlinia łąkowa	0,31±0,01	0,35±0,04	0,10±0,01
<i>Agrostideae</i> Mietlicowate	<i>Phleum pratense</i> Tymotka łąkowa	1,12±0,09	0,78±0,08	0,29±0,03
<i>Hordeae</i> Jęczmieniowate	<i>Lolium multiflorum</i> Rajgras włoski	0,65±0,03	0,61±0,09	0,26±0,06
	<i>Hordeum sativum</i> Jęczmień browar.	1,93±0,17	2,05±0,03	0,76±0,08
<i>Aveneae</i> Owsowate	<i>Avena sativa</i> Owies siewny	1,71±0,19	1,68±0,10	0,40±0,08
<i>Panicoideae</i> Prosowate	<i>Zea mays</i> Kukurydza-ząb koński	0,72—0,04	1,04±0,05	0,22±0,04
	<i>Panicum miliaceum</i> Proso zwyczajne	0,62±0,06	0,72±0,06	0,19±0,02

Liniami poziomymi ograniczono w tabeli grupy systematyczne roślin.

Systematic plant groups in this table were separated by horizontal lines.

s.m. — sucha masa (dry weight).

SSA — kwas sulfosalicylowy (sulphosalicylic acid).

Dane w tabeli są średnimi z 10 oddzielnie pobieranych losowych prób nasion.

The mean values were taken of 10 determinations.

Spośród 8-miu przebadanych gatunków najwięcej białek ekstrahujących się wodą zawierają ziarniaki jęczmienia i owsa, najmniej natomiast nasiona wiechliny i kostrzewy. Pośrednią zawartością tych białek charakteryzują się nasiona tymotki, rajgrasu włoskiego, kukurydzy i prosa. U większości gatunków do roztworu chlorku sodu ekstrahują się podobne ilości białek jak do wody. Wyjątek stanowią nasiona kostrzewy, tymotki i kukurydzy. W ziarniakach kostrzewy i kukurydzy

Tabela 2 — Table 2

Aktywność antytrypsynowa białek rozpuszczalnych w wodzie, 0,9% roztworze chlorku sodu i 0,15 M kwasie sulfosalicylowym różnych gatunków traw
Inhibition of trypsin activity by proteins soluble in water, saline and 0.15 M sulphosalicylic acid isolated from some species of *Gramineae*

Gatunek Species	Białka ekstrahujące się do: Proteins extracted with:								
	wody water			0,9% chlorku sodu 0,9% sodium chloride			0,15 M kwasu sulfosalicylowego 0,15 M sulphosalicylic acid		
	Białko % s.m.	Aktywność właściwa j/mg białka	Aktywność całkowita j/g ziarna	Białko % s.m.	Aktywność właściwa j/mg białka	Aktywność całkowita j/g ziarna	Białko % s.m.	Aktywność właściwa j/mg białka	Aktywność całkowita j/g ziarna
	Protein % of dry weight	Specific activity units/mg of protein	Total activity units/g of seeds	Protein % of dry weight	Specific activity units/mg of protein	Total activity units/g of seeds	Protein % of dry weight	Specific activity units/mg of protein	Total activity units/g of seeds
<i>Festuca pratensis</i> Kostrzewa łąkowa	0,42	40,0	16,8	0,82	50,0	41,0	0,29	0,0	0,0
<i>Poa pratensis</i> Wiechlin łąkowa	0,31	42,0	13,0	0,35	50,0	17,7	0,10	0,0	0,0
<i>Phleum pratense</i> Tymotka łąkowa	1,12	21,0	23,5	0,78	50,0	39,0	0,29	0,0	0,0
<i>Lolium multiflorum</i> Rajgras włoski	0,65	21,0	13,6	0,61	30,0	18,3	0,26	0,0	0,0
<i>Hordeum sativum</i> Jęczmień browar- niany	1,93	13,0	25,0	2,05	50,0	102,0	0,76	0,0	0,0
<i>Zea mays</i> Kukurydza ząb koński	0,72	63,0	45,6	1,04	53,0	55,1	0,22	29,0	6,5
<i>Panicum miliaceum</i> Proso zwyczajne	0,62	0,0	0,0	0,72	5,0	3,6	0,19	26,0	4,9
<i>Avena sativa</i> Owies siewny	1,71	16,0	27,3	1,68	11,0	18,4	0,40	25,0	10,0

1 ml inkubatu zawierał 80 µg kazeiny w 0,1 M moderatorze fosforanowym o pH 7,6, 10 µg białka wyciągu i 1 µg trypsyny. Inkubację przeprowadzano w ciągu 5 minut w 30°. Reakcję przerywano 1 ml odczynnika tanninowego. Białko oznaczano mikrometodą tanninową.

The incubation mixture contained in 1 ml: 80 µg of casein in 0.1 M-Na₂HPO₄ buffer, pH 7.6, 10 µg of seed extract protein and 1 µg of trypsin. After 5 min. at 30°, the reaction was stopped by adding 1 ml of the tannin reagent. Protein was determined by the tannin micromethod.

ilość białek ekstrahujących się chlorkiem sodu jest znacznie większa od ilości białek rozpuszczalnych w wodzie. W nasionach tymotki stosunki są odwrotne, stężenie białek rozpuszczalnych w wodzie jest istotnie większe od stężenia białek rozpuszczalnych w 0,9 % roztworze chlorku sodu. Białka o charakterze polipeptydowym i glikoproteidowym rozpuszczalne w 0,15 M kwasie sulfosalicylowym różnicują nasiona przebadanych gatunków traw na 3 grupy. Najmniej tych białek zawierają nasiona wiechliny łąkowej, najwięcej nasiona jęczmienia browarnianego i owsa. Grupę pośrednią stanowią nasiona prosa, kukurydzy, rajgrasu włoskiego, tymotki i kostrzewy.

Ze wszystkich przebadanych gatunków nasion, ziarniaki jęczmienia i owsa zawierają najwięcej albumin, globulin i białek rozpuszczalnych w 0,15 M kwasie sulfosalicylowym. Najmniejszą zawartością tych białek charakteryzują się nasiona wiechliny łąkowej.

II. Aktywność antytrypsynowa białek ziarniaków traw

W tabeli nr 2 zebrano wyniki otrzymane z oznaczeń aktywności antytrypsynowej białek nasion różnych gatunków traw.

W wyciągach wodnych i chlorkowych wszystkich badanych gatunków traw z wyjątkiem prosa stwierdzono obecność inhibitorów trypsynowych. Dla poszczególnych gatunków aktywność antytrypsynowa w wyciągach wodnych wynosiła od 13 do 63 jednostek, a w wyciągach chlorkowych od 5 do 53 jednostek na mg białka. Największą aktywność stwierdzono dla albumin nasion kukurydzy, wiechliny i kostrzewy, najmniejszą natomiast dla jęczmienia i owsa. Z powodu jednak małego stężenia albumin w ziarniakach wiechliny i kostrzewy aktywność całkowita inhibitorów trypsynowych w tych nasionach jest niska. W wyciągach chlorkowych najniższą aktywność antytrypsynową stwierdzono w przypadku białek owsa i prosa.

W wyciągach sulfosalicylowych aktywność inhibitorową stwierdzono jedynie w przypadku nasion kukurydzy, prosa i owsa. Aktywność antytrypsynowa w tych wyciągach wynosiła odpowiednio od 25 do 29 jednostek na mg białka.

III. Elektroforeza bibułowa białek wyciągów chlorkowych

W elektroforezie bibułowej w 0,1 M moderatorze octanowym o pH 5,1 białka ziarniaków traw dzielą się na 4 do 5 frakcji. Elektroforogramy tych białek przedstawiono na rycinie 1, 2. Pięć frakcji uzyskiwano w przypadku nasion kostrzewy, rajgrasu, owsa, kukurydzy i prosa. Z elektroforogramów eluowano do 0,9 % roztworu chlorku sodu od 25 do 60 % białka poddanego elektroforezie. Aktywność antytrypsynową odnajdywano we frakcjach najdalej wędrujących w stronę anody. Frakcje te oznaczono na elektroforogramach jako F-1 i F-2.

Ryc. 1. Elektroforeza bibułowa białek rozpuszczalnych w 0,9% roztworze chlorku sodu z nasion różnych gatunków traw

Elektroforezę przeprowadzano na bibule Schleicher-Schüll 2043 a, w 0,1 M moderatorze octanowym o pH 5,1, przy napięciu 300 V w czasie 5 godzin. Na paski bibuły nanoszono białko w ilości 200–300 μ g (0,06–0,1 ml). Paski barwiono błękitem bromofenolowym w odczynniku taninowym

a – kostrzewa łąkowa (*Festuca pratensis*); b – tymotka łąkowa (*Phleum pratense*); c – rajgras włoski (*Lolium multiflorum*)

Fig. 1. Paper electrophoresis of proteins extracted with 0.9% sodium chloride from some species of Gramineae seeds

Electrophoresis was carried out on Schleicher-Schüll paper 2043 a in 0,1 M acetate buffer pH 5.1. Potential gradient: 300 V, 5 hours. Proteins were detected by staining with bromophenol blue dissolved in the tannin reagent; 0.06–0.1 ml samples containing 200–300 μ g of protein were applied

Ryc. 2. Elektroforeza bibułowa białek rozpuszczalnych w 0,9% roztworze chlorku sodu z nasion różnych gatunków traw

d — jęczmień browarniany (*Hordeum sativum*); *e* — owies siewny — *Avena sativa*; *f* — kukurydza — *Zea mays*; *g* — proso zwyczajne (*Panicum millaceum*)

Fig. 2. Paper electrophoresis of proteins extracted with 0.9% sodium chloride from some species of *Gramineae* seeds

IV. Właściwości inhibitorów trypsynowych różnych gatunków traw

Inhibitory trypsynowe kostrzewy, wiechliny, rajgrasu, tymotki i jęczmienia wytrącają się 0.15 M kwasem sulfosalicylowym, podczas gdy inhibitory 3 pozostałych gatunków — kukurydzy, prosa i owsa rozpuszczają się w tym kwasie. Na szczególną uwagę zasługuje inhibitor z nasion prosa, który nie ekstrahuje się do wody, bardzo słabo do chlorku sodu, natomiast rozpuszcza się w 0,15 M kwasie sulfosalicylowym. Inhibitory trypsynowe wyciągów chlorkowych z nasion wykazują dużą oporność na działanie podwyższonej temperatury.

Ryc. 3

Ryc. 4

Ryc. 3. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności białek wyciągów chlorkowych z nasion

Krzywe: A — w nieobecności inhibitora; B do D — w obecności inhibitora z nasion: B — wiechliny łąkowej, C — tymotki łąkowej, D — jęczmienia browarnianego

1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny rozpuszczonej w 0,1 M moderatorze fosforanowym o pH 7,6, 10 mg trypsyny i 100 µg białka wyciągu. Inkubacja w 30°. Reakcję przerywano 0,3 N HCl lub równą objętością 0,3 M kwasu sulfosalicylowego. Wyniki podano w przeliczeniu na 1 ml inkubatu

Fig. 3. Time-course of casein degradation by trypsin with and without proteins of saline extracts from Gramineae seeds

Cuves: A — without the inhibitor; B to D — with the inhibitor from seeds: B — *Poa pratensis*, C — *Phleum pratense*, D — *Hordeum sativum*

The incubation mixture contained in 1 ml: 2,5 mg of casein in 0.1 M Na⁺, K-phosphate buffer, pH 7.6, 10 µg of trypsin and 100 µg of seed extract protein. The incubation was at 30°. The reaction was stopped by adding 0.3 N HCl or 0.3 M sulphosalicylic acid. The results are calculated per 1 ml of incubation mixture

Ryc. 4. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności białek wyciągów chlorkowych z nasion traw

Krzywe: A — w nieobecności inhibitora; E, F, G — w obecności inhibitora z nasion: E — rajgrasu włoskiego, F — kostrzewy łąkowej, G — kukurydza ząb koński

Fig. 4. Time-course of casein degradation by trypsin with and without the proteins of saline extracts from Gramineae seeds

Curves: A — without the inhibitor; E, F, G — with the inhibitor from seeds: E — *Lolium multiflorum*, F — *Festuca pratensis*, G — *Zea mays*

V. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności inhibitorów trypsynowych

Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności inhibitorów z nasion prześledzono w teście peptydowym i polipeptydowym.

Przebieg proteolizy mierzony ubytkiem białka całkowitego (test peptydowy) i przyrostem polipeptydowych produktów reakcji w przesączu kwasu sulfosalicylowego (test polipeptydowy) wyrażono jako sumę powstałych produktów. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach (ryc. 4 i 3). Krzywa A przedstawia przyrost produktów reakcji w nieobecności inhibitora. Krzywe B do G w obecności inhibitorów z nasion traw.

Spośród wszystkich przebadanych gatunków traw najsilniejszy efekt hamowania stwierdzono w przypadku nasion wiechliny łąkowej. Po 30 minutach inkubacji enzymu z substratem w nieobecności inhibitora następował całkowity rozkład substratu, podczas gdy w obecności białek nasion wiechliny łąkowej po 60 minutach inkubacji pozostaje jeszcze 30 % substratu. W pozostałych przypadkach występowały nieco słabsze efekty hamowania. W obecności białek z nasion tymotki, jęczmienia, rajgrasu i kostrzewy całkowity rozkład substratu następował po 60 minutach, a więc w czasie 2-krotnie dłuższym niż w próbie bez inhibitora.

DYSKUSJA

Badania nad białkami rodziny *Gramineae* ograniczają się na ogół do nasion roślin zbożowych. Wiadomości na temat białek innych gatunków są bardzo skąpe.

W tej pracy zajęto się białkami różnych gatunków traw i ich aktywnością antytrypsynową. Przebadane gatunki charakteryzują się niską zawartością białek rozpuszczalnych zarówno w wodzie jak i 0,9 % roztworze chlorku sodu. Zawartość białek rozpuszczalnych w wodzie lub chlorku sodu różnicuje przebadane gatunki na odrębne grupy. Znacznie mniejsze różnice międzygatunkowe stwierdzono dla białek o charakterze glikoproteidowym rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym. Nasiona kostrzewy, tymotki, rajgrasu i kukurydzy należące do różnych podrodziny charakteryzują się bardzo zbliżoną zawartością tych białek. Największą zawartością białek charakteryzują się ziarniaki zbóż.

Polanowski (1967) stwierdził w wyciągach wodnych i chlorkowych z nasion żyta obecność inhibitora trypsynowego, który ze względu na zdolność do tworzenia kompleksu z własną proteazą może odgrywać rolę w procesie dojrzewania i kiełkowania nasion. Z innych nasion rodziny *Gramineae* obecność inhibitorów trypsynowych stwierdzono jedynie w wyciągach wodnych pszenicy (Shyamala, Kennedy, Lyman, 1961; Learmonth, Wood 1963).

Białka badanych w tej pracy nasion hamowały szybkość degradacji substratu do produktów, co szczególnie wyraźnie odzwierciedla się w przebiegu proteolizy kazeiny trypsyną. Inhibitory badanych gatunków traw z wyjątkiem inhibitora nasion prosa ekstrahują się do wody i chlorku sodu. W przeciwieństwie do inhibitora

z nasion żyta (Polanowski 1967) i pszenicy (Shyamala, Kennedy, Lyman 1961) okazały się opornymi na działanie wysokiej temperatury, w czym są podobne do inhibitora nasion fasoli (Czernikow, Abramowa 1966). W większości przypadków inhibitory przebadanych gatunków podobnie jak inhibitor żyta (Polanowski 1967) strącają się 0,15 M kwasem sulfosalicylowym. Jedynie inhibitor kukurydzy, owsa i prosa rozpuszcza się w tym kwasie. Na szczególną uwagę zasługuje inhibitor prosa, który ekstrahuje się tylko do kwasu sulfosalicylowego.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że inhibitory trypsynowe są szeroko rozpowszechnione nie tylko w rodzinie motylkowych (*Papilionaceae*), ale również i w rodzinie traw (*Gramineae*).

Rola inhibitorów trypsynowych nie została jeszcze wyjaśniona. Wielu badaczy (Shain, Mayer 1965; Polanowski 1967) przypisuje im ważną funkcję w regulacji aktywności enzymów proteolitycznych poprzez tworzenie nieaktywnych kompleksów z własnymi proteazami. Być może istnienie tych nieaktywnych kompleksów proteaza—inhibitor uniemożliwia stwierdzenie obecności proteaz w nasionach.

Pani Profesor dr Wandzie Mejbaum-Katzenellenbogen składam serdeczne podziękowania za cenne wskazówki udzielane w czasie wykonywania i pisania tej pracy.

Katedra Biochemii
Uniwersytetu Wrocławskiego

(Wpłynęło dn. 16.6.1968 r.)

Katedra Chemii Fizjologicznej
Wydziału Farmacji A.M.
Wrocław, ul. Szewska 38

SUMMARY

8 species of *Gramineae* from 5 subfamilies: *Festuceae*, *Agrostideae*, *Hordeae*, *Aveneae* and *Panicoideae* were studied.

The proteins of some seeds of *Gramineae* were extracted with water, 0.9% sodium chloride and 0.15 M sulphosalicylic acid.

The seeds contained from 0.31 to 2.0% water, and saline extractable-protein and 0.1 to 0.76% protein soluble in 0.15 M sulphosalicylic acid. It was found that the water, and saline extracts of all the seeds contained trypsin inhibitor except *Panicum miliaceum*.

The antitryptic activity of proteins soluble in 0.15 M sulphosalicylic acid were found in the case of *Zea mays*, *Avena sativa* and *Panicum miliaceum* seeds.

LITERATURA

- Birk Y., 1961, *Biochim. Biophys. Acta* 54: 378.
- Czernikow M. P., Abramowa E. P., 1966, *Vopr. Pitaniya* 25: 59.
- Chu H. M., Chi C. W., 1963, *Chem. Abstr.* 59: 10405.
- Haynes R., Feeney R. E., 1967, *J. Biol. Chem.* 242: 5378.
- Kunitz M., 1946, *J. Gen. Physiol.* 29: 149.
- Learmonth E. M., Wood J. C., 1963, *Cereal Chem.* 40: 63.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, *Acta Biochim. Polon.* 2: 279.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Dobryszczycka W., 1959, *Clin. Chim. Acta* 4: 515.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Wilusz T., Polanowski A., 1966, *Acta Biochim. Polon.* 13: 87.
- Polanowski A., 1967, *Acta Biochim. Polon.* 14: 389.
- Pusztai A., 1966, *Biochim. J.* 101: 379.
- Rackis J. J., Anderson R. L., 1964, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 15: 230.
- Rackis J. J., Sasame H. A., 1962, *Archiv. Biochem. Biophys.* 98: 471.
- Shain Y., Mayer A. M., 1965, *Physiol. Plantarum* 18: 853.
- Shyamala G., Kennedy B. M., Lyman R. L., 1961, *Nature* 192: 360.
- Sohonie K., Huprikar S. V., Joshi M. R., 1958, *J. Sci. Ind. Res.* 18: 95. (cytowane za Haynes R., Feeney R. E. 1967, *J. Biol. Chem.* 242: 5378).
- Ventura M. M. Filho J. X., 1967, *Chem. Abstr.* 67: 105497.
- Wagner L. P., Reihm J. F., 1967, *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 672.