Aktywność antyproteolityczna białek nasion jęczmienia

Inhibition of proteolytic activity of the proteins from barley seeds

W. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, H. MARCINIAK

WSTĘP

W ostatnich latach stwierdzono w materiale roślinnym występowanie substancji posiadających zdolność hamowania aktywności enzymów proteolitycznych. Substancje te mogą mieć charakter drobnocząsteczkowy (Ferenczy 1957; Sumere 1960; Mayer & Poliakov-Mayer 1963) lub są to białka, które tworzą z enzymami proteolitycznymi nieaktywne kompleksy (Rackis & Sasame 1962). Kunitz w roku 1946 po raz pierwszy opisał występowanie inhibitora trypsynowego w soi (Kunitz 1946). Liczni autorzy wykazali następnie obecność inhibitorów proteolitycznych w nasionach roślin motylkowych, sałaty oraz w ziemniakach. Ostatnio opisano występowanie inhibitorów trypsynowych w nasionach pszenicy (Shyamala & Kennedy & Lyman 1961; Learmonth & Wood 1963); i żyta (Polanowski 1967). Lorenc-Kubis (1969) prowadząc badania porównawcze nad występowaniem inhibitorów trypsynowych w nasionach różnych gatunków traw stwierdziła między innymi występowanie inhibitora trypsynowego w nasionach jęczmienia.

Polanowski i Lorenc-Kubis do oznaczania aktywności antytrypsynowej stosowali mikrometodę taninową. Celem tej pracy było bliższe określenie aktywności antyproteolitycznej białek nasion jęczmienia. Do badania przebiegu proteolizy w obecności i nieobecności białek nasion jęczmienia, oprócz metody taninowej, zastosowano również metodę Kunitza.

MATERIAŁY I METODY

Chemikalia. Handlowy preparat taniny produkcji ZSRR — serii 5565 oczyszczano przez ekstrakcję do octanu etylu według Armitage'a (1961) i sprawdzano na czystość w elektroforezie bibułowej według Mejbaum-Katzenellenbogen & Kudrewicz-Hubickiej (1966). Żelatyna była sprawdzana na czystość przez oznaczenie zawartości azotu. Użyto kazeiny produkcji British Drug House, Poole, Anglia, trypsynę produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie — seria 10365 oraz alfa-chymotrypsynę krystaliczną wypreparowaną według metody Kunitza (1936) w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Kwas trójchlorooctowy był firmy Reanal Fiomvegyszergyar — Budapeszt, natomiast pozostałe odczynniki były cz.d.a. produkcji „Polskie Odczynniki Chemiczne” — Gliwice.

Materiał roślinny. Nasiona jęczmienia browarnianego PZHR, odsiew pierwszy, zbiór z 1967 roku oraz z 1968 pochodziły z Katedry Biologii i Przechowalnictwa Nasion IHAR we Wrocławiu i z Wojewódzkiej Stacji Oceny Odmian Zakładu Doświadczalnego w Zebiszowie.

Ekstrakcję białka z nasion przeprowadzono w ten sposób, że 5 do 10 g nasion mielono w młynku elektrycznym nożowym przez 3 do 4 min. Jeden gram uzyskanej mąki zalewano 10 ml wody lub 0,9% NaCl, wytrząsano mechanicznie 30 min. i wirowano przy 12 000 obrotów na minutę przez 20 min. Osad odrzucano.

Metody analityczne. Białko oznaczano przy 280 m μ w spektrofotometrze produkcji Carl Zeiss — Jena typ VSU-1 oraz mikrometodą taninową według Mejbaum-Katzenellenbogen (1955). W metodzie taninowej zmętnienie mierzono w fotokolorymetrze Pulfricha przy użyciu filtra S 61.

Aktywność trypsynową oznaczano metodą Mejbaum-Katzenellenbogen, Wilusza i Polanowskiego (1966) oraz metodą Kunitza (1947). W obu metodach jako substratu używano kazeiny, którą rozpuszczano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6 oraz jako enzymu, trypsynę rozpuszczoną w 0,0025 M HCl. W metodzie Mejbaum-Katzenellenbogen, Wilusza i Polanowskiego przebieg proteolizy mierzono w teście peptydowym, oznaczając przyrost produktów nie reagujących z taniną lub w teście polipeptydowym, oznaczając polipeptydy rozpuszczone w kwasie trójchlorooctowym i reagujące z taniną. W pierwszym przypadku reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 1 ml odczynnika taninowego do 1 ml mieszaniny inkubacyjnej (w tym samym momencie rozpoczyna się oznaczanie białka metodą taninową). W drugim przypadku, jak i w metodzie Kunitza, reakcję przerywano przez dodanie do 2 ml inkubatu 3 ml 5% kwasu trójchlorooctowego.

WYNIKI

Porównanie oznaczania aktywności trypsyny metodą Kunitza i metodą taninową

Na wykresie 1 przedstawiono oznaczanie aktywności trypsyny metodą Kunitza. Z tego samego inkubatu pobierano próbki do oznaczania „frakcji” produktów peptydowych nie oznaczających się taniną, a z odbiałcza kwa-

Wykres 1. Oznaczanie aktywności trypsyny testem Kunitza

Warunki testu podano pod tabelą 1

Trypsin activity assayed after Kunitz

Details are given in Tab. 1

su trójjchlorooctowego próbki do oznaczania polipeptydów reagujących z taniną. Wyniki przedstawiono na wykresie 2. Krzywa I przedstawia aktywność trypsyny mierzoną testem peptydowym a krzywa II testem polipeptydowym. Krzywa III daje sumę produktów wyrażonych w mikrogramach strawionego substratu.

Ekstynkcja właściwa kazeiny wynosiła $E_{280 \text{ m}\mu}^{0,1}$ 1,48. W teście Kunitza mikrogramy strawionej kazeiny obliczono z odczytanej ekstynkcji przy 280 m μ .

Jak widać z danych przedstawionych w tabeli 1 suma produktów oznaczonych testem peptydowym i polipeptydowym w metodzie taninowej odpowiada stężeniu produktów oznaczonych metodą Kunitza.

Wykres 2. Aktywność trypsyny mierzona testem peptydowym i polipeptydowym

I — test peptydowy; II — test polipeptydowy; III — suma produktów proteolizy

Warunki testu podano pod tabelą 1

Trypsin activity assayed by peptide and polypeptide test

I — peptide test; II — polypeptide test; III — sum of products of proteolysis

Details of the assay are given in Tab. 1

Wykres 3. Przebieg trawienia kazeiny przez białka nasion jęczmienia

Trawienie przeprowadzono w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6 w 30°C. 1 ml inkubatu zawiera 82 μg kazeiny i 18 μg białek nasion jęczmienia ekstrahowanych do 0,9% NaCl. Przyrost produktów proteolizy mierzono w teście peptydowym

Time-course of casein digestion by proteins of barley seeds

Digestion was carried out in 0,1 M phosphate buffer, pH 7,6 at 30°C. 1 ml of the incubation mixture contained 82 μg of casein and 18 μg of the protein extracted with 0,9% NaCl. Increase of products of proteolysis was measured by the peptide test

Białka z nasion jęczmienia i ich aktywność proteolityczna

Przebadano wpływ czasu ekstrakcji na zawartość białek w wyciągach wodnych i chlorkowych z nasion jęczmienia. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2. Najwięcej białek ekstrahowało się po 60 minutach.

Tabela 1 — Table 1

Oznaczanie aktywności trypsyny metodą taninową i Kunitza
Determination of trypsin activity with tannin and by the method of Kunitz

Trypsyna μg/ml. inkubatu Trypsin μg/ml of incubation mixture	Produkty proteolizy w μg/ ml inkubatu Products of proteolysis in μg/ml incubation mixture	
	oznaczone metodą taninową estimated with tannin	$E_{280\text{ m}\mu}^1 \cdot 0,676 \cdot 10^3$
0,0	0	0
0,2	47	34
0,5	120	95
1,0	204	165
1,5	275	254
2,0	342	338

Trawienie kazeiny trypsyną prowadzono w 30°C przez 20 minut w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7.6. 1 ml inkubatu zawierał 0,8 mg kazeiny i od 0 do 2 μg trypsyny.

Przy oznaczaniu białka w teście peptydowym pobierano z inkubatu 0,1 ml. W teście polipeptydowym i Kunitza do 2 ml inkubatu dodawano 3 ml 5 % kwasu trójchłorooctowego i po odwirowaniu do oznaczania pobierano 1 ml przesącza.

Digestion of casein was carried out at 30°C for 20 min. in 0,1 M phosphate buffer, pH 7.6. 1 ml of the incubation mixture contained 0,8 mg of casein and 0 to 2 μg of trypsin.

For protein estimation by the peptide test 0,1 ml from the incubation mixture was taken. In the polypeptide test and in the method of Kunitz 3 ml of 5% TCA were added to 2 ml of the incubation mixture the samples were centrifuged and 1 ml aliquots from the supernatant were taken for protein determination.

Tabela 2 — Table 2

Ekstrakcja białek z nasion jęczmienia do wody i 0,9% NaCl
Extraction of protein from barley seeds to water and to 0,9% NaCl

Czas ekstrakcji w minutach Extraction time min.	Ekstrakcja do wody Extraction to water	Ekstrakcja do 0,9% NaCl Extraction to 0,9% NaCl
	g białek/100 g pow. suchej masy g of protein/100 g of air dried material	g białek/100 g pow. suchej masy g of protein /100 g of air dried material
15	1,325 ± 0,05	1,870 ± 0,05
30	2,300 ± 0,05	3,310 ± 0,05
60	2,460 ± 0,05	3,410 ± 0,05
120	2,170 ± 0,05	3,220 ± 0,05
180	2,110 ± 0,05	2,880 ± 0,05

Dalsze przedłużanie czasu ekstrakcji powodowało spadek ilości białek. Ze 100 gramów nasion po 60 minutach ekstrahuje się do 0,9% NaCl 3,4 g a do wody 2,5 g białek. Tak w wyciągach wodnych, jak i chlorkowych, przechowywanych przez 24 godz. w 4°C, stężenie białek spadało do 50% a w 20°C do 30% ilości początkowej.

Przebieg trawienia kazeiny przez białka wyciągu chlorkowego w pH 7,6 przedstawia wykres 3. Białka nasion jęczmienia wykazują słabą aktywność proteolityczną w środowisku zasadowym. W środowisku kwaśnym białka te nie trawiły kazeiny.

Aktywność antytrypsynowa białek nasion jęczmienia

Na wykresie 4 przedstawiono przebieg trawienia kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności białek nasion jęczmienia. Przebieg proteolizy mierzono oznaczając ubytek substratu mikrometodą taninową. W obec-

Wykres 4. Trawienie kazeiny trypsyną w obecności i nieobecności białek nasion jęczmienia (test peptydowy)

1 ml inkubatu zawierał 78 µg kazeiny, 1 µg trypsyny, temperatura inkubacji 30°C, pH 7,6
1 — próba właściwa (16 µg białek nasion jęczmienia); 2 — próba kontrolna (bez białek nasion jęczmienia)

Digestion of casein by trypsin in the presence or absence of proteins from barley seeds (peptide test)

1 ml of the incubation mixture contained 78 µg of casein, 1 µg of trypsin, the temperature was 30°C, pH 7,6

1 — sample containing 16 µg of proteins; 2 — sample without proteins

ności 16 µg białek nasion jęczmienia występowało wyraźne hamowanie aktywności 1 µg trypsyny, które utrzymywało się przez cały okres doświadczenia.

W następnym doświadczeniu oznaczano aktywność inhibitora. W tym celu mierzono przyrost produktów nie oznaczających się taniną oraz przyrost produktów przechodzących do kwasu trójchlorooctowego i oznacza-

Wykres 5. Hamowanie aktywności proteolitycznej trypsyny przez białka nasion jęczmienia

1 ml inkubatu zawierał 0,66 mg kazeiny, 2 μg trypsyny i od 0, do 98 μg białek nasion jęczmienia. Warunki inkubacji podano w tabeli 1

I — test peptydowy; II — test polipeptydowy; III — suma produktów proteolizy

Inhibition of proteolytic activity of trypsin by proteins from barley seeds

1 ml of incubation mixture contained 0,66 mg of casein, 2 μg of trypsin and 0 to 98 μg of protein. Details are given in Tab. 1

I — peptide test; II — polypeptide test; III — sum of proteolytic products

Wykres 6. Hamowanie aktywności proteolitycznej trypsyny przez białka nasion jęczmienia mierzone w teście Kunitza

Inkubację prowadzono w 35°C w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,6 przez 20 min. 1 ml inkubatu zawierał 4,5 mg kazeiny, 2 μg trypsyny i od 0 do 100 μg białek nasion jęczmienia ekstrahowanych do 0,9% NaCl.

Inhibition of proteolytic activity of trypsin by proteins from barley seeds measured after Kunitz

Incubation was carried out at 35°C in 0,1 M phosphate buffer, pH 7,6 for 20 min. 1 ml of the incubation mixture contained 4,5 mg of casein, 2 μg of trypsin and 0 to 100 μg of protein from barley seeds extracted with 0,9% NaCl

Wykres 7. Trawienie kazeiny alfa-chymotrypsyną w obecności białek nasion jęczmienia

1 ml inkubatu zawierał 79 µg kazeiny, 1 µg alfa-chymotrypsyny i od 0 do 23 µg białek nasion jęczmienia ekstrahowanych do 0,9% NaCl. Temperatura inkubacji 30°C, pH 7,6

1 — bez inhibitora; 2 — 7 µg inhibitora/1 ml; 3 — 15 µg inhibitora/ml; 4 — 23 µg inhibitora/1 ml

Digestion of casein by alfa-chymotrypsin in the presence of proteins from barley seeds

1 ml incubation mixture contained 79 µg of casein, 1 µg alfa-chymotrypsin and 0 to 23 µg of protein from barley seeds extracted with 0,9% NaCl. The temperature was 30°C, pH 7,6

1 — sample without inhibitor; 2 — 7 µg of inhibitor per 1 ml; 3 — 15 µg of inhibitor per 1 ml; 4 — 23 µg of inhibitor per 1 ml

Wykres 8. Hamowanie aktywności proteolitycznej alfa-chymotrypsyny przez białka nasion jęczmienia

1 ml inkubatu zawierał 79 µg kazeiny, 1 µg alfa-chymotrypsyny i od 0 do 23 µg białek nasion jęczmienia. Inkubację prowadzono w 30°C przez 10 min. w pH 7,6

Inhibition of proteolytic activity of alfa-chymotrypsin by proteins from barley seeds

1 ml of incubation mixture contained 79 µg of casein, 1 µg of alfa-chymotrypsin, 0 to 23 µg of protein from barley seeds. Incubation was carried out at 30°C for 10 min. pH 7,6

jących się taniną przy kilku różnych stężeniach białek wyciągu. Wyniki powyższego doświadczenia przedstawiono na wykresie 5.

W cieście peptydowym uzyskano połowiczne hamowanie przy stosunku enzymu do inhibitora wynoszącym 1 : 25. Podobnie przebiegało hamowanie powstawania polipeptydów. Połowicze hamowanie trypsyny, mierzone jako suma produktów proteolizy (krzywa III), uzyskuje się przy stosunku enzymu do inhibitora wynoszącym 1 : 30. Na wykresie 6 przedsta-

wiono wyniki oznaczania aktywności antytrypsynowej białek nasion jęczmienia testem Kunitza. Połowiczne hamowanie uzyskano przy stosunku enzymu do inhibitora wynoszącym 1 : 25.

Aktywność antychymotrypsynowa białek nasion jęczmienia

Badania aktywności antychymotrypsynowej białek nasion jęczmienia przeprowadzono w warunkach mikrotestu peptydowego. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie 7 i 8. Przeprowadzono trzy serie badań, które różniły się między sobą stężeniem białek wyciągu. Połowiczne hamowanie aktywności enzymu uzyskano przy stosunku enzymu do inhibitora wynoszącym 1 : 20.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania właściwości białek ekstrahowanych z nasion jęczmienia wykazały, że posiadają one słabą aktywność proteolityczną tak wobec białek pochodzących z nasion, jak i wobec kazeiny. Białka te wykazują również aktywność antytrypsynową, która została stwierdzona przez Lorenck-Kubis w wyciągach wodnych i chlorkowych i potwierdzona w tej pracy. Białka te posiadają również aktywność antychymotrypsynową, która wydaje się być typową dla wszystkich inhibitorów trypsynowych pochodzenia roślinnego.

Biorąc pod uwagę, że aktywność antyproteolityczną białek nasion jęczmienia badano w wyciągach bez próby izolowania inhibitora, należy stwierdzić, że aktywność ta jest duża.

Przeprowadzając badania porównawcze nad oznaczaniem aktywności proteolitycznej trypsyny metodą Kunitza i taninową wykazano, że uzyskiwane wyniki w obu metodach są zbliżone. Jednakże stosując w metodzie taninowej test peptydowy i polipeptydowy uzyskuje się wgląd w proces trawienia kazeiny, gdyż można śledzić powstawanie niskich peptydów i aminokwasów nie oznaczających się taniną oraz polipeptydów przechodzących do kwasu trójchlorooctowego i oznaczających się taniną. Suma wyników uzyskanych w teście peptydowym i polipeptydowym jest obrazem całkowitej działalności proteolitycznej trypsyny, ujmującym powstałe w danych warunkach wszystkie produkty trawienia. Test Kunitza daje natomiast możliwość śledzenia powstawania produktów rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym i absorbujących światło przy 280 mμ.

Analiza trawienia kazeiny trypsyną uwidacznia rozbieżności między powstawaniem „frakcji” peptydowej i polipeptydowej. Powstawanie peptydów jest wprost proporcjonalne do ilości enzymu, natomiast ilość polipeptydów jest proporcjonalna tylko przy niskich stężeniach trypsyny

w inkubacie. Zwiększanie stężenia enzymu powoduje tylko minimalne przyrosty polipeptydów.

W teście Kunitza przy niskich stężeniach enzymu otrzymuje się niższe wyniki od wyników otrzymanych metodą taninową. Przy wyższym stężeniu trypsyny suma produktów proteolizy oznaczona metodą taninową jest zbliżona do wyników uzyskanych w teście Kunitza. Świadczyłoby to o tym, że przy niższych stężeniach enzymu, a więc w początkowym etapie proteolizy, powstają produkty degradacji kazeiny ubogie w aminokwasy aromatyczne, a przy wyższych stężeniach, gdy proteoliza dobiega do końca, ilość aminokwasów aromatycznych powstałych produktów odpowiada ich zawartości w białku trawionym.

STRESZCZENIE

W białkach nasion jęczmienia stwierdzono występowanie aktywności antytrypsynowej i antychymotrypsynowej. Białka te wykazują słabą aktywność proteolityczną w środowisku zasadowym.

Przeprowadzając badania porównawcze nad oznaczaniem aktywności proteolitycznej trypsyny metodą Kunitza i taninową wykazano, że wyniki uzyskane w obu metodach są zbliżone, a suma wyników uzyskanych w teście peptydowym i polipeptydowym odpowiada produktom proteolizy oznaczanym w metodzie Kunitza.

*Katedra Biochemii
Uniwersytetu Wrocławskiego*

(Wpłynęło dn. 22.02.1969 r.)

SUMMARY

In proteins from barley seeds the anti-trypsin and anti-chymotrypsin activities were found. These proteins were also found to exhibit a weak proteolytic activity in alkaline medium.

Comparative studies on the determination of the proteolytic activity of trypsin after Kunitz and using the tanin method gave similar results for both these methods. The sum of degradation products estimated by the use of the peptide and polypeptide tests was in agreement with the amount of products of proteolysis determined after Kunitz.

LITERATURA

- Armitage R., Bayliss G. S., Gramshaw J. W., Haslam E., Haworth R. D., Jones K., Rogers H. J., Searle T. J., 1961, *J. Chem. Soc.* 1842.
- Ferenczy L., 1957, *Acta Biol. Hung.* 8: 31.
- Kunitz M., 1936, *J. Gen. Physiol.* 19: 991.
- Kunitz M., 1946, *J. Gen. Physiol.* 29: 149.
- Kunitz M., 1947, *J. Gen. Physiol.* 30: 231.
- Learmonth E. M., Wood J. C., 1963, *Cereal Chem.*, 40: 63.
- Lorenc-Kubis I., 1963, *Acta Soc. Bot. Pol.* 38: 165.
- Mayer A. M., Poliakoff-Mayber A., 1963, *The germination of Seeds*, Pergamon Press Oxford, London—New York—Paris.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1955, *Acta Biochim. Polon.* 2: 279.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Kudrewicz-Hubicka Z., 1966, *Acta Biochim. Polon.* 13: 57.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Wilusz T., Polanowski A., 1966, *Acta Biochim. Polon.*, 13: 87.
- Polanowski A., 1967, *Acta Biochim. Polon.*, 14: 389.
- Rackis J. J., Sasame H. A., 1962, *Arch. Biochem. Biophys.* 98: 471.
- Sumere C. F., 1960, *Phenolics in Plants in Health and Disease*, Pergamon Press, Oxford.
- Shyamala G., Kennedy B. M., Lyman R. L., 1961, *Nature*, 192, 1825.