

JÓZEFA CHRZANOWSKA, WACŁAW LESZCZYŃSKI  
*Akademia Rolnicza we Wrocławiu*

## INHIBITORY ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH ZAWARTE W BULWACH ZIEMNIAKA W ŚWIETLE LITERATURY

Jednym z podstawowych produktów rolnych w Polsce, a także w wielu innych krajach, jest ziemniak. Ze względu na jego rozpowszechnienie i wysokie zbiory oraz wartość odżywczą odgrywa on poważną rolę jako pokarm i pasza.

Ważnym składnikiem bulw ziemniaka obok skrobi jest białko, które ze względu na występowanie w nim wszystkich aminokwasów egzogennych posiada wysoką wartość biologiczną, równą białku zwierzęcemu. Białko ziemniaka stanowi kompleks wielu różnorodnych frakcji białkowych o różnych właściwościach fizyczno-chemicznych i biologicznych.

Grupę specyficznych białek ziemniaka, ważnych z punktu widzenia żywieniowego, stanowią inhibitory enzymów proteolitycznych, blokujące procesy proteolizy. Wyizolowane przez różnych autorów inhibitory różnią się pod względem specyficzności działania, składu aminokwasowego, termostabilności i ruchliwości elektroforetycznej oraz ciężaru cząstkowego i punktu izoelektrycznego. Występują one w ziemniaku zarówno w częściach zielonych, jak i w bulwach [25], w których stwierdzono ich najwyższą zawartość [34]. Sohonie i Ambe [33] uzyskali z bulw ziemniaka inhibitor enzymu proteolitycznego trypsyny, Rancour i Ryan [24] karboksypeptydazy B, Moriya i in. [21] inhibitor kallikreiny.

Hochstrasser (9) wyizolował z ziemniaka poliwalentny inhibitor, który hamował aktywność czterech enzymów: trypsyny, chymotrypsyny, plazminy i kallikreiny. Poliwalentność ta może być uwarunkowana zdolnością reagowania jednego centrum aktywnego inhibitora z kilkoma enzymami lub wiąże się z obecnością kilku takich centrów w cząsteczce inhibitora.

Santorius i Belitz (29) wykazali, że otrzymany przez nich inhibitor A5 z ziemniaka zawierał niezależne od siebie centra dla hamowania trypsyny i  $\alpha$ -chymotrypsyny.

Balls i Ryan (2, 3) otrzymali inhibitor chymotrypsyny w postaci krystalicznej, który w czasie ultrawierowania zachowywał się jak substancja homogenna. Oprócz aktywności antychymotrypsynowej inhibitor ten ob-

nizał również aktywność innych enzymów proteolitycznych — karboksypeptydazy B, trypsyny oraz proteaz z *Bacillus subtilis* i *Streptomyces griseus*. Natomiast karboksypeptydaza A, pepsyna, rennina i enzymy proteolityczne roślin, takie jak papaina, bromelina i ficyna nie ulegały jego działaniu (26). W dalszych badaniach nad tym inhibitorem (19) przy zastosowaniu chromatografii jonowymiennej rozdzielono go na cztery podjednostki. Różniły się one między sobą składem aminokwasowym, ruchliwością elektroforetyczną, reaktywnością z trypsyną i chymotrypsyną oraz podatnością na działanie pepsyny. Dlatego też uważa się, że ten inhibitor jest heterogenną mieszaniną izoinhibitorów o swoistych właściwościach biochemicznych. Badany inhibitor (o ciężarze cząsteczkowym 30 000) wykazywał dużą odporność na działanie wysokiej temperatury nie tracąc swych właściwości przy przetrzymywaniu go 30 minut w temperaturze 80°C. Jeszcze większą termostabilnością charakteryzowały się inhibitory wyizolowane z bulw ziemniaka przez Iwasaki i in. (10), zachowujące swoją aktywność nawet w temperaturze 100°C, przy pH 2,3—3,3. Inhibitory te hamowały aktywność chymotrypsyny i bakteryjnej proteazy Nagarse, trypsynę natomiast hamował tylko jeden z nich, inhibitor IIa.

Dalsze badania Iwasaki (11) nad tym inhibitorem wykazały, że zawiera on w swym centrum, które było reaktywne w stosunku do trzech wyżej wymienionych enzymów, lizynę i serynę (stanowiące 63 i 64 resztę aminokwasową). Małowa i in. (17) poddała rozdziałowi metodą izoelektrofuksovania (ogniskowania izoelektrycznego) w gradiencie pH 3—10 i 5—8 preparat termostabilnych białek z ziemniaka odpornych na działanie temperatury 85°C przez 5 minut. Uzyskała tą drogą 8 frakcji, wykazujących aktywność antytrypsynową i antychymotrypsynową i posiadających punkty izoelektryczne przy różnym pH. Inhibitorem trypsyny i chymotrypsyny okazało się także białko o ciężarze cząsteczkowym 31 000 i punkcie izoelektrycznym przy pH 7,2 wyizolowane przez Mosołowa i in. (20), posiadające w swym centrum aktywnym resztę argininy. Badania Santoriusa i Belitza (30), przeprowadzone w oparciu o chemiczną modyfikację lizyny i argininy w termostabilnych inhibitorach ziemniaka A4, A5 i A7 potwierdziły, że inhibitory te są typu argininowego. Z wcześniejszych badań nad wyodrębnionym z nasion soi inhibitorem Kunitza (6) wynika, że w przypadku występowania w centrum aktywnym tak lizyny, jak i argininy, inhibitor ten wykazywał te same właściwości. Fritz i in. (5) stwierdził, że inhibitory zawierające resztę argininy w centrum aktywnym przejawiają działanie antytrypsynowe. Wyizolowane przez Belitza (cyt. za 17) trzy termostabilne inhibitory o punktach izoelektrycznych przy pH 5,1; 6,3; 7,2 hamowały esterazową aktywność trypsyny i proteolityczną  $\alpha$ -chymotrypsyny.

Sawada i in. (31) otrzymał silnie antytrypsynową frakcję H o ciężarze

cząsteczkowym 5500 i punkcie izoelektrycznym leżącym powyżej pH 10, którą dalej rozdzielił na 6 frakcji polipeptydowych. Inhibitory te charakteryzowały się dużą termostabilnością, zwłaszcza w kwaśnym środowisku. Nie traciły swej aktywności w czasie 30 minut ogrzewania w 75°C w odczynie kwaśnym i neutralnym. Przejawiały one hamowanie aktywności trypsyny,  $\alpha$ -chymotrypsyny, elastazy, kallikreiny, plazminy i trombiny. Badany przez Worowskiego (35) inhibitor z bulw ziemniaka obniżał aktywność trypsyny, chymotrypsyny, plazminy, pronazy i katepsyn.

Wyniki badań dotyczących działania ziemniaczanych inhibitorów na proteazy pochodzenia roślinnego są rozbieżne. McDonald i Chee (18) wykazali brak obniżenia aktywności proteolitycznej mąki pszennej przez inhibitory chymotrypsyny. Natomiast Fałunina i in. (4) stwierdziła, że zawarte w soku ziemniaczanym termolabilne i termostabilne inhibitory hamowały aktywność proteinaz pszenicy, jak i dodawanej do mąki pąpajny.

Inhibitory enzymów proteolitycznych, występujące w bulwach ziemniaka w stosunkowo dużych ilościach, zostały sklasyfikowane przez Kaisera i Belitza (12) w podgrupy. Za kryterium podziału przyjęli oni specyficzność działania inhibitorów:

I grupa — specyficzne inhibitory trypsyny,

II grupa — inhibitory działające na trypsynę i na chymotrypsynę,

III — inhibitory o bardzo szerokim zakresie działania, hamujące także proteazy serynowe mikroorganizmów.

Inhibitory enzymów proteolitycznych występujące w bulwach ziemniaka mogą występować jako grupy izoinhibitorów i ich rozdział łącznie z rozdziałem całego kompleksu białek stanowi cechę charakterystyczną dla danej odmiany. Tę właściwość wykorzystał Kaiser i in. (13) do identyfikacji odmian ziemniaka. Zastosował on metodę elektrofokusowania w żelu poliakrylamidowym, uzyskując 42 frakcje białkowe i 21 frakcji inhibitorowych w 12 odmianach ziemniaka, przy czym każda z odmian posiadała swoisty obraz inhibitorów trypsyny i chymotrypsyny.

Rola inhibitorów enzymów proteolitycznych w roślinie nie jest jeszcze wyjaśniona. Stwierdzono akumulację inhibitorów w liściach ziemniaka pod wpływem uszkodzenia przez owady lub okaleczenia mechanicznego (28). Senser, Belitz i in. (32) stwierdzili, że pod wpływem inhibitorów zawartych w bulwach ziemniaka następuje zahamowanie aktywności proteolitycznej 108 szczepów drobnoustrojów patogennych i saprofitycznych wyizolowanych z nadgniętych bulw. Fakty te sugerują, że inhibitory proteaz mogą służyć jako czynnik obrony przed infekcją. Również Worowski (35) tłumaczy rolę inhibitorów roślinnych w zabezpieczeniu białka przed hydrolizą enzymatyczną oraz przed atakiem bakterii i pleśni w czasie przechowywania roślin.

Spadek stężenia inhibitorów proteaz w starszych roślinach (1, 27) zdaje się wskazywać też na ich rolę w przemianach białkowych.

Inhibitory enzymów proteolitycznych mają szczególnie duże znaczenie ze względu na swój wpływ na wartość odżywczą białka i jego przyswajalność przez organizmy — ludzki i zwierzęcy. Już w 1917 r. Osborne i Mendel (23) stwierdzili hamowanie wzrostu szczurów karmionych surowymi nasionami soi, stanowiącymi bogate źródło białka. Natomiast nasiona poddane obróbce termicznej nie dawały tego efektu. Badania wielu autorów (14, 15) wykazały, że zaburzenia w przyswajalności białka u zwierząt są wynikiem obecności inhibitorów trypsyny w paszy. W doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach porównywano działanie naturalnego inhibitora trypsyny z nasion fasoli z syntetycznym inhibitorem p-aminobenzamidyną (7, 8). Obie te substancje wykazywały taki sam efekt działania — zahamowanie wzrostu zwierząt, hipertrofię trzustki i wzmożone wydzielanie enzymów trzustkowych. Pociągało to za sobą utratę przez organizm pewnej ilości aminokwasów, zwłaszcza siarkowych pochodzenia tkankowego, zużytkowywanych na pokrycie zapotrzebowania związanego ze wzmożoną syntezą wydzielanych enzymów, które w efekcie były wydalane z kałem.

Worowski (36) stwierdził, że inhibitory enzymów proteolitycznych, występujące w bulwach ziemniaka, są odporne na działanie wysokiej temperatury. Wysoka ich termostabilność powoduje to, że nie ulegają one inaktywacji w czasie przygotowania ziemniaka do spożycia przy zastosowaniu obróbki cieplnej. Ponadto inhibitory te nie są degradowane i inaktywowane przez pepsynę. Wskutek tego zachowują one swoją aktywność antyproteolityczną w przewodzie pokarmowym. Zawarte w bulwach ziemniaka inhibitory proteaz wraz ze spożytym pokarmem przedostają się do jelita cienkiego i dwunastnicy, gdzie mogą hamować procesy proteolizy białek, powodując gorsze ich trawienie, obniżając tym samym ich wartość biologiczną. Badania Worowskiego (36) na szczurach nie potwierdziły wprawdzie tego przypuszczenia, gdyż ilości wydalanego z kałem azotu przez zwierzęta, w przypadku dodawania do ich paszy inhibitorów ziemniaczanych, zwiększały się tylko nieznacznie. Równocześnie jednak stwierdzono w tych doświadczeniach pobudzenie czynności wydzielniczych trzustki, co może powodować zaburzenia opisane przez uprzednio cytowanych autorów (7, 8, 14, 15).

Jak dotąd, nie badano wpływu czynników środowiskowych i warunków uprawy ziemniaka na ilość i aktywność inhibitorów proteaz w bulwach. Ryan i in. (27) wykazał wpływ stanu fizjologicznego rośliny, jej wieku i warunków środowiskowych na poziom aktywności inhibitora. Stwierdził również różnicę w poziomie tej aktywności w różnych tkankach ziemniaka, przy czym całkowity jej brak wykazał w kwiatach, na-

sionach i w ksylemie. Worowski i Szmitkowski (34) stwierdzili również różnice w ilości inhibitorów w bulwach w zależności od odmiany ziemniaka. Ryan (28) stwierdził wzrost aktywności inhibitora chymotrypsyny w liściach ziemniaka sztucznie uszkodzonych. Lipsic i in. (16), fakt odmiennych właściwości białek wyizolowanych z bulw roślin zawirusowanych i roślin zdrowych tłumaczy możliwością zwiększenia aktywności inhibitorów proteaz w bulwach pod wpływem infekcji wirusowej.

Na podstawie stwierdzonego wpływu fungicydów na aktywność występującego w bulwach ziemniaka białkowego inhibitora tyrozynazy (22), można przypuszczać o istnieniu ich wpływu również na inhibitory enzymów proteolitycznych. Wydaje się też prawdopodobnym, że herbicydy powodujące zaburzenia w metabolizmie związków azotowych w bulwie, poprzez działanie na enzymy cyklu przemian azotowych (37) mogą wywoływać zmiany w ilości i aktywności inhibitorów proteaz zawartych w bulwach ziemniaka. Nie jest wykluczone, że i inne zabiegi, np. nawożenie zwłaszcza azotowe, czy sposób przechowywania oddziałują na inhibitory proteaz ziemniaka. Ponadto sposób przetworzenia ziemniaka na produkty spożywcze oraz paszowe również może wpływać na aktywność inhibitorów proteaz. W technologii produkcji wyrobów spożywczych z bulw ziemniaka dąży się do skrócenia działania na nie wysoką temperaturą. Ma to między innymi na celu obniżenie strat witaminy C, jakie powstają w czasie obróbki termicznej. Nie wykluczone, że wskutek takiego postępowania, zawarte w bulwach termostabilne inhibitory enzymów proteolitycznych pozostają nie zainaktywowane w gotowym produkcie i mogą przejawiać szkodliwe działanie w procesach trawiennych.

Wynika z tego potrzeba dalszych badań nad właściwościami inhibitorów proteaz występujących w bulwach ziemniaka oraz nad wpływem różnych czynników na zawartość i aktywność tych inhibitorów, w celu uniknięcia ujemnych skutków wywołanych ich działaniem.

#### LITERATURA

1. Ambe K.S., Sohoni K., *Experientia*, 12, 1956, 302.
2. Balls A.K., Ryan C.A., *Science* 138, 1962, 983.
3. Balls A.K., Ryan C.A., *J. Biol. Chem.* 238, 1963, 2976.
4. Fałunina Z.F., i in. *Prakł. Biochem. i Mikrobiol.*, 12/6, 1976, 894.
5. Fritz H., Fink E., Gebhardt M., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1969, 933.
6. Fritz H., Tschesche H., Greene L.J., Truscheit E., *Proteinase Inhibitors. Proceedings of the Second International Research Conference*, Springer-Verlag, Berlin 1974, 331.
7. Geratz J.D., *Amer. J. Physiol.* 214, 1968, 595.
8. Geratz J.D., *Amer. J. Physiol.* 216, 1969, 812.

9. Hochstrasser K., Werle E., Siegelmann R., Hoppe-Seylers, Z. *Physiol. Chem.* 350, 1969, 897.
10. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., *J. Biochem.* 70, 1971, 817.
11. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., *J. Biochem.* 73, 1973, 1039.
12. Kaiser K.P., Belitz H.D., *Z. Lebensm. Unters. u. Forschung* 151, 1973, 18.
13. Kaiser K.P., Bruhn L.Ch., Belitz H.D., *Z. Lebensm. Unters. u. Forschung* 154, 1974, 339.
14. Kakade M., Simons N., Liener J.E., *J. Nutr.* 100, 1970, 1003.
15. Khayambashi H., Lyman R.L., *J. Nutr.* 89, 1966, 455.
16. Lipsic D.W., Czegolina M., *Sel.-choz. Biol.*, V. 1970, 583.
17. Małowa E.I., Szulmina A.M., Mosołow H.W., *Prikl. Bioch. i Mikrob.* 11 (4), 1975, 576.
18. McDonald C.E., Chee L.J., *Cereal Chem.*, 41, 1964, 443.
19. Melville J., Ryan C.A., *J. Biol. Chem.*, 247, 1972, 3444.
20. Mosołow F.W., Szulmina A.U., Małowa E.L., *Biochim.* 39 (5), 1974, 956.
21. Moriya H., Hojima Y., Moriwaki C., Tajima T., *Experientia* 26, 1970, 720.
22. Niłowa W.P., *Chim. Sel.-choz.*, 7, 1974, 44.
23. Osborne T.B., Mendel L.B., *J. Biol. Chem.* 32, 1919, 369.
24. Rancour J.M., Ryan C.A., *Arch. Bioch. Biophys.*, 125, 1968, 380.
25. Ryan C.A., Huisman O.C., *Nature* 214, 1967, 1047.
26. Ryan C.A., *Biochemistry* 5, 1966, 1592.
27. Ryan C.A., Huisman C.C., Denburgh E.V., *Plant Physiol.*, 43, 1968, 589.
28. Ryan C.A., *Plant Physiol.*, 43, 1968, 1859.
29. Santorius K., Belitz H.D., *Z. Lebensm. Unters. u. Forschung* 154, 1974, 206.
30. Santorius K., Belitz H.D., *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 3, 1975, 161.
31. Sawada J. i in. *Agr. Biol. Chem.* 38 (12), 1974, 2559.
32. Senser F., Belitz H.D., Kaiser K.P., Santorius K., *Z. Lebensm. Unters. u. Forschung*, 155, 1974, 100.
33. Sohnie K., Ambe K.S., *Nature* 176, 1955, 972.
34. Worowski K., Szmitkowski M., *Roczn. Techn. i Chemii Żywności*, 22, 1972, 3.
35. Worowski K., Mariak R., *Acta Polon. Pharm.*, 30 (4), 1973, 453.
36. Worowski K., *Bromat. i Chemia Toksykol.*, VIII, (2), 1975, 199.
37. Wu M.T., Salunkhe D.K., *Crit. Rev. Food Technol.*, 4, 1973, 507.