

Marta Siergiejuk, Anna Worowska, Alicja Karwowska¹⁾, Marek Gacko

AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA NASION ROŚLIN SPOŻYWANYCH PRZEZ CZŁOWIEKA

Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. med. M. Gacko

¹⁾ Zakład Higieny i Epidemiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. J. K. Karczewski

Ekstrakt z nasion bobu, dyni, fasoli, gorczycy, grochu, gryki, jęczmienia, kukurydzy, maku, owsa, prosa, pszenicy, słonecznika, soczewicy i żyta posiada pH od 4,68 do 6,27 i w tym pH wykazuje aktywność proteolityczną. Wysoką aktywność proteolityczną wykazuje także w pH kwasowym i mniejszą w pH obojętnym i zasadowym.

Hasła kluczowe: nasiona, aktywność proteolityczna.

Key words: seeds, proteolytic activity.

Nasiona różnych gatunków roślin zawierają enzymy proteolityczne i ich inhibitory (1, 2, 3). Znany jest wpływ tych składników na trawienie białek w przewodzie pokarmowym (4, 5, 6). Dotychczasowe badania mają jednak charakter fragmentaryczny i dotyczą nasion pojedynczych gatunków roślin, aktywności określonych proteinaz i inhibitorów określonych proteinaz.

Celem pracy jest ocena aktywności proteolitycznej ekstraktu z nasion 15 gatunków roślin spożywanych przez człowieka, w zakresie pH od 2,0 do 10,0.

MATERIAŁ I METODY

Hemoglobina wołowa Difco Lab. USA; odczynnik *Folina* i *Ciocalteau* Merck; odczynnik *Bradforda* i kwas trichlorooctowy (TCA) Sigma; odczynnik miedziowy o składzie: 1 objętość $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczony w 1 mol/dm³ cytrynianu sodu $\times 5\text{H}_2\text{O}$ i 30 objętości 10% Na_2CO_3 ; bufor *Brittona* i *Robinsona* o pH od 2,0 do 10,0 z przedziałami co 0,5 jednostki i stałej sile jonowej otrzymanej przez dodanie odpowiednich ilości chlorku sodu (7).

Nasiona bobu właściwego (*Vicia faba major*), dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*), fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*), gorczycy jasnej (*Sinapis alba*), grochu siewnego (*Pisum sativum*), gryki zwyczajnej (*Phagopyrum sagittatum*), jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*), kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), owsa siewnego (*Avena sativa*), prosa zwyczajnego (*Panicum miliaceum*), pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus napus*), soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) i żyta zwyczaj-

nego (*Secales cereale*) rozdrobniono w młynku mechanicznym i ekstrahowano za pomocą NaCl o stęż. $0,15 \text{ mol/dm}^3$ i pH 7,0 w stosunku 1:9 w/v w ciągu 2 godz., stosując ciągłe mieszanie. Ekstrakty poddano wirowaniu ($1500 \times g$, 2°C , 30 min.). Mierzono pH otrzymanego płynu nadosadowego, odpipetowywano próbki do pomiarów aktywności proteolitycznej w tym pH i płyn nadosadowy doprowadzano do pH od 2,0 do 10,0 z przedziałami co 0,5 jednostki pH.

W celu oznaczenia aktywności proteolitycznych do $0,4 \text{ cm}^3$ ekstraktu z nasion o pH jakie posiadał dany ekstrakt oraz o pH od 2,0 do 10,0 z przedziałami co 0,5 jednostki pH dodawano $0,1 \text{ cm}^3$ 6% hemoglobiny o tym samym pH i inkubowano 6 godz. w temp. 37°C . Reakcję przerywano przez dodanie $0,1 \text{ cm}^3$ 10% TCA. Próby wytracone w czasie zero stanowiły kontrolę. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym oznaczono ilość nmoli uwolnionej tyrozyny kwasorozpuszczalnej za pomocą odczynnika miedziowego i odczynnika *Folina* i *Ciocalteau* (8). Białko oznaczono metodą *Bradforda* (9).

Oznaczenia wykonano w czterech oddzielnych próbkach ekstraktu każdego z nasion badanych roślin. Średnie wartości uzyskanych wyników zamieszczono w tabelach.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wartość pH ekstraktów z nasion roślin spożywanych przez człowieka mieściła się w przedziale od 4,68 do 6,27 (tab. I). Najwyższą aktywność proteolityczną w natu-

Tab e l a I. Wartość pH, aktywność proteolityczna w tym pH i zawartość białka w ekstraktach z nasion

Table I. pH value, proteolytic activity at that pH value and protein content in seeds extracts

Nasiona	pH*	Aktywność proteolityczna Tyr nmol/cm ³ /6h	Białko mg/cm ³
Bób	5,89 ± 0,12	135,0 ± 13,4	1,96 ± 0,14
Dynia	6,27 ± 0,44	64,6 ± 7,2	1,86 ± 0,13
Fasola	5,83 ± 0,26	357,3 ± 29,8	1,89 ± 0,13
Gorczyca	4,97 ± 0,11	112,7 ± 10,6	0,77 ± 0,07
Groch	5,97 ± 0,22	182,5 ± 17,4	1,81 ± 0,15
Gryka	6,03 ± 0,43	138,6 ± 14,8	0,55 ± 0,04
Jęczmień	5,66 ± 0,28	384,2 ± 32,1	0,78 ± 0,08
Kukurydza	5,90 ± 0,60	85,9 ± 8,1	0,29 ± 0,02
Mak	4,68 ± 0,28	1680,3 ± 163,8	2,44 ± 0,26
Owies	5,53 ± 0,42	210,7 ± 19,8	0,94 ± 0,09
Proso	5,49 ± 0,40	98,8 ± 8,6	1,21 ± 0,12
Pszenica	5,97 ± 0,43	247,7 ± 28,4	1,13 ± 0,12
Słonecznik	5,96 ± 0,43	410,2 ± 53,6	2,00 ± 0,19
Soczewica	6,00 ± 0,44	72,1 ± 6,8	1,36 ± 0,14
Żyto	5,78 ± 0,38	456,6 ± 46,3	3,16 ± 0,32

* – pH użytego do ekstrakcji $0,15 \text{ mol/dl}$ NaCl wynosiło 7,0.

ralnym pH wykazuje ekstrakt z nasion maku, żyta, słonecznika i jęczmienia, a najniższą ekstrakt z nasion dyni i soczewicy. Zawartość białka w ekstraktach z nasion badanych roślin mieściła się w przedziale od 0,29 do 3,16 mg/cm³.

Ekstrakt z nasion wszystkich badanych roślin wykazuje aktywność proteolityczną w pH kwasowym (tab. II). Optimum pH większości z nich przypada na pH 3,5–5,5. Najwyższą aktywność proteolityczną wykazuje ekstrakt z nasion maku.

Tab e l a II. Aktywność proteolityczna ekstraktu z nasion oceniana w pH kwasowym

Tab l e II. Proteolytic activity of seeds extracts assessed in acidic pH

Nasiona	pH									
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
	aktywność proteolityczna, Tyr nmol/cm ³ /6 godz.									
Bób	25,3	28,8	125,0	295,8	298,2	255,6	250,4	137,6	130,2	200,0
Dynia	250,6	51,7	720,1	825,2	1025,1	1010,4	355,3	125,2	100,0	45,0
Fasola	52,2	55,0	150,8	480,4	632,6	545,5	430,8	412,4	377,7	207,7
Gorczyca	725,8	800,4	850,1	1050,0	1300,7	1270,2	1250,2	1200,6	800,2	525,6
Groch	75,7	120,5	237,7	425,3	510,2	325,8	250,1	200,8	195,3	120,0
Gryka	0,0	0,0	0,0	55,7	175,2	75,5	150,5	125,0	130,8	25,5
Jęczmień	30,5	52,6	325,6	875,6	950,5	805,4	675,6	520,1	312,7	175,4
Kukurydza	25,4	75,2	225,5	380,5	725,4	662,2	600,7	375,2	75,6	100,2
Mak	2,8	50,8	750,6	975,6	1850,2	1750,0	1600,6	1475,0	1000,7	750,8
Owies	0,0	0,0	52,8	255,7	475,8	375,0	312,1	200,7	75,2	32,7
Proso	0,0	0,0	100,0	400,8	455,2	330,6	255,9	100,5	55,8	25,6
Pszemica	30,2	32,4	40,9	825,0	875,6	730,6	430,8	275,6	255,2	110,5
Słonecznik	55,0	75,2	90,7	425,2	625,5	775,4	900,7	650,5	420,0	250,4
Soczewica	52,1	55,7	75,1	360,4	345,2	490,7	342,1	300,2	75,8	100,9
Żyto	25,3	145,3	637,6	920,3	1300,6	955,2	910,5	600,4	455,4	375,5

W obojętnym i zasadowym zakresie pH aktywność proteolityczna ekstraktów z nasion jest znacznie niższa niż w pH kwasowym (tab. III). Optimum pH większości z ekstraktów przypada na pH 7,5–8,5. Najwyższą aktywność proteolityczną wykazuje ekstrakt z nasion gorczycy.

Jak wynika z uzyskanych wyników nasiona wszystkich badanych roślin wykazują aktywność proteolityczną w szerokim zakresie pH. Największą rolę w degradacji białek endogennych odgrywają zapewne te proteiny, które działają w pH występującym w ekstrakcie z nasion, jest to pH od 4,9 do 6,27 w zależności od gatunku rośliny. Są to najprawdopodobniej proteiny cysteinylowe, na co wskazują dane literaturowe, podające takie właśnie optima pH dla tej grupy proteinaz. Proteiny nasion działające w silnie kwasowym pH należą najprawdopodobniej do proteinaz aspartylowych, a działające w pH obojętnym i zasadowym do proteinaz serylowych i do metaloproteinaz (10, 11). Wymienione proteiny cysteinylowe, aspartylowe, serylowe i metaloproteinazy są endopeptydazami. Różnią się nie tylko optimami pH,

Tabela III. Aktywność proteolityczna ekstraktu z nasion w pH obojętnym i zasadowym

Table III. Proteolytic activity of seed extracts assessed in neutral and alkaline pH

Nasiona	pH						
	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0
	aktywność proteolityczna, Tyr nmol/cm ³ /6 godz.						
Bób	157,2	32,4	107,6	102,0	75,2	52,8	17,6
Dynia	40,3	30,5	25,4	15,2	10,7	8,8	2,5
Fasola	130,4	175,0	75,0	100,2	107,6	50,7	30,2
Gorczyca	350,2	250,4	475,8	312,7	125,6	75,5	0,2
Groch	125,6	225,5	250,4	215,3	175,6	120,2	100,5
Gryka	50,0	25,4	50,3	30,5	0,0	0,0	0,0
Jęczmień	100,5	75,4	62,3	25,6	0,0	0,0	0,0
Kukurydza	30,4	32,5	33,4	75,3	70,7	50,6	30,3
Mak	550,3	425,8	405,7	250,6	205,0	203,0	50,2
Owies	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pszenica	55,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Slonecznik	150,6	50,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Soczewica	112,2	30,6	52,2	130,8	100,7	50,4	0,0
Żyto	157,3	52,5	175,0	75,2	52,8	20,5	0,0

ale także zapewne specyficznością względem reszt aminokwasowych tworzących rozszczepiane wiązanie peptydowe. W ten sposób białka zapasowe nasion ulegają degradacji do polipeptydów i peptydów. Ostatnie stanowią substraty, występujących także w nasionach egzopeptydaz – aminopeptydaz i karboksypeptydaz (2, 3).

Proteinyzy występujące w nasionach odgrywają istotną rolę w degradacji białek w czasie kiełkowania nasion i rozwoju rośliny (12, 13, 14, 15). Natomiast występujące w nasionach inhibitory proteaz mogą mieć znaczenie w trawieniu białek w przewodzie pokarmowym człowieka (5, 6, 16, 17, 18). Ich obecność w ekstraktach może maskować aktywność występujących w nich proteaz endogennych i egzogennych.

M. Siergiejuk, A. Worowska, A. Karwowska, M. Gacko

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF THE SEEDS OF PLANTS
CONSUMED BY HUMANS

Summary

The proteolytic activity was assessed in extracts obtained from the seeds of 15 plants consumed by humans, such as: broad bean, pumpkin, kidney bean, charlock, pea, buckwheat, barley, maize, poppy, oat, millet, wheat, sunflower, lentils and rye. Extracts of all plant species seeds used in experiment hydrolyse hemoglobin in acidic, neutral and alkaline pH. The impact of those proteinases on digestion of proteins in the intestinal tract has been discussed. Their presence should be taken into account when assessing the activity of proteinase inhibitors in seed extracts.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bode W., Huber R.*: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 1992; 204(2): 433-451. – 2. *Dalling M.J.* (ed.): *Plant proteolytic enzymes*. CRS Press, Boca Raton, FL, 1989. – 3. *Ryan C.A., Walker-Simmons M.*: Plant proteinases in: *the biochemistry of plants*, Ed. A. Marcus. Acad. Press, NY, 1981; vol. 6: 321-350. – 4. *Billings P.C., Longnecker M.P., Keary M., Taylor P.R.*: Protease inhibitor content of human dietary samales. *Nutr. Canc.*, 1990; 14(2): 85-93. – 5. *Bruzgo M., Gacko M., Guzowski A., Chlabicz M., Bańkowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność preparatów stosowanych w substytucyjnym leczeniu niewydolności wewnątrzwydzielniczej trzustki. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 345-347. – 6. *Jasielczuk J., Gacko M., Guzowski A., Karwowska A., Chojnacka-Zdrodowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność proteolityczną preparatu Citropepsin. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37(3) (supl.): 353-355. – 7. *Ciba J.*: *Poradnik chemika analityka*. Wyd. N-T, Warszawa 1989; 107. – 8. *Greczaniuk A., Roszkowska-Jakimiec W., Gacko M., Worowska A.*: Oznaczanie aktywności katepsyny D w osoczu krwi przy użyciu hemoglobiny denaturowanej kwasem solnym. *Diagn. Lab.*, 2000; 36: 97-101. – 9. *Bradford M.M.*: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254. – 10. *Simoes J., Faro C.*: Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271: 2067-2075.
11. *Viersta R.D.*: Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1993; 44: 385-410. – 12. *Callis J.*: Regulation of protein degradation in plants. *Genet. Eng.*, 1997; 19: 121-148. – 13. *Golaszewski T., Siwecka M.A., Szarkowski J.W.*: Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion. *Post. Bioch.*, 1972; 18: 125-137. – 14. *Hellmann H., Estelle M.*: Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, 2002; 297: 793-797. – 15. *Pawłowski T.*: Proteomika nasion. *Biotechnologia*, 2009; 1(84): 104-118. – 16. *Karwowska A., Gacko M., Guzowski A., Krukowska A., Chojnacka-Zdrodowska A.*: Inaktywacja roślinnych inhibitorów tripsyny i chymotripsyny przez pepsynę. *Bromat. Chgem. Toksykol.*, 2005; 37(3) (supl.): 349-351. – 17. *Leontowicz H., Kulasek G.*: Naturalne pokarmowe inhibitory enzymów trawiennych. *Med. Wet.*, 1998; 54: 159-165. – 18. *Stergiejuk M., Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność enteropeptydazy i aktywację tripsynogenu przez ten aktywator. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 40; 2008: 265-269.

Adres: 15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24 A.