

Marta Siergiejuk, Marek Gacko

TERMOSTABILNOŚĆ PEPTYDAZ I INHIBITORÓW PEPTYDAZ NASION ROŚLIN SPOŻYWANYCH PRZEZ CZŁOWIEKA

Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

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

Ekstrakt z nasion 15 gatunków roślin spożywanych przez człowieka wykazuje aktywność peptydazową w pH 2,0 i w pH 7,5. Ekstrakt z nasion dyni, owsa, pszenicy, słonecznika, soczewicy i soi hamuje aktywność pepsyny. Aktywność trypsyny hamuje ekstrakt z nasion wszystkich badanych gatunków roślin. W temperaturze 100°C następuje inaktywacja występujących w nasionach peptydaz. Natomiast występujące w nasionach inhibitory pepsyny i trypsyny wykazują znaczną termostabilność.

Hasła kluczowe: nasiona, peptydazy, inhibitory peptydaz, inaktywacja termiczna

Key words: seeds, peptidases, peptidase inhibitors, thermal inactivation

W nasionach roślin spożywanych przez człowieka występują peptydazy działające w pH od 1,5 do 10,0 (1, 2) oraz inhibitory wielu peptydaz przewodu pokarmowego (3, 4, 5, 6). Nasiona większości gatunków roślin poddawane są przed spożyciem działaniu temperatury 100°C.

Celem pracy jest ocena termostabilności peptydaz działających w pH 2,0 i w pH 7,5 oraz inhibitorów pepsyny i trypsyny występujących w nasionach 15 gatunków roślin spożywanych przez człowieka.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto nasiona: bobu, dyni, fasoli, grochu, gryki, jęczmienia, kukurydzy, maku, owsa, prosa, pszenicy, słonecznika, soczewicy, soi i żyta. Ekstrakty (10%) z tych nasion sporządzono w sposób opisany poprzednio (2). Ekstrakty nie poddane ogrzewaniu i poddane ogrzewaniu (100°C, 1h) doprowadzono do pH 2,0 i do pH 7,5.

W celu oznaczenia aktywności peptydazowej do 0,2 ml ekstraktu z nasion o pH 2,0 i pH 7,5 dodawano 0,6 ml 6% globiny o odpowiednim pH, inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 2 godzin, reakcję przerywano przez dodanie 1 cm³ 10% kwasu trichlorooctowego i w klarownym płynie nadosadowym oznaczano ilość uwolnionej tyrozyny (3). W celu oznaczenia działania inhibicyjnego do 0,2 ml ekstraktu z nasion o pH 2,0 lub pH 7,5 dodawano odpowiednio 0,2 ml pepsyny (0,005%) lub trypsyny (0,003%) i po dodaniu 0,6 ml 6% globiny inkubowano w

temperaturze 37°C w ciągu 2 godzin. Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 10% TCA i w klarownym płynie nadosadowym oznaczano ilość uwolnionej tyrozyny (3). Oznaczenia wykonano w czterech oddzielnych próbkach ekstraktu z nasion każdej rośliny. Wartości średnie i odchylenia standardowe uzyskanych wyników zamieszczono w tabelach.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jak wynika z Tabeli I ekstrakt z nasion dyni, grochu, słonecznika i soczewicy wykazuje aktywność peptydazową w pH 2,0.

Tabela 1. Wpływ ogrzewania w temperaturze 100°C na aktywność proteolityczną ekstraktów z nasion ocenianą w pH 2,0 oraz na ich działanie antypepsynowe

Table 1. Influence of heating at 100°C on proteolytic activity of extracts from seeds determined in pH 2.0 and on their anti-pepsin activity

Ekstrakt	Aktywność peptydazowa i antypepsynowa, pH 2,0*			
	Natywny	Ogrzewany	Natywny + pepsyna	Ogrzewany + pepsyna
	Tyr nmol/ml/h			
Bób	4,1 ± 0,4	0,0	182,0 ± 17,8	178,0 ± 16,4
Dynia	43,3 ± 3,5	8,2 ± 0,6	110,8 ± 9,4	124,6 ± 10,8
Fasola	8,2 ± 0,7	0,0	168,4 ± 16,2	176,0 ± 15,2
Groch	12,5 ± 1,4	0,0	162,0 ± 16,0	172,8 ± 10,8
Gryka	0,0	0,0	170,8 ± 17,2	172,6 ± 12,6
Jęczmień	5,2 ± 0,5	0,0	172,6 ± 16,4	174,0 ± 17,0
Kukurydza	4,4 ± 0,4	0,0	170,8 ± 15,8	168,0 ± 16,0
Mak	0,4 ± 0,1	0,0	172,0 ± 16,4	176,0 ± 18,4
Owies	0,0	0,0	156,0 ± 14,5	162,8 ± 17,2
Proso	0,0	0,0	172,8 ± 17,0	178,4 ± 16,3
Pszenica	5,6 ± 0,6	1,2 ± 0,01	158,2 ± 9,8	162,0 ± 17,2
Słonecznik	12,8 ± 1,5	5,4 ± 0,5	36,7 ± 3,7	32,4 ± 3,1
Soczewica	12,6 ± 1,3	3,2 ± 0,2	128,4 ± 11,0	142,6 ± 14,0
Soja	6,2 ± 0,6	0,0	110,2 ± 8,9	126,8 ± 10,2
Żyto	7,3 ± 0,8	1,2 ± 0,01	169,6 ± 17,6	172,0 ± 16,3

* - aktywność pepsyny – 176,2 Tyr nmol/ml/h

Ogrzewanie w temperaturze 100°C w ciągu 1 godziny obniża bardzo znacznie aktywność proteolityczną oznaczaną w pH 2,0 ekstraktów z nasion wszystkich tych roślin. W teście zawierającym ekstrakt nieogrzewany i pepsynę nie obserwuje się sumowania aktywności peptydaz zawartych w nasionach i dodanej pepsyny. Wskazuje to na występowanie inhibitorów pepsyny w ekstrakcie z nasion. Ekstrakt ogrzewany w temperaturze 100°C, pozbawiony aktywności peptydazowej, z nasion

dyni, słonecznika i soczewicy znacznie hamuje aktywność pepsyny, co potwierdza poprzednie spostrzeżenie (1, 7, 8, 9).

Jak wynika z Tabeli II ekstrakt z nasion fasoli, grochu, jęczmienia i maku wykazuje aktywność peptydazową w pH 7,5. Ogrzewanie w temperaturze 100°C inaktywuje te peptydazy (10). W teście zawierającym ekstrakt nieogrzewany i trypsynę nie obserwuje się sumowania aktywności peptydaz endogennych nasion i dodanej trypsyny. Natomiast ogrzewane ekstrakty z nasion bobu, jęczmienia, słonecznika, soczewicy i soi obniżają aktywność trypsyny.

Tab e l a II. Wpływ ogrzewania w temperaturze 100°C na aktywność proteolityczną ekstraktów z nasion ocenianą w pH 7,5 oraz na ich działanie antytrypsynowe

Tab l e II. Influence of heating at 100°C on proteolytic activity of extracts from seeds determined in pH 7.5 and on their anti-trypsin activity

Ekstrakt	Aktywność peptydazowa i antytrypsynowa, pH 7,5*			
	Natywny	Ogrzewany	Natywny + trypsyna	Ogrzewany + trypsyna
	Tyr nmol/ml/h			
Bób	5,3 ± 0,4	4,8 ± 0,4	92,6 ± 7,6	112,0 ± 8,6
Dynia	4,8 ± 0,3	0,0	124,8 ± 12,0	162,3 ± 15,2
Fasola	18,0 ± 1,5	2,2 ± 0,3	172,0 ± 16,4	170,8 ± 15,8
Groch	36,6 ± 3,7	1,8 ± 0,2	82,0 ± 7,8	154,0 ± 12,6
Gryka	3,8 ± 0,4	0,0	154,0 ± 12,6	138,0 ± 10,6
Jęczmień	12,8 ± 1,0	1,2 ± 0,01	98,4 ± 9,4	126,0 ± 10,8
Kukurydza	5,6 ± 0,4	0,0	172,8 ± 16,3	174,0 ± 16,6
Mak	71,6 ± 7,2	12,8 ± 1,0	142,2 ± 12,8	146,0 ± 13,8
Owies	0,0	0,0	86,4 ± 7,6	110,2 ± 10,0
Proso	0,0	0,0	173,8 ± 16,0	182,0 ± 17,2
Pszenica	10,2 ± 1,0	0,0	154,6 ± 16,2	162,0 ± 16,0
Słonecznik	8,3 ± 0,6	3,6 ± 0,4	50,8 ± 5,1	68,4 ± 5,2
Soczewica	5,4 ± 0,4	2,8 ± 0,3	46,2 ± 4,0	48,9 ± 3,4
Soja	8,0 ± 0,7	3,4 ± 0,3	82,6 ± 7,6	91,8 ± 7,8
Żyto	8,8 ± 0,7	4,3 ± 0,4	170,0 ± 16,7	178,0 ± 17,0

* - aktywność trypsyny – 174,0 Tyr nmol/ml/h

W opisanych eksperymentach posłużono się niefrakcjonowanym ekstraktem z nasion, zawierającym peptydazy i ich inhibitory (11, 12, 13). Nie jest możliwa ocena stopnia hamowania aktywności peptydaz endogennych przez endogenne inhibitory jak i inaktywacji egzogennych peptydaz (pepsyna, trypsyna) zarówno przez peptydazy jak i ich inhibitory endogenne. Odpowiedź na to pytanie pozwoli uzyskać preparatywne oddzielenie endogennych peptydaz od endogennych inhibitorów. W rozważaniach nad hamowaniem aktywności peptydazowej przez ekstrakty z nasion

należy brać także pod uwagę występujące w nasionach niespecyficzne inaktywatory takie jak m.in. związki polifenolowe (14).

WNIOSKI

1. Ogrzanie ekstraktów z nasion w temperaturze 100°C:
 - unieczynnia peptydazy działające w pH 2,0 i w pH 7,5,
 - obniża znacznie aktywność inhibitorów pepsyny i trypsyny.

M. Siergiejuk, M. Gacko

THERMOSTABILITY OF PEPTIDASES AND PEPTIDASE INHIBITORS OF SEEDS OF PLANTS CONSUMED BY HUMAN

Summary

Extracts from seeds of plants consumed by human show peptidase activity in pH 2.0 and in pH 7.5. The extracts from seeds of pumpkin, oat, wheat, sunflower, lentil, and soy inhibit pepsin activity while the activity of trypsin is inhibited by the seeds of all examined plants. Inactivation of peptidases present in the seeds occurs in the temperature of 100°C. However, pepsin and trypsin inhibitors, present in the seeds, show significant thermostability.

PIŚMIENNICTWO

1. *Siergiejuk M., Chlabicz M., Worowska A., Łapiński R.*: Aktywność peptydazowa, antypepsynowa i antytrypsynowa nasion roślin spożywanych w stanie surowym przez człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: 796-800. – 2. *Siergiejuk M., Worowska A., Karwowska A., Gacko M.*: Aktywność proteolityczna roślin spożywanych przez człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 43(1): 15-19. – 3. *Bańkowska A., Roszkowska-Jakimiec W., Worowski K.*: Inhibitors of pepsin, trypsin and chymotrypsin in seeds of plants consumed by humans and animals. *Rocz. AM Białystok*, 1998; 43: 278-286. – 4. *Siergiejuk M., Bańkowska-Luksza A., Worowska A., Gacko M.*: Wpływ inhibitorów peptydaz nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywację prokarboksypeptydaz i aktywność karboksypeptydaz trzustkowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: 169-175. – 5. *Siergiejuk M., Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność enteropeptydazy i aktywację trypsynogenu przez ten aktywator. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 265-269. – 6. *Chlabicz M., Gacko M., Guzowski A., Krupkowska A., Bańkowska A.*: Termostabilność roślinnych inhibitorów przewod pokarmowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 337-339. – 7. *Billings P.C., Longnecker M.P., Keary M., Taylor P.R.*: Protease inhibitor content of human dietary samples. *Nutr. Cancer.*, 1990; 14(2): 85-93. – 8. *Bruzgo M., Gacko M., Guzowski A., Chlabicz M., Bańkowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność proteaz preparatów stosowanych w substytucyjnym leczeniu niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 345-347. – 9. *Jasielczuk J., Gacko M., Guzowski A., Karwowska A., Chojnacka-Zdrodowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywczych przez człowieka na aktywność proteolityczną preparatu Citropepsin. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 353-355. – 10. *Łapiński R., Siergiejuk M., Chlabicz M., Worowska A.*: Inaktywacja peptydaz przewod pokarmowego człowieka przez ekstrakt z nasion. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: 792-795.
11. *Chlabicz M., Siergiejuk M., Worowska A., Łapiński R.*: Wpływ ekstraktu z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność katepsyny A, B, C i D. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: 801-804. – 12.

Ryan C.A.: Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1973; 24: 173-196. – 13. *Rackis J.J., Wolf W.J., Baker E.C.*: Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986; 199: 299-347. – 14. *Karwowska A., Grzegorzczak E., Worowska A., Filon J., Karczewski J.*: Hamowanie aktywności katepsyny D i katepsyny E przez ekstrakt z nasion. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012; 45: - w druku.

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