BROMAT. CHEM. TOKSYKOL. – XLII, 2009, 3, str. 975–978

Wiesława Roszkowska-Jakimiec, Elżbieta Milewska, Katarzyna Bielawska, Agnieszka Markowska[1)]

WPŁYW EKSTRAKTÓW Z NASION, ŁUPIN I BIELMA SOI ORAZ SOCZEWICY NA AKTYWNOŚĆ TRYPSYNY

Zakład Analizy Instrumentalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. *W. Roszkowska-Jakimiec*

[1)] Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. *K. Midura-Nowaczek*

Oznaczano wpływ ekstraktu z nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy na aktywność trypsyny. Stwierdzono, że aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na cm^3 ekstraktu soi i soczewicy jest porównywalna zarówno w nasionach, bielmie, jak i łupinach zaś aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na mg białka wykazuje znaczny wzrost aktywności w łupinach w porównaniu do ekstraktu z nasion i bielma.

Hasła kluczowe: inhibitory roślinne trypsyny, soja, soczewica.
Key words: trypsin plants inhibitor, soya been, lentils.

W stanach patologicznych w miąższu trzustki może dochodzić do aktywacji trypsynogenu, pojawienia się aktywnej trypsyny oraz aktywacji przez trypsynę chymotrypsynogenu, proelastazy i prokarboksypeptydaz (7, 8, 11). Aktywacja trypsynogenu w trzustce może być spowodowana działaniem zarzuconej z dwunastnicy do przewodów trzustkowych enteropeptydazy lub trypsyny, kontaktowania się katepsyny B z trypsynogenem i pojawieniem się w trzustce aktywujących trypsynogen proteaz syntetyzowanych przez drobnoustroje.

Soja i soczewica są roślinami należącymi do roślin strączkowych. Produkty spożywcze z nich otrzymywane są szczególnie chętnie włączane do diety przez wegetarian. Soja oprócz dużej ilości białka jest źródłem węglowodanów i tłuszczów, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych. Regularne jedzenie soi obniża poziom cholesterolu. Dieta bogata w soję, zawierającą dużą ilość substancji przeciwutleniających i fitoestrogenów, zmniejsza ryzyko zachorowania na miażdżycę, choroby serca i nowotwory (6).

Celem pracy było określenie wpływu ekstraktu z nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy na aktywność trypsyny. Aktywność enzymu oznaczana była przy użyciu substratu wielkocząsteczkowego i drobnocząsteczkowego.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki: trypsyna, Bz-L-Arg-pNA, kwas octowy, kwas trichlorooctowy, Sigma-Aldrich, USA; hemoglobina, Difko Laboratories, USA; odczynnik *Folina i Ciocalteau*, Merck, Niemcy.

Łupiny nasion soi i soczewicy oddzielano od bielma za pomocą łuszczarki i rozdzielano przy użyciu wstrząsarki uniwersalnej z sitami o średnicy oczek 0,63 mm. Rozdrobnione w młynku mechanicznym nasiona, łupiny i bielmo ekstrahowano wodą destylowaną w temp. laboratoryjnej, w ciągu 2 h, stosując ciągłe mieszanie. Sporządzono 10% ekstrakty. Uzyskany przez wirowanie (2700 × g, 30 min., 4°C) płyn nadosadowy posłużył do badań. Białko oznaczono metodą *Bradforda* (2).

Wpływ ekstraktu na aktywność trypsyny oznaczano przy użyciu substratu wielkocząsteczkowego: do 0,125 cm^3 trypsyny (0,01%) dodawano 0,125 cm^3 ekstraktu z łupin, bielma oraz nasion soi oraz soczewicy (w kontroli 0,1125 cm^3 0,15 mol/cm^3 NaCl) i preinkubowano 30 min. w temp. 37°C. Następnie dodawano 0,250 cm^3 6% hemoglobiny denaturowanej kwasem solnym (4, 10) i dalej inkubowano 2 h w tej samej temperaturze. Reakcję przerywano przez dodanie 0,500 cm^3 10% kwasu trichlorooctowego. Wpływ ekstraktów na aktywność trypsyny oznaczano w pH 7,5. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym oznaczono ilość uwolnionej tyrozyny przy użyciu odczynnika *Folina i Ciocalteau* (3).

Wpływ ekstraktu na aktywność trypsyny oznaczano przy użyciu substratu drobnocząsteczkowego: do 0,125 cm^3 trypsyny (0,01%) dodawano 0,125 cm^3 ekstraktu z łupin, bielma i nasion soi oraz soczewicy (w kontroli 0,1125 cm^3 0,15 mol/cm^3 NaCl) i preinkubowano 5 min. w temp. 37°C. Następnie dodawano 0,250 cm^3 10 mmol/dcm^3 Bz-L-Arg-pNA i dalej inkubowano 0,5 h w tej samej temperaturze. Reakcję przerywano przez dodanie 0,1 cm^3 50% kwasu octowego. Wpływ ekstraktów na aktywność trypsyny oznaczano w pH 7,5. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym ilość uwolnionej p-nitroaniliny oznaczano przez pomiar absorbancji przy 410 nm. Zawartość p-nitroaniliny odczytywano z wykresu kalibracyjnego sporządzonego przy użyciu wzorcowych roztworów tego związku.

Aktywność inhibitora trypsyny zawartego w ekstraktach wyrażano w odpowiednich jednostkach. Za 1 jednostkę przyjęto taką ilość inhibitora zawartą w 1 cm^3, która hamuje uwalnianie 1 nmol tyrozyny lub p-nitroaniliny w warunkach testu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I przedstawiono zawartość białka w ekstraktach z nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy. Najwięcej białka występuje w ekstrakcie z nasion i bielma soi (12,42 i 11,55 mg/cm^3), mniej w ekstrakcie z nasion i bielma soczewicy (5,74 i 5,69 mg/cm^3). Natomiast zawartość białka w ekstraktach z łupin soi i soczewicy jest bardzo mała i odpowiednio wynosi 0,77 i 0,42 mg/cm^3.

Aktywność inhibitora trypsyny zawartego w ekstraktach nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy oznaczana przy użyciu hemoglobiny przedstawiono na rycinie 1. Aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na cm^3 ekstraktu soi i soczewicy jest podobna, zarówno w nasionach, bielmie jak i łupinach (ryc. 1A). Natomiast aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na mg białka wykazuje znaczny wzrost ak-

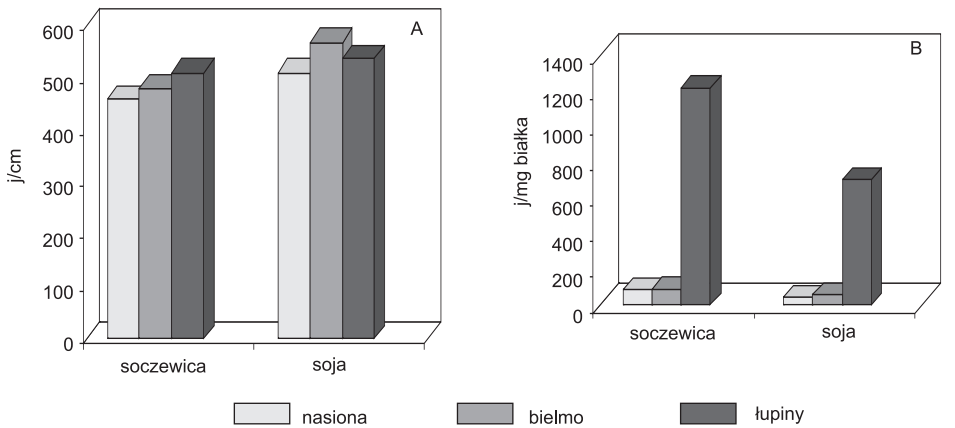
Tabela I. Zawartość białka w ekstraktach z nasion
Table I. Protein content in seeds extracts

Roślina	Ekstrakt z	Białko, mg/cm^3
Soczewica	nasion	5,74
	bielma	5,69
	łupin	0,42
Soja	nasion	12,42
	bielma	11,55
	łupin	0,77

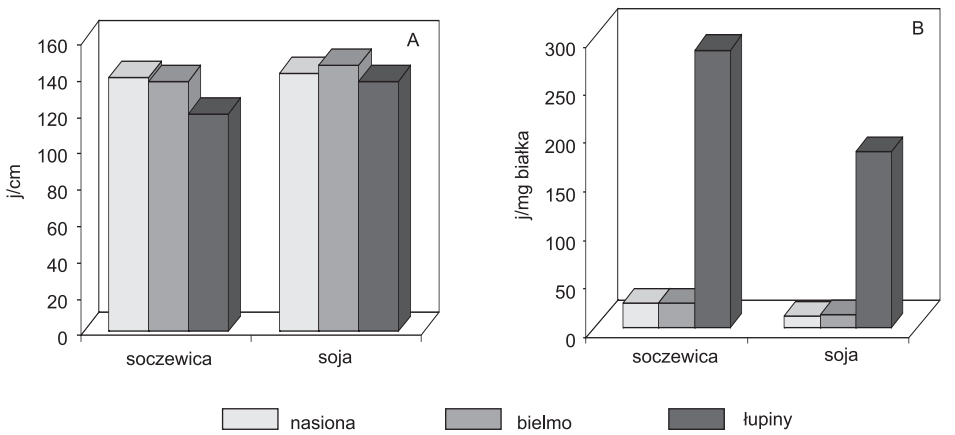
tywności w łupinach w porównaniu do ekstraktu z nasion i bielma (ryc. 1B).

Podobne wyniki uzyskano w ocenie aktywności inhibitora trypsyny w ekstraktach z nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy oznaczanej przy użyciu substratu chromogennego (ryc. 2A i 2B).

Obecność inhibitorów enzymów proteolitycznych wykazano w całych nasionach różnych gatunków roślin (1, 5, 9), bez określania ich zawartości w bielmie i łupinach. Ich zawartość zależy od wa-



Ryc. 1. Wpływ ekstraktu z nasion na aktywność trypsyny oznaczana przy użyciu hemoglobiny.
Fig. 1. Influence of seed extracts on trypsin activity with the use of hemoglobin.



Ryc. 2. Wpływ ekstraktu z nasion na aktywność trypsyny oznaczana przy użyciu Bz-L-Arg-pNA.
Fig. 2. Influence of seed extracts on the trypsin activity with the use of Bz-L-Arg- pNA.

runków glebowych, sposobu nawożenia i czasu przechowywania. Największa aktywność inhibitorów enzymów proteolitycznych występuje w okresie dojrzewania nasion i wiele miesięcy podczas spoczynku. W czasie kiełkowania nasion zawartość inhibitorów szybko maleje.

Stosowanie w diecie nasion soi i soczewicy w stanie surowym, może hamować aktywność trypsyny. Dieta bogata w nasiona soi i soczewicy może mieć duży wpływ u osób z przewlekłą niewydolnością wewnątrzwydzielniczą trzustki, w szczególności u osób, które stosują doustne preparaty farmaceutyczne zawierające enzymy proteolityczne. Spożywanie pokarmów zawierających inhibitory proteaz, może znacznie osłabiać rezultaty leczenia.

WNIOSKI

W pracy określono wpływ ekstraktu z nasion, bielma i łupin soi oraz soczewicy na aktywność trypsyny. Aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na cm^3 ekstraktu soi i soczewicy jest porównywalna zarówno w nasionach, bielmie, jak i łupinach. Aktywność inhibitora trypsyny w przeliczeniu na mg białka wykazuje znaczny wzrost aktywności w łupinach w porównaniu do ekstraktu z nasion i bielma.

W. Roszkowska-Jakimiec, E. Milewska, K. Bielawska, A. Markowska

THE INFLUENCE OF SEED, WEB-EYE AND PEEL EXTRACTS FROM THE SOYA BEAN AND LENTILS ON THE TRYPSIN ACTIVITY

Summary

The influence of seed, web-eye and peel extracts from the soya been and lentils on the trypsin activity was determined. The trypsin inhibitor activity counted per cm^3 soya bean and lentils extracts is comparable in the seed, web-eye and peel. The trypsin inhibitor activity counted per mg of protein is higher in peel extracts than in seed and web-eye extracts.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bode W., Hubert R.*: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem., 1992; 204: 433-451. – 2. *Bradford M. M.*: A rapie and sensitive metod for the quqntitation of mikrogram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976; 72: 248-254. – 3. *Folin O., Ciocalteau V.*: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem., 1927; 73: 627-650. – 4. *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. – 5. *Laskowski M. Jr.:* Protein inhibitors of serine proteinases – mechanism and classification, in Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors, ed. M. Friedman. Plenum Press, New York, 1986; 1-17. – 6. *Messina M, Barnes S.:* The role of soy products in reducing risk of cancer. J Natl Cancer Inst 1991; 83:541-6. – 7. *Meyer J., Rau B., Schoenberg M.H., Berger H.G.*: Mechanism and role of trypsinogen activation in acute pancreatitis. Hepato-Gastroenterology, 1999; 46: 2757-2763. – 8. *O'Reilly D.A., Kingsnorth A.N.:* Hereditary pancreatitis and mutations of the cationic trypsinogen gene. Brit. J. Surg., 87, 2000, 708-717. – 9. *Otlewski J., Krowarsch D., Apostoluk W.:* Protein inhibitor sof serie proteinases. Acta Biochim. Polon., 1999; 46: 531-565. – 10. *Shamberger R.J.*: Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammany tumours. Biochem. J., 1969; 111: 375-383.

11. *Szilagyi L., Kenesi E., Katona G., Kaslik G., Juhasz G., Graf L.:* Comparative in vitro studies on native and recombinant human cationic trypsin – cathepsin B is a possible pathological activator of trypsinogen in pancreatitis. J. Biol. Chem., 276, 2001, 24574-24593.

Adres: 15-222 Białystok, ul. A. Mickiewicza 2A.