Artykuł przeglądowy *Review*

Inhibitory trypsyny z rodziny Bowmana-Birka – budowa oraz znaczenie w żywieniu ludzi i zwierząt

ANNA WINIARSKA-MIECZAN

Instytut Żywienia Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Akademicka 13, 20-635 Lublin

Winiarska-Mieczan A.

Bowman-Birk trypsin inhibitors: their structure and value in human and animal feeding

Summary

Bowman-Birk inhibitors (BBI) are small serine proteinase inhibitors found in the leguminous and gramineous plants. Characteristically, their molecular masses are in the range of 6–9 kDa and are rich in disulfide bonds. The name of this family comes from the names of workers who first isolated (Bowman, 1940) and characterized (Birk, 1961) this inhibitor from soybean. Soybean BBI is the best known inhibitor of this family and it is often called 'classical BBI'. The Bowman-Birk inhibitor is recognized as a potential cancer chemopreventive agent for humans. Human populations consuming large amounts of BBI in their diet have been demonstrated to exhibit lower rates of colon, breast, prostate and skin cancers.

Keywords: Bowman-Birk trypsin inhibitors, BBI, feeding

W roślinach występuje wiele różnych typów inhibitorów proteaz. Należą one do grupy czynników antyodżywczych. Na organizm spożywającego je zwierzęcia lub człowieka mogą działać negatywnie (chelatowanie trypsyny) lub pozytywnie. Coraz większy nacisk kładzie się na pozytywne działanie tych substancji, co ma związek z ich właściwościami przeciwutleniającymi.

Przeprowadzono szereg badań *in vitro* oraz *in vivo*, w których stosowano pokarm oraz wyciągi zawierające inhibitory trypsyny, lecz należy do ich wyników podchodzić ostrożnie. Żywność taka oprócz oznaczonych inhibitorów może zawierać także szereg innych, biologicznie aktywnych związków, jak pektyny czy saponiny, które również mogą wywierać niekorzystny wpływ na organizm zwierząt i ludzi. Potrzebne są dalsze badania nad izolacją i oznaczaniem poszczególnych inhibitorów enzymów, które pozwolą na lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów ich oddziaływania na organizm konsumenta. Istotne znaczenie ma również określenie wpływu różnych technologii przetwarzania produktów roślinnych, szczególnie wysokobiałkowych, na zwiększenie efektywności i bezpieczeństwa ich stosowania w żywieniu ludzi i zwierząt.

Inhibitory proteaz dzieli się na rodziny. Przynależność do danej rodziny uwarunkowana jest podobną sekwencją aminokwasów w cząsteczce oraz podobnymi centrami aktywnymi. Najważniejsze inhibitory należą do rodzin: Bowmana-Birka, Kunitza, Kazala, roślin dyniowatych i ziemniaczanych. Rodzina Bowmana-Birka reprezentuje grupę inhibitorów proteaz typową dla nasion roślin strączkowych oraz ziarniaków zbóż. Nazwa rodziny pochodzi od nazwisk Bowmana, który jako pierwszy wyizolował inhibitor z nasion soi w 1940 r. oraz Birka, który scharakteryzował ten związek w 1961 r. W tab. 1 przedstawiono najważniejsze inhibitory z rodziny Bowmana-Birka wraz z ich charakterystyką.

Budowa inhibitorów trypsyny z rodziny Bowmana-Birka

Inhibitory trypsyny są to niskocząsteczkowe peptydy o masie 4000-20 000 Da, łatwo rozpuszczalne w wodzie. Zwykle stanowią pojedynczy peptyd, który może występować w różnych izomerycznych formach. Inhibitory te nie są ściśle swoiste dla określonych enzymów i oprócz trypsyny mogą hamować inne proteazy, których centra aktywne zawierają serynę. Inhibitory proteaz z rodziny Bowmana-Birka (BBI – Bowman-Birk Inhibitor) charakteryzują się niską masą molekularną, wynoszącą najczęściej 6000–16 000 Da (19, 27). Są to polipeptydy zawierające średnio 60-90 aminokwasów, dzięki obecności znacznej liczby wiązań disulfidowych utrzymują zwartą strukturę (29). Zauważono, że inhibitory występujące w nasionach roślin jednoliściennych i dwuliściennych różnią się od siebie liczbą i umiejscowieniem wiązań dwusiarczkowych, liczbą centrów aktywnych oraz masą cząsteczkową (29). Pierwsza grupa inhibitorów charakteryzuje się niższą masą cząsteczkową (ok. 16 000 Da), posiada jedno centrum aktywne oraz 5 mostków disulfidowych. Inhibitory należące do drugiej grupy wyka-

Tab. 1. Wykaz serynowych inhibitorów proteaz z rodziny Bowmana-Birka

	Liczba aminokwasów	Liczba mostków disulfidowych	Masa molekularna, Da	Występowanie
SBBI	71 (35)	7 (29)	b.d.	*Glycine max*
PI-I - IV	~68 (5)	b.d.	b.d.	
C-II	76 (24)	b.d.	b.d.	
E-I	b.d.	7 (37)	7 664 (37)	
D-II	b.d.	b.d.	b.d.	
IBB	b.d.	b.d.	b.d.	*Vigna radiata*
RBTI-I - IV	~133 (32)	9 (32)	14 500 (32)	*Oryza sativa*
BBBI	125 (29)	5 (29)	1 600 (29)	*Hordeum vulgare*
SFTI-1	14 (22)	1 (22)	b.d.	*Helianthus annuus*
BRTI	124 (27)	10 (27)	b.d.	*Hordeum vulgare*
A-I - II	~70 (3)	b.d.	b.d.	*Arachis hypogaea*
B-I - III	~60 (3)	b.d.	b.d.	
WSTI-I - VIIa	~70 (26)	b.d.	~8 000 (9)	*Glycine soja*
LCI-1.7 - 4.6	~68 (35)	6-7 (35)	~8 000 (35)	*Lens culinaris*
LBI-I - IV	83 (35)	b.d.	~9 000 (35)	*Phaseolus lunatus*
HGI	76 (19)	7 (37)	8312 (37)	*Dolichos biflorus*
HGGI-I - III	60-66 (19)	7 (37)	6464-7109 (19)	
MSTI	62 (19)	7 (5)	6 932 (5)	*Medicago scutellata*
EBI	61 (17)	b.d.	6 689 (17)	*Erythrina variegata*
ATI	58 (4)	7 (4)	6 387 (4)	*Medicago sativa*
FBI	63 (35)	7 (1)	6 989 (1)	*Vicia faba*
PsTI-I - V	~72 (19)	7 (10)	6807-7944 (10)	*Pisum sativum*
I-2b	123 (27)	10 (27)	14 000 (31)	*Triticum aestivum*
OTI-1 - 3	67-70 (8)	b.d.	7370-7642 (8)	*Allium cepa*

Objaśnienia: b.d. – brak danych

zują aktywność w stosunku do dwóch enzymów proteolitycznych, ich masa cząsteczkowa wynosi około 8000 Da i posiadają aż 7 mostków disulfidowych.

Inhibitory z rodziny Bowmana-Birka należą do grupy inhibitorów serynowych. Hamują one aktywność trypsyny, chymotrypsyny, elastazy, katepsyny i innych proteaz. Inhibitory te charakteryzują się wysokim stopniem homologacji oraz dużą zawartością cysteiny (19). Eliminowanie inhibitorów proteaz z produktów spożywczych przyczynia się do deficytu w nich aminokwasów siarkowych.

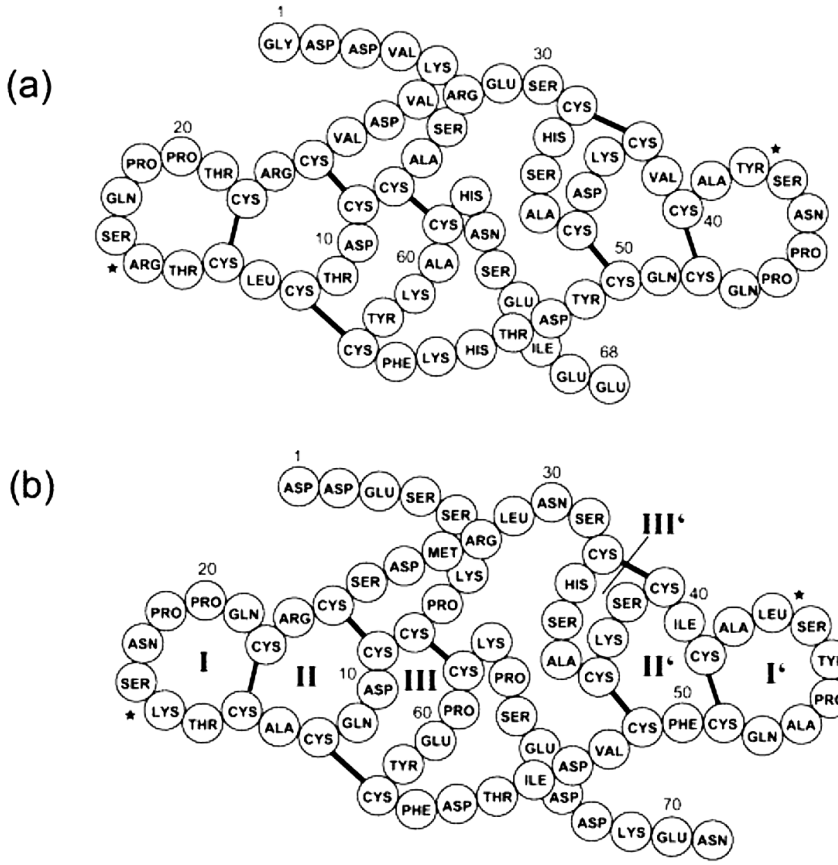
Inhibitory wyizolowane z różnych roślin różnią się znacznie masą cząsteczkową, składem aminokwasowym oraz lokalizacją miejsc aktywnych.

Inhibitor proteaz SBBI (Soybean Bowman-Birk Inhibitor) był pierwszym tego typu związkiem wyizolowanym z nasion soi. Homologi SBBI wyizolowano z nasion wielu roślin strączkowych oraz ziarniaków zbóż. SBBI zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o strukturze pierwszorzędowej, zawiera 71 aminokwasów (ryc. 1b). Łańcuch polipeptydowy jest w niewielkim stopniu uformowany w helix α, tworzy jednak pętle dzięki istnieniu 7 mostków disulfidowych (29). Dzięki takiej budowie mała cząsteczka SBBI posiada sztywną strukturę trzeciorzędową, co jest, między innymi, powodem wyższej odporności tego inhibitora na działanie czynników denaturujących oraz proteolizę. Wysokimi homologami dla SBBI są inne inhibitory serynowe wyizolowane z nasion soi, np. PI, który jest identyczny w 70%, C-II, D-II i E-I (12). EBI (Erythrina Bowman-Birk Inhibitor) – inhibitor znajdujący się w nasionach akacji koralowej *Erythrina variegata* jest homologiem SBBI w 67% (17).

Sojowy SBBI posiada dwa niezależne centra aktywne: Lys16-Ser17 (przeciwtrypsynowe) i Leu43-Ser44 (przeciwchymotrypsynowe) (35). Inne inhibitory sojowe należące do tej rodziny: BBI-A, -C i -D posiadają także dwa centra aktywne, hamujące aktywność odpowiednio: trypsyny i chymotrypsyny, elastyny i trypsyny lub trypsyny i trypsyny (9). Inhibitory D-II i E-I wiążą wyłącznie trypsynę, łącząc się z nią w proporcjach 1 : 1,4 (25).

Inhibitor C-II zbudowany jest z 76 aminokwasów (tab. 1), jest on wysokim homologiem dla PSI (Phaseolus Inhibitor) wyizolowanego z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) (24) oraz WSTI-IV (Wild Soybean Trypsin Inhibitor) i WSTI-V, inhibitorów wyizolowanych z nasion soi (*Glycine soja*) (9). Inhibitory D-II oraz E-I są z kolei wysokimi homologami dla WSTI-I i WSTI-II, a także WSTI-III (9). Inhibitor C-II unieczynnia trypsynę i chymotrypsynę za pomocą tego samego miejsca aktywnego P1, a elastazę w P2 (24).

Inhibitor LCI (Lens Culinaris Inhibitor) został wyizolowany w Syrii z miejscowych odmian soczewicy (*Lens culinaris*). Zidentyfikowano 4 odmiany inhibitora LCI: LCI-1.7, -2.2, -3.3 i 4.6. Masa molowa tych inhibitorów wynosi, odpowiednio: 9200, 8500, 7200 i 6750 Da, punkty izoelektryczne, odpowiednio: 5,26, 5,88, 8,80 i 7,80 (36). Wszystkie cztery inhibitory zawierają argininę w miejscu antytrypsynowym, w punkcie antychymotrypsynowym natomiast tyrozynę (LCI--1.7 oraz LCI-2.2), fenyloalaninę (LCI-3.3) lub leucynę (LCI-4.6) (35). Forma LCI-1.7 jest inhibitorem posiadającym dwa centra aktywne: Arg16-Ser17 (antytrypsynowe) i Tyr42-Ser43 (antychymotrypsynowe). Inhibitor ten zbudowany jest z 68 aminokwasów i posiada 7 mostków disulfidowych występujących w pozycjach: Cys-Cys: 8-61, 9-24, 12-57, 14-22, 31-38, 35-50, 40-48 (ryc. 1a).



Ryc. 1. Struktura inhibitorów z rodziny Bowmana-Birka: (a) – inhibitor z soczewicy LCI-1.7; (b) inhibitor sojowy SBBI-I, -II i -III; * miejsca aktywne (35)

Fasola indyjska (*Dolichos biflorus*) jest jednym z podstawowych źródeł białka roślinnego w Afryce i Azji (19). Najważniejszym inhibitorem proteaz wyizolowanym z nasion tej rośliny jest zbudowany z 76 aminokwasów HGI-III (Horsegram Inhibitor). Jest to pojedynczy polipeptyd o masie molekularnej równej 8312 Da. Centra aktywne w HGI występują w miejscach: Lys24-Ser25 oraz Phe51-Ser52. Wyróżniono trzy monomeryczne izoformy: HGGI-I, HGGI-II i HGGI-III, ich masa cząsteczkowa wynosi 7109, 6993 i 6464 Da (19). Na ryc. 2 przedstawiono sekwencję aminokwasów w trzech izoformach inhibitora HGGI oraz w inhibitorze HGI.

```
                1        10        20        30        38
                |--------+---------+---------+--------|
HGI-III   DHHQSTDEPSESSKPCCDQCACTKSIPPQCRCTDVRLN
HGGI-I          DEPSESSKPCCDQCACTKSIPPQCRCTDVRLN
HGGI-II         EPSESSKPCCDQCACTKSIPPQCRCTDVRLN
HGGI-III              SKPCCDQCACTKSIPPQCRCTDVRLN
Consensus       .......epsesSKPCCDQCACTKSIPPQCRCTDVRLN

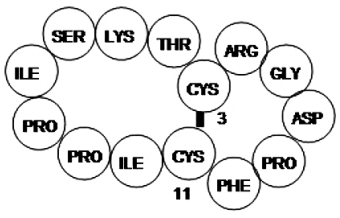
                39       48        58        68        76
                |--------+---------+---------+--------|
HGI-III   SCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKSSHDD
HGGI-I    SCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKS
HGGI-II   SCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKS
HGGI-III  SCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKS
Consensus SCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKS....
```

Ryc. 2. Porównanie sekwencji aminokwasów w inhibitorze HGGI-I, -II, -III oraz HGI-III (19)

Nasiona lucerny (*Medicago sativa* L.) zawierają ATI (Alfalfa Trypsin Inhibitor), związek zbudowany z 58 aminokwasów. Struktura tego inhibitora jest utrwalona za pomocą 7 wiązań disulfidowych Cys-Cys: 4-57, 5-20, 8-53, 10-18, 27-34, 31-46 i 36-44 (4). ATI inhibuje wyłącznie trypsynę w miejscach: Arg12-Ser13 oraz Lys38-Ser39. W liściach tej rośliny znajdują się natomiast dwa inhibitory: ATI-18 i ATI-21 zbudowane ze 133 aminokwasów o masie molekularnej około 12 500 Da (20).

Inhibitor trypsyny RBTI (Rice Bran Trypsin Inhibitor) został wyizolowany z ziarna ryżu (*Oryza sativa* L.) i opisany przez Tashiro i wsp. w 1987 roku (32). Inhibitor ten zbudowany jest ze 133 aminokwasów, zidentyfikowano 4 jego formy: RBTI-I, -II, -III i -IV. RBTI posiada 9 mostków disulfidowych (32). Masa cząsteczkowa RBTI wynosi około 14 500 Da (tab. 1), punkt izoelektryczny natomiast 8,07 (33). RBTI inhibuje trypsynę wołową w stosunku molowym 1 : 1,6. Ponadto wchodzi on w kompleksy z chymotrypsyną, pepsyną i papainą zwierząt poligastrycznych (33). Obecnie zidentyfikowano siedem form nowego inhibitora ryżowego RBBI (Rice Bowman-Birk Inhibitor) (26): RBBI2-1, RBBI2-2, RBBI2-3, RBBI2-4; RBBI3-1, RBBI3-2, RBBI3-3. Odmianę tego inhibitora pod nazwą RBBI2-3 wyizolowano z transgenicznej odmiany ryżu taipei 309 (26). Jest ona rezultatem działania patogenów grzybowych *Pyricularia oryzae.* Badania *in vitro* wykazały, że RBBI wykazuje aktywność antytrypsynową, nie wykazuje natomiast aktywności w stosunku do chymotrypsyny. Ryżowy inhibitor RBTI jest wysokim homologiem dla BRTI (Barley Rootlet Trypsin Inhibitor) wyizolowanego z ziarniaków owsa, zbudowanego ze 124 aminokwasów i posiadającego 10 wiązań disulfidowych (27).

Inhibitor trypsyny SFTI-1 (Sunflower Trypsin Inhibitor) wyizolowany z nasion słonecznika (*Helianthus annuus*) jest związkiem cyklicznym, zbudowanym z 14 aminokwasów (22). Posiada on jedno wiązanie disulfidowe w pozycji Cys3-Cys11 oraz dwa centra aktywne. Na podstawie opisu budowy inhibitora SFTI-1 podano jego schemat (ryc. 3).



Ryc. 3. Sekwencja aminokwasów w inhibitorze SFTI-1

Z ziarniaków jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) wyizolowano inhibitor BBBI (Barley Bowman-Birk Inhibitor) o masie cząsteczkowej 16 000 Da (29). Zbudowany jest on ze 125 aminokwasów i ma zdolność

Tab. 2. Skład aminokwasowy wybranych inhibitorów trypsyny z rodziny Bowmana-Birka

AA	OTI-1 (8)	OTI-2 (8)	OTI-3 (8)	LCI-1.7 (35)	VAI (35)	FBI (35)	WSTI-IV (19)	HGI-III (19)	HGGI-I (19)	HGGI-II (19)	HGGI-III (19)	BBBI (29)	WGTI (29)
Asp	8	8	9	6	5	5	11	8	5	4	4	8	4
Thr	2	2	2	4	4	4	3	4	3	3	3	8	2
Ser	6	6	6	6	6	6	12	12	10	10	8	9	4
Glu	6	7	7	4	4	2	2	2	2	2	3	5	1
Pro	4	4	4	4	4	4	5	6	6	6	5	18	6
Gly	5	5	6	1	2	2	1	0	0	0	0	6	2
Ala	3	3	3	4	3	2	3	4	4	4	4	4	4
Cys	12	12	12	14	14	14	12	14	14	14	14	20	9
Val	3	3	3	4	5	4	0	4	4	4	4	7	5
Met	1	1	1	0	0	0	3	1	1	1	1	2	1
Ile	1	1	1	1	1	0	1	2	2	2	2	6	2
Leu	4	4	4	1	1	1	3	1	1	1	1	1	0
Tyr	1	1	1	3	2	2	1	1	1	1	1	2	1
Phe	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1
His	1	1	1	3	4	3	3	4	1	1	1	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Lys	2	2	2	4	5	5	4	4	4	4	4	9	4
Gln	0	0	0	3	3	1	2	4	3	3	3	2	4
Arg	7	7	7	3	3	3	2	2	2	2	2	13	5
Asn	0	0	0	2	4	3	1	1	1	1	1	1	0
Σ	67	68	70	68	72	63	70	76	66	65	60	125	56

do hamowania aktywności dwóch cząsteczek trypsyny w miejscach Arg17-Ser18 i Arg76-Ser77 w stosunku molowym 1 : 2.

Inhibitor I-2b wyizolowany z pszenicy (*Triticum aestivum*) zbudowany jest ze 123 aminokwasów, wiązania disulfidowe posiada w pozycjach Cys-Cys: 9-63, 10-25, 15-23, 32-39, 36-51, 69-84, 72-120, 74-82, 91-89, 95-108. Inhibitor ten ma dwa centra aktywne inhibujące trypsynę w pozycjach Arg17-Ser18 i Lys76-Ser77 w stosunku molowym 2 : 1. Masa cząsteczkowa inhibitora wynosi 12 600 Da. I-2b jest w 86% identyczny z BBBI i BRTI oraz w 51% z RBTI (27). W pszenicy znajduje się także drugi inhibitor – WGTI (Wheat Germ Trypsin Inhibitor), zbudowany z 56 aminokwasów (tab. 2).

Inhibitor OTI (Onion Trypsin Inhibitor) został wyizolowany z bulw cebuli (*Allium cepa*). Wyróżnia się izomery inhibitora OTI: OTI-1, OTI-2 i OTI-3 (8). Zbudowane są one z, odpowiednio, 67, 68 i 70 aminokwasów. Masa cząsteczkowa inhibitora cebulowego wynosi, odpowiednio, 7370, 7472 i 7642 Da, punkty izoelekryczne natomiast 5,8, 5,2 i 4,6. Centra aktywne są umiejscowione w pozycji Arg17-Arg18 dla trypsyny oraz Leu46-Asp47 dla chymotrypsyny. W zielonych częściach ananasa (*Ananas comosus* L.) znajduje się peptyd o masie molekularnej 5000-6000 Da, zaszeregowany do rodziny inhibitorów BBI (21). Wykazuje on powinowactwo do cysteiny proteinaz, bromelainy, papainy i ficyliny. Inhibitor ten zawiera 5 wiązań disulfidowych.

Mechanizm działania i znaczenie inhibitorów trypsyny

Azot dostarczany z pożywieniem jest wykorzystywany do syntezy własnych białek po enzymatycznym rozkładzie białek egzogennych na peptydy, aminokwasy lub inne proste związki azotowe. Zaburzenia w przebiegu reakcji enzymatycznej proteolizy mogą być spowodowane blokowaniem enzymów proteolitycznych przez inhibitory dostarczane organizmowi z pokarmem.

Dokładny mechanizm działania inhibitorów trypsyny nie jest w pełni poznany, wiadomo jednak, że polega on na tworzeniu nieaktywnych kompleksów z enzymami trawiennymi. Mechanizm tworzenia kompleksów sprowadza się do estrowych połączeń między argininą lub lizyną z centrum aktywnego inhibitora a seryną z centrum aktywnego enzymu (37). Wiązania te ulegają dysocjacji w niewielkim stopniu (18). Inhibitory enzymów dzielą się na dwie grupy, zależnie od ilości posiadanych centrów aktywnych. Pierwszą grupę stanowią związki specyficzne dla trypsyny lub chymotrypsyny, posiadające jedno centrum aktywne. Inhibitory poliwalentne (dwugłowe) posiadają natomiast

dwa centra aktywne inhibitorów zdolne hamować działanie dwóch enzymów jednocześnie. Najczęściej hamowane jest działanie proteaz serynowych, co prowadzi do obniżenia strawności białek.

Inhibitory proteaz są syntetyzowane głównie w tkankach roślin. Rola i znaczenie tych inhibitorów w świecie roślin nie zostały wyjaśnione. Prawdopodobnie stanowią one część systemu obronnego roślin, inhibując liczne enzymy trawienne zwierząt roślinożernych, szczególnie owadów (13). Stanowią także specyficzne antyciała chroniące rośliny przed infekcją wirusową i bakteryjną (23). Inhibitory trypsyny należą do związków przeciwodżywczych, mogą jednak działać prozdrowotnie.

Negatywne znaczenie inhibitorów trypsyny sprowadza się do blokowania trypsyny, co prowadzi do zahamowania niektórych procesów zachodzących z udziałem tego enzymu i ograniczenia wykorzystania białka oraz obniżenia proteolizy białek w przewodzie pokarmowym (28), czego skutkiem jest zahamowanie wzrostu zwierząt (18). Ponadto w badaniach na zwierzętach zaobserwowano hipertrofię trzustki wskutek wzrostu sekrecji trypsyny (28). Zawartość znacznej ilości inhibitorów trypsyny wiąże się ze spadkiem odporności u owadów (13). Należy jednak zachować ostrożność w przypisywaniu obniżania strawności białka jedynie inhibitorom trypsyny, ponieważ mogą być za to odpowiedzialne również inne czynniki antyodżywcze występujące w paszy, jak np. pektyny. Ponadto efekt ten może być skutkiem interakcji między inhibitorami a takimi właśnie składnikami.

Pokarm zawierający inhibitory trypsyny stosowany jest obecnie jako element dietoterapii przy leczeniu niektórych schorzeń, np. nowotworów. Podawanie syntetycznych inhibitorów proteaz zwierzętom hamowało rozwój nowotworów jelita grubego, raka sutka i skóry (1). Antynowotworowe działanie inhibitorów enzymów proteolitycznych polega prawdopodobnie na hamowaniu tworzenia reaktywnych form tlenu przez neutrofile, hamowaniu ekspresji onkogenów i modulacji niektórych enzymów (7). Inhibitory z rodziny Bowmana-Birka są szczególnie efektywne w hamowaniu procesów nowotworowych w płucach (6) i wątrobie (38). W badaniach *in vitro* wykazano, że wyizolowany z soi inhibitor BBI blokuje estrogenozależną tumorogenezę komórek raka sutka McF7 (6). Udowodniono także hamujące działanie sojowego BBI na procesy rakotwórcze w obrębie okrężnicy u szczurów (15). Inhibitory z rodziny Bowmana-Birka mogą być również pomocne w leczeniu leukoplakii oraz okrężnicy u ludzi (2, 7). Dokładny mechanizm działania nie jest znany, wiadomo jednak, że za działanie antykarcynogenne odpowiedzialny jest fragment zlokalizowany w okolicach aktywnego centra antytrypsynowego (2).

Niektóre badania (28) wskazują na hypocholesterolemiczne działanie inhibitorów z tej grupy, co jest skutkiem zwiększenia sekrecji cholecystokininy. Prawdopodobnie przyczyną tego zjawiska jest stymulowanie żółci do syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu, co prowadzi do jego zwiększonej eliminacji z krwi.

Obecnie prowadzi się także badania nad wykorzystaniem inhibitorów proteaz w leczeniu AIDS (23), uzyskując bardzo obiecujące rezultaty.

Sposoby unieczynniania inhibitorów trypsyny

Zmniejszenie aktywności inhibitorów enzymów proteolitycznych można uzyskać, stosując metody genetyczne, fizyczne, mikrobiologiczne i chemiczne.

Wydawać się może, że najlepszym sposobem ograniczenia niekorzystnego wpływu inhibitorów proteaz na organizm zwierzęcia i człowieka jest otrzymanie na drodze selekcji odmian roślin wolnych od tych związków. Obecnie wyhodowano odmianę soi genetycznie wolną od inhibitora trypsyny (18).

Inhibitory enzymów proteolitycznych są związkami termolabilnymi. Ulegają dezaktywacji podczas przetwórstwa paszowego: mikronizacji, ekspandowania, ekstruzji, toastowania, autoklawowania oraz granulowania. Ekstruzja nasion lędźwianu pozwala na obniżenie aktywności inhibitorów trypsyny o 69-85% (11). Skuteczność procesu wzrasta wraz ze stopniem uwilgocenia nasion. Badania dotyczące wpływu czasu gotowania nasion soi na zawartość w nich inhibitorów trypsyny wykazały ujemną korelację między tymi czynnikami (14). Inhibitor RBTI, wyizolowany z ryżu, całkowicie traci swoją aktywność po 15-minutowej inkubacji w środowisku zasadowym (pH 10) w 100°C (33). Proces moczenia ziaren w środowisku o odczynie neutralnym przez 30 minut powoduje natomiast zmniejszenie aktywności tego związku o połowę (33).

Dezaktywację inhibitorów proteaz można przeprowadzić również dzięki metodom mikrobiologicznym. W żywieniu człowieka znane są produkty sojowe przefermentowane, w których stwierdza się znacznie mniejsze ilości inhibitorów w porównaniu do nasion surowych (30). Wykazano, że fermentacja nasion fasoli mung (*Vigna radiata* L.) przy udziale bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przyczynia się do obniżenia aktywności tych inhibitorów o ponad 50% (16).

Podsumowanie

Inhibitory trypsyny występują powszechnie w pożywieniu człowieka i zwierząt. Ich wpływ na organizm może być zarówno pozytywny, jak i negatywny. Inhibitory te obniżają proteolizę białek, co ogranicza wykorzystanie białka przez organizm i prowadzi w efekcie do zahamowania wzrostu młodych zwierząt, a także wywołują hipertrofię trzustki. Ponadto są przyczyną strat białka bogatego w aminokwasy, co może doprowadzić do niedoboru metioniny w organizmie. Poddanie pożywienia niektórym procesom (ekstruzja, gotowanie i inne) powoduje częściową lub całkowitą dezaktywację tych związków.

Pozytywne znaczenie oddziaływania inhibitorów trypsyny na organizm ludzi i zwierząt przejawia się w ich właściwościach przeciwutleniających, dzięki

czemu mogą one hamować powstawanie nowotworów, przede wszystkim płuc, wątroby, trzustki i sutka. Inhibitory te stymulują żółć do syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu, przez co mogą być pomocne w eliminowaniu cholesterolu z organizmu. Obiecujące są wyniki dotyczące wykorzystania inhibitorów trypsyny w leczeniu leukoplakii oraz AIDS.

Należy podkreślić, że w pożywieniu dla ludzi i zwierząt oprócz inhibitorów proteaz może znajdować się wiele innych biologicznie aktywnych związków, które mogą modyfikować działanie inhibitorów trypsyny.

Piśmiennictwo

1. *Asao T., Imai F., Tsuji I., Tashiro M., Iwami K., Ibuki F.*: The amino acid sequence of a Bowman-Birk type proteinase inhibitor from faba beans (Vicia faba L.). J. Biochem. 1991, 110, 951-955.
2. *Armstrong W. B., Kennedy A. R., Wan X. S., Atiba J., McLaren Ch. E., Meyskens Jr. F. L.*: Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. Cancer Epidemiol. Biom. Prev. 2000, 9, 43-47.
3. *Boateng J. A., Viquez O. M., Konan K. N., Dodo H. W.*: Screening of a peanut (Arachis hypogaea L.) cDNA library to isolate a Bowman-Birk trypsin inhibitor clone. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2028-2031.
4. *Brown W. E., Takio K., Titani K., Ryan C. A.*: Wound-induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves: identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. Biochem. 1985, 24, 2105-2108.
5. *Catalano M., Ragona L., Molinari H., Tava A., Zetta L.*: Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (Medicago scutellata): solution structure and analysis of self-association behavior. Biochemistry 2003, 42, 10, 2836-2846.
6. *Chen Y. W., Huang S. Ch., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K.*: Bowman Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. Carcinogenesis 2005, 26, 1296-1306.
7. *Clemente A., Gee J. M., Johnson I. T., Mackenzie D. A., Domoney C.*: Pea (Pisum sativum L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 8979-8986.
8. *Deshimaru M., Watanabe A., Suematsu K., Hatano M., Terada S.*: Purification, amino s, and cDNAc of trypsin inhibitors from onion (Allium cepa L.) bulbs. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003, 67, 1653-1659.
9. *Deshimaru M., Yoshimi S., Shioi S., Terada S.*: Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soya and soybean: the presence of two BBI-a genes and pseudogenes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004, 68, 1279-1286.
10. *Ferrasson E., Quillien L., Gueguen J.*: Amino acid sequence of a Bowman--Birk proteinase inhibitor from pea seeds. J. Protein Chem. 1995, 14, 6, 467--475.
11. *Grela E. R., Winiarska A.*: Influence of different conditions of extrusion on the antinutritional factors content in grass pea (Lathyrus sativus L.) seeds. Proc. 3rd Europ. Conf. Grain Legumes. Walladdid, Spain 1998, 2, 101-102.
12. *Hammond R. W., Foard D. E., Larkins B. A.*: Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. J. Biol. Chem. 1984, 259, 9883-9890.
13. *Iingling L., Jianjun L., Song-Ming, Liyun L., Bihao C.*: Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis). Afr. J. Biotechnol. 2005, 4, 45-49.
14. *Kaankuka F. G., Balogun T. F., Tegbe T. S. B.*: Effects of duration of cooking of full-fat soya beans on proximate analysis, levels of antinutritional factors, and digestibility by weanling pigs. Ann. Feed. Sci. Technol. 1996, 62, 229--237.
15. *Kennedy A. R., Billings P. C., Wan X. S., Newberne P. M.*: Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. Nutr. Canc. 2002, 43, 174-186.
16. *Khalil A. A.*: Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. Afr. J. Biotechnol. 2006, 5, 206-212.
17. *Kimura M., Kouzuma Y., Abe K., Yamasaki N.*: On a Bowman-Birk family proteinase inhibitor from Erythrina variegata seeds. J .Biochem. (Tokyo) 1994, 115, 369-372.
18. *Kulasek G., Leontowicz H., Krzemiński R.*: Bioaktywne substancje w pokarmach dla ludzi i zwierząt (cz. I). Czynniki antyżywieniowe. Mag. Wet. 1995, 15, 39-44.
19. *Kumar P., Rao A. G. A., Hariharaputran S., Chandra N., Gowda L. R.*: Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors. J. Biol. Chem. 2004, 279, 30425-30432.
20. *McGurl B., Mukherjee S. K., Kahn M. L., Ryan C. A.*: Cloning and characterization of two Bowman-Birk proteinase inhibitors from alfalfa (Medicago sativa var. Vernema). Plant Mol. Biol. 1995, 27, 995-1001.
21. *Mosolov V. V., Valueva T. A.*: Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. Applied Biochem. Microbiol. 2005, 41, 261-282.
22. *Mulvenna J. P., Foley Fi. M., Craik D. J.*: Discovery, structural determination, and putative processing of the precursor protein that produces the cyclic trypsin inhibitor sunflower trypsin inhibitor 1. J. Biol. Chem. 2005, 280, 32245-32253.
23. *Ng T. B., Lam S. K., Fong W. P.*: A homodimeric sporamin-type trypsin inhibitor with antiproliferative, HIV reverse transcriptase-inhibitory and antifungal activities from wampee (Clausena lansium) seeds. Biol. Chem. 2003, 384, 289-293.
24. *Odani S., Ikenaka T.*: Studies on soybean trypsin inhibitors. XI. Complete amino acid sequence of a soybean trypsin-chymotrypsin-elastase inhibitor, C-II. J. Biochem. (Tokyo) 1977a, 82, 1523-1531.
25. *Odani S., Ikenaka T.*: Studies on soybean trypsin inhibitors. X. Isolation and partial characterization of four soybean double-headed proteinase inhibitors. J. Biochem. (Tokyo) 1977b, 82, 1513-1522.
26. *Qu L.-J., Chen J., Liu M., Pan N., Okamoto H., Lin Z., Li Ch., Li D., Wang J., Zhu G., Zhao X., Chen X., Gu H., Chen Z.*: Molecular cloning and functional analysis of a novel type of Bowman-Birk inhibitor gene family in rice. Plant Physiol. 2003, 133, 560-570.
27. *Raj. S. S., Kibushi E., Kurasawa T., Suzuki A., Yamane T., Odani S., Iwasaki Y., Yamane T., Ashida T.*: Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 a resolution. J. Biochem. 2002, 132, 927-933.
28. *Roy D. M., Schneeman B. O.*: Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. J. Nutr. 1981, 111, 878-885.
29. *Song H. K., Kim Y. S., Yang J. K., Moon J., Lee J. Y., Suh S. W.*: Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol. 1999, 293, 1133-1144.
30. *Su G., Chang K. C.*: Trypsin inhibitor activity in vitro digestibility and sensory quality of meat-like yuba products as affected by processing. J. Food Sci. 2002, 67, 1260-1266.
31. *Suzuki A., Kurasawa T., Tashiro C., Hasegawa K., Yamane T., Ashida T., Odani S.*: Crystallization and preliminary X-ray studies on the trypsin inhibitor I-2 from wheat germ and its complex with trypsin. Acta Cryst. 1993, 49, 594-596.
32. *Tashiro M., Hashino K., Shiozaki M., Ibuki F., Maki Z.*: The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor. J. Biochem. (Tokyo) 1987, 102, 297-306.
33. *Tashiro M., Maki Z.*: Purification and characterization of a trypsin inhibitor from rice bran. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 1979, 25, 255-264.
34. *Valueva T. A., Mosolov V. V.*: Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochem. (Moscow) 2004, 69, 1305-1309.
35. *Weder J. K., Hinkers S. C.*: Complete amino acid sequence of the lentil trypsin-chymotrypsin inhibitor LCI-1.7 and a discussion of atypical binding sites of Bowman-Birk inhibitors. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 4219-4226.
36. *Weder J. K., Kahleyss R.*: Isolation and characterisation of four trypsin--chymotrypsin inhibitors from lentil seeds. J. Sci. Food Agric. 1998, 78, 429-434.
37. *Whiting A. K., Peticolas W. L.:* Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. Biochem. 1994, 33, 552-561.
38. *Witschi H., Kennedy A. R.*: Modulation of lung tumor development in mice with the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. Carcinogenesis 1989, 10, 2275-2277.

Adres autora: dr Anna Winiarska-Mieczan, ul. Wileńska 10/44, 20-603 Lublin; e-mail: amieczan@poczta.onet.pl

Pełne nazwy angielskojęzyczne skrótów stosowanych w tekście: BBI – Bowman-Birk Inhibitor, SBBI – Soybean Bowman-Birk Inhibitor, EBI – Erythrina Bowman-Birk Inhibitor, PSI – Phaseolus Inhibitor, WSTI – Wild Soybean Trypsin Inhibitor, LCI – Lens culinaris Inhibitor, HGI – Horsegram Inhibitor, HGGI – Horsegram Germinated Inhibitor, ATI – Alfalfa Trypsin Inhibitor, RBTI – Rice Bran Trypsin Inhibitor, RBBI – Rice Bowman-Birk Inhibitor, BRTI – Barley Rootlet Trypsin Inhibitor, SFTI – Sunflower Trypsin Inhibitor, BBBI – Barley Bowman-Birk Inhibitor, WGTI – Wheat Germ Trypsin Inhibitor, OTI – Onion Trypsin Inhibitor