

HANNA LEONTOWICZ, GUSTAW KULASEK

Naturalne pokarmowe inhibitory enzymów trawiennych

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Pokarm zaopatruje organizm w składniki odżywcze i regulacyjne. Składniki odżywcze to białka, tłuszcze, węglowodany i elementy mineralne, które dostarczają materiału budulcowego i energii. Wiele innych składników pokarmu, znajdujących się w ilościach śladowych, spełnia w organizmie role regulacyjne i funkcjonalne. Z tej ostatnio wymienionej grupy najwcześniej poznano witaminy; obecnie intensywnie badane są inne związki biologicznie czynne, przede wszystkim inhibitory enzymów, substancje o właściwościach hormonów i polifenolowe antyoksydanty. Od dawna znano antyżywniową stronę działania związków biologicznie czynnych (21, 31). W ostatnich dwóch dekadach wykazano jednak, że niektóre pokarmowe czynniki antyżywniowe wywierają również korzystne działanie na zdrowie człowieka lub zwierzęcia i mogą nawet wspomagać leczenie wielu schorzeń.

Naturalne inhibitory enzymów pasz i pokarmów i mechanizmy ich działania

Inhibitory enzymów są białkami, peptydami, glikoproteinami lub należą do związków polifenolowych. Najwięcej jest informacji o białkowych i peptydowych inhibitorach proteaz, ale ostatnio ukazują się coraz więcej publikacji naukowych o inhibitorach amylaz, lipaz oraz o inhibitorach polifenolowych. Inhibitory enzymów trawiennych gromadzone w roślinach, poza funkcjami regulacyjnymi, chronią je przed bakteriami, grzybami, owadami i wyższymi zwierzętami roślinożernymi.

Inhibitory enzymów tak w przewodzie pokarmowym jak i w komórkach zwierzęcych i roślinnych w znacznym stopniu kontrolują metabolizm. Pokarmowe inhibitory enzymów ograniczają dostępność składników odżywczych z pobranego pokarmu i jednocześnie nasilają straty składników endogennych. Spożywanie pokarmów zawierających inhibitory enzymów, lub podawanie oczyszczonych czy też syntetycznych inhibitorów może być pomocne w dietoprofilaktyce, a nawet w dietoterapii niektórych schorzeń, np. cukrzycy, otyłości, nowotworów; próbuje się wykorzystywać te inhibitory nawet w leczeniu AIDS. Roślinne inhibitory enzymów są wykorzystywane ponadto w przetwórstwie i przechowywaniu pokarmów oraz w laboratoriach biochemicznych.

Inhibitory proteaz. Roślinne inhibitory proteaz hamują proteazy zawierające serynę np. trypsynę,

chymotrypsynę i inne, ale nie hamują bakteryjnego trawienia białka w jelicie grubym u owadów i zwierząt wyższych (7). Inhibitory proteaz znane były już w ubiegłym wieku ale dopiero w 1947 r. Kunitz wyizolował i scharakteryzował sojowy inhibitor trypsyny (cyt. za 4). Obecnie poznano wiele innych inhibitorów proteaz. Inhibitory proteaz dzieli się zwykle na rodziny; przynależność do danej rodziny jest uwarunkowana podobną sekwencją aminokwasów w cząsteczce i podobnymi centrami odpowiedzialnymi za hamowanie enzymów proteolitycznych.

Sojowy inhibitor trypsyny (TI) Kunitza wyizolowany z soi posiada molekułę o masie około 22 kDa zbudowaną ze 181 (reszt) aminokwasów. Cząsteczka TI posiada dwa mostki siarczkowe i aktywne (hamujące) centrum w pozycji Arg63-Ileu64. Poza soją badano wiele innych roślin ale tylko w nielicznych przypadkach stwierdzono niewielkie ilości inhibitorów trypsyny o podobnej sekwencji aminokwasów, czyli należące do tej samej rodziny (4). Jeśli aktywność inhibitora trypsyny z soi przyjmiemy za 100%, to aktywność podobnego inhibitora z ciecierzycy pospolitej wynosiła 66%, z soczewicy 25% a z bobiku od 0,7 do 36% (9).

Jedna molekuła inhibitora trypsyny Kunitza łączy się w jelicie cienkim z jedną molekułą trypsyny w podobny sposób jak powstaje kompleks substrat-enzym. O ile jednak kompleks enzym-substrat łatwo dysocjuje na enzym i produkt to kompleks TI-trypsyna jest połączeniem trwałym i w postaci niestrawionej dostaje się z treścią pokarmową do jelita grubego. Taki enzym nie spełnia swojej funkcji, przez co obniża się strawność białka w przewodzie pokarmowym, a ponadto organizm traci duże ilości aminokwasów siarkowych; tak inhibitory enzymów jak i same enzymy trawienne zawierają dużo aminokwasów siarkowych.

Inhibitory proteaz Bowmana-Birk (BBI). W roślinach strączkowych przeważa inny inhibitor proteaz, mianowicie inhibitor Bowmana-Birk (BBI) hamujący aktywność tak trypsyny jak i chymotrypsyny. Poznano sekwencje aminokwasów 5 różnych BBI. Cząsteczka BBI-I posiada siedem mostków siarczkowych i dwa aktywne centra: jedno hamujące aktywność trypsyny (Liz16-Ser17) i drugie odpowiedzialne za hamowanie aktywności chymotrypsyny (Leu43-Ser44). Inhibujące działanie BBI na trypsynę i chymotrypsynę stwierdzono u bydła, świń, ptaków, ryb (4). Analogi BBI znaleziono w wielu

innych roślinach strączkowych a nawet w ryżu. Ostatnio w soczewicy zidentyfikowano 23 inhibitory proteaz należące do rodziny BBI.

Ziemniaczane inhibitory proteaz to rodzina inhibitorów o masie cząsteczkowej od 4 do 40 kDa dzielona zwykle na trzy podgrupy (I, II i III). Inhibitor I działa hamująco głównie na chymotrypsynę i słabiej na trypsynę, zaś inhibitor II jest aktywny w stosunku do trypsyny i chymotrypsyny. Do trzeciej podgrupy zalicza się szereg inhibitorów serynowych endopeptydaz, papain i innych.

Inhibitory roślin dyniowatych należą do inhibitorów trypsyny i znaleziono je w nasionach dyni, cukini, ogórka. Cząsteczka tych inhibitorów jest złożona z 29-32 aminokwasów, z trzema mostkami siarczkowymi i aktywnym centrum w pozycji Arg (lub Liz) 5-Ileu6.

Inhibitory proteaz roślin zbożowych stwierdzono w jęczmieniu, życie, pszenicy, pszenżycie, kukurydzy, ryżu i owsie (4).

Tamir i wsp. (53) badali termostabilny inhibitor trypsyny i chymotrypsyny w nasionach amarantusa (szarłat), który nie może być zaliczony do żadnej znanej już rodziny. W rzepaku, szczególnie w odmianach o niskiej zawartości glukozyolanów, występują niewielkie ilości inhibitora trypsyny (5-7 IU/g) (Kunitz) oraz trypsyny i chymotrypsyny (Bowman-Birk) (3, 58).

Trzustkowy inhibitor sekrecji trypsyny został stwierdzony u ssaków i ptaków (60). Fizjologiczna rola tego inhibitora polegać ma na zapobieganiu katalizowania w trzustce aktywacji zymogenów (proenzymów) przez trypsynę. W białku jaja kurzego około 10% stanowi owomukoid (glikoproteina), który jest aktywnym inhibitorem trypsyny (17). Starsze badania wykazały, że saponiny sojowe i z lucerny również hamują aktywność enzymów trawienych (55).

W praktyce aktywność różnych proteaz wyraża się najczęściej w jednostkach hamowania aktywności trypsyny (TIU).

Białkowe inhibitory α -amylaz podobne w budowie do inhibitorów proteaz znaleziono w wielu ziarnach zbóż i kukurydzy oraz w nasionach roślinach motylkowych (45). W życie, pszenicy, pszenżycie i jęczmieniu znajdują się dwa typy białkowych inhibitorów α -amylaz: typ D (defence) ukierunkowany na obronę przed szkodnikami tych roślin (hamujący amylazy owadów i ssaków) i typ R (regulation) hamujący własne amylazy (ochrona skrobi przed rozkładem). Najwyższa koncentracja inhibitora typu D występuje w zarodkach (najważniejsza część ziarna) a najniższa w części zapasowej (aleuronowej). W czasie kiełkowania ziarna żyta nie zmieniała się w nim koncentracja tych inhibitorów (D i R), ale rosła aktywność α -amylazy (54). Kotaru i wsp. (20) badali inhibitory α -amylazy z kilku roślin motylkowych. Wyizolowana z nich α -amylaza prawie nie

była trawiona przez pepsynę i trypsynę, ale była powoli rozkładana przez wieprzową i wołową chymotrypsynę. Oporność inhibitora na rozkład przez pepsynę wskazuje, że pokarmowe inhibitory α -amylaz dostają się bez zmian do dwunastnicy, gdzie inaktywują amylazę trzustkową.

Pusztai i wsp. (45) podawali rosącym szczurom czysty inhibitor α -amylazy otrzymany z fasoli w ilości 0, 1,6, 3,3 i 6,6 g inhibitora/kg diety. Dwie najwyższe koncentracje inhibitora α -amylazy (3,3 i 6,6 g/kg diety) hamowały wyraźnie przyrosty szczurów, obniżały istotnie strawność i wykorzystanie skrobi oraz białka. Przy tych dawkach inhibitora aktywność α -amylazy w treści jelita była bardzo niska i prawie cała skrobia z pobranego pokarmu była fermentowana w jelicie grubym, a przy najwyższej dawce inhibitora skrobia pojawiała się w dużych ilościach nawet w kale; w tym ostatnim przypadku jelito ślepe było wyładowane treścią i często dochodziło do pęknięć tego jelita oraz zejść śmiertelnych.

Fölsch i Creutzfeldt (10) wykazali, że obecność w dwunastnicy inhibitora α -amylazy nie stymuluje wydzielania amylazy przez trzustkę jak to ma miejsce w przypadku inhibitorów proteaz.

Aktywność inhibitorów α -amylazy może być wzmożona, jeśli w produkcie znajdują się taniny związane z białkiem, co stwierdzono w przypadku fasoli (30).

Inhibitory α -amylazy występujące w niektórych roślinach chronią je przed szkodnikami i dlatego metodami inżynierii genetycznej próbowano do niektórych roślin wprowadzać obce geny inhibitora α -amylazy lub pobudzać ekspresję własnych genów. Jest to metoda w pełni skuteczna w stosunku do roślin przemysłowych, np. tytoniu (1); wprowadzenie genu inhibitora α -amylazy do roślin zbożowych może co prawda chronić je przed szkodnikami, ale równocześnie ogranicza ich przydatność, szczególnie w żywieniu zwierząt.

Inhibitory proteaz i α -amylaz o budowie polifenolowej. Skondensowane taniny hamują silnie α -amylazę (46) i inne enzymy trawienne, ograniczają apetyt i zmniejszają strawność składników pokarmowych (55). W strefie tropikalnej i subtropikalnej wiele roślin zawiera wysoką koncentrację tanin. W naszych paszach najwięcej tanin zawierają nasiona bobiku oraz importowane sorgo. Pastuszevska i wsp. (42) w doświadczeniach na szczurach a Grala i wsp. (13) na prosiętach żywionych mieszankami pasz z dużym udziałem bobiku różnych odmian stwierdzili ujemną zależność między zawartością tanin w diecie a strawnością białka. Silanikove i wsp. (49, 50, 51) zaobserwowali, że owce i kozy żywione liśćmi zawierającymi dużo tanin pobierają mniej pokarmu i gorzej go trawią. Jest to spowodowane trwałym wiązaniem przez taniny białka endogenne (enzymatycznego) i białka pobranych pasz, co ogranicza trawienie i wykorzystanie

Tab. 1. Zawartość inhibitora trypsyny (TI) w handlowych produktach sojowych (47)

Produkt	Inhibitor trypsyny mg/g produktu	Straty inhibitora trypsyny w %
Surowa mąka sojowa	52,1	0
Ogrzewana (toastowana) mąka sojowa	3,2 - 7,9	85 - 94
Koncentrat białka sojowego	6,3 - 13,7	73 - 88
Izolowane białko sojowe	4,4 - 11,0	79 - 91

składników dawek pokarmowych. Glikol polietylenowy (PEG) ma większe powinowactwo do tanin niż białka enzymatyczne lub pokarmowe i uzupełnienie takich dawek w PEG znosi niekorzystny wpływ tanin na procesy trawienne (49). Zwierzęta roślinożerne odżywiające się roślinami bogatymi w skondensowane taniny zawierają w ślinie białko (proline rich protein – PRP), którego powinowactwo do tanin jest wyższe niż do białek enzymatycznych lub białek zawartych w pokarmie. Kompleks PRP-taniny jest stabilny w przewodzie pokarmowym (33) i w ten sposób częściowo zapobiega niekorzystnemu działaniu tanin na strawność i wykorzystanie składników diety. Kozy są przystosowane do pobierania dużych ilości roślin zawierających taniny, ale nie wydzielają w ślinie PRP (37).

Mechanizm działania inhibitorów proteaz

Hamowanie wzrostu zwierząt, rozrost trzustki i inne ujemne skutki przypisywane inhibitorom proteaz są trudne do interpretacji, gdyż zwykle są wywołane paszami, które zawierają również inne inhibitory enzymów (np. inhibitory α -amylaz), lektyny, taniny i inne. Hamowanie wzrostu zwierząt przypisywane inhibitorom proteaz obserwowano u szczurów, myszy, kurcząt i chomików. Aby uzyskać maksymalne przyrosty masy ciała i wysoką strawność białka u rosnących szczurów karmionych dietą z soją należy wyeliminować 79-87% TI, zaś do wyeliminowania hipertrofii trzustki należy zniszczyć tylko 55-69% TI (9). Zmniejszenie spożycia i przyrostów masy ciała oraz hipertrofię trzustki stwierdzono u szczurów otrzymujących w diecie 10% surowych nasion soi (22). U dorosłych świnek morskich, psów i małp nie obserwowano rozrostu trzustki, podobnie jak u świń i cieląt, przy czym u dwóch ostatnio wymienionych gatunków stwierdzono hamowanie wzrostu masy ciała; u świń było ono powiązane ze wzrostem sekrecji enzymów trzustkowych zaś u cieląt było wynikiem zmniejszenia strawności i wolniejszego wchłaniania aminokwasów. Wrażliwość cieląt na dietę z surową soją, zawierającą między innymi inhibitory proteaz, jest znacznie większa niż szczurów i piskląt. Młode zwierzęta są bardziej wrażliwe na straty enzymów trzustko-

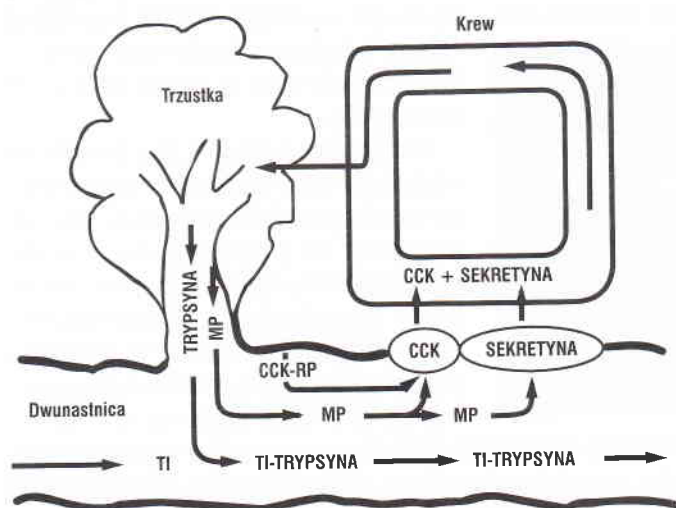
wych niż osobniki starsze ponieważ ich zewnątrzwydzielnicza funkcja trzustki nie jest w pełni wykształcona (40).

Le Dréan i wsp. (23) badali na cielętach wpływ zastąpienia chudego mleka produktami sojowymi lub z grochu na przyrosty masy ciała, wielkość trzustki i aktywność enzymów trzustkowych. Stwierdzono, że zastąpienie mleka w proszku surową mączką z grochu lub ogrzewaną mączką sojową obniżało

istotnie przyrosty cieląt i w przypadku mączki z grochu zmniejszało nieco masę trzustki. Płatkowanie mączki z grochu (flaked) znosiło te efekty. Stosowane dodatki grochu lub soi nie miały wpływu na aktywność enzymów proteolitycznych.

Niewiele jest danych dotyczących dopuszczalnych ilości TI w diecie człowieka i zwierząt. Desphande (9) podaje, że Brytyjczycy pobierają średnio 330 mg TI/d. Handlowe produkty sojowe zawierają na ogół od 5 do 20% aktywności TI w porównaniu do surowej soi (tab. 1). U ludzi otrzymujących przez sondę dwunastniczą surową mączkę sojową obserwowano wzrost we krwi CCK i nasilenie sekrecji trypsyny oraz chymotrypsyny. Istotny wzrost sekrecji tych enzymów i elastazy obserwowano również u ludzi otrzymujących dodwunastnicze infuzje inhibitora Bowmana-Birk (28).

Mechanizm działania inhibitorów proteaz nie jest do końca wyjaśniony. Duże ilości w pokarmie inhibitorów trypsyny i chymotrypsyny (np. dużo surowej soi) nasilają wydzielanie soku trzustkowego, powodują hipertrofię i hiperplazję trzustki, a w skrajnych przypadkach nawet zmiany nowotworowe. Na podstawie badań na szczurach Iwai i wsp. (16) zaproponowali następujący mechanizm działania inhibitora trypsyny na zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki: pokarmowy inhibitor trypsyny łączy się trwale z trypsyną, co doprowadza do jej niedoboru w jelicie cienkim. Niedobór trypsyny w jelicie jest czynnikiem zwiększającym wydzielanie trzustkowe. Wydzielanie soku trzustkowego jest kontrolowane głównie przez cholecystokininę (CCK) i sekretynę. Wydzielanie zaś CCK jest stymulowane przez peptyd monitorujący (MP) wydzielany zawsze z sokiem trzustkowym. W przypadku diety nie zawierającej inhibitora trypsyny peptyd monitorujący jest szybko inaktywowany w jelicie przez trypsynę, ale w przypadku związania trypsyny z inhibitorem trypsyny peptyd monitorujący jest aktywny i nasila wydzielanie CCK, która z kolei pobudza trzustkę do wydzielania enzymów. W dalszych pracach Miyasaka i wsp. (36) i Lu i wsp. (32) wykazano, że w świetle jelita znajduje się jeszcze dodatkowo peptyd uwalniający CCK (CCK-RP). Obecność w dwunastnicy TI nasila wydzielanie również sekre-



Ryc. 1. Mechanizm stymulowania zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki przez pokarmowe inhibitory trypsyny (TI). Inhibitory trypsyny wiążą się z trypsyną i chymotrypsyną. Przy niskim poziomie tych enzymów nie dochodzi do inaktywacji trzustkowego peptydu monitorującego (MP) i jelitowego peptydu uwalniającego CCK (CCK-RP). Zwiększona koncentracja MP i CCK-RP pobudza specyficzne komórki dwunastnicy do nasilonego wydzielania CCK i sekretyny, które z kolei pobudzają wydzielanie soku trzustkowego

tyny (ryc. 1). W mechanizmie nasilenia sekrecji soku trzustkowego uczestniczy także układ cholinergiczny (57). Ostatnio Pusztai i wsp. (44) wykazali, że również wolny inhibitor trypsyny pobudza zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki.

Liener (28) analizował wyniki badań nad zależnością między wielkością trzustki u różnych gatunków zwierząt a jej podatnością na hipertrofię pod wpływem surowej śrutki sojowej lub czystego inhibitora trypsyny. Autor ten wnioskuję, że największa podatność na hipertrofię dotyczy tych gatunków, u których trzustka stanowi więcej niż 0,3% masy ciała (szczur, mysz, kurczęta, chomik, świnka morska). U człowieka oraz u psa, świni, cielęcia masa trzustki stanowi od 0,06 do 0,24% masy ciała (52). Gumbmann i Friedman (15) stwierdzili, że trzustka ma większą niż inne narządy zdolność do mobilizacji aminokwasów siarkowych, które są zaangażowane w kompensacyjnych mechanizmach prowadzących do wzrostu syntezy białka bogatego w aminokwasy siarkowe (29). Za powiększenie trzustki i nasilenie zewnątrztrzustkowego wydzielania odpowiedzialny jest przede wszystkim inhibitor trypsyny a nie BBI. Długotrwałe stosowanie w żywieniu szczurów diet zawierających soję, fasolę, łubin lub groch wpływało na istotny wzrost względnej masy jelita ślepego i

okrężnicy. W przypadku diet z udziałem soi lub grochu stwierdzono wzrost względnej masy trzustki a nawet jej neoplazję (14).

Eliminacja lub inne sposoby ograniczenia działania inhibitorów enzymów pokarmowych

Zmniejszenie aktywności pokarmowych inhibitorów enzymów trawiennych można uzyskać stosując metody fizyczne, chemiczne, mikrobiologiczne lub genetyczne. Ekstruzja jest jedną z bardziej skutecznych i wydajnych metod inaktywacji inhibitorów. Wpływ ekstruzji nasion soi, bobiku i grochu na aktywność inhibitora trypsyny przedstawiono w tabeli 2. Niekorzystne efekty stosowania pasz zawierających czynniki antyżywniowe próbuje się również ograniczać przez odpowiednie dodatki paszowe, np. aminokwasy siarkowe. Wyniki badań nad wpływem różnych technologii unieszkodliwiających inhibitory proteaz są kontrowersyjne.

Marty i Chavez (34) badali wpływ różnych technologii termicznej obróbki nasion soi na strawność składników odżywczych u świń w pełnym cyklu produkcyjnym. We wszystkich zastosowanych technikach aktywność inhibitora trypsyny obniżano do około 10% aktywności w produkcie surowym. W badaniach strawności autorzy ci stwierdzili, że najwyraźniejsza reakcja była u prosiąt karmionych po odsadzeniu mieszanką pasz zawierającą soję ekstrudowaną w 130°C, która najwyraźniej poprawiała strawność białka i frakcji włókna rozpuszczalnego w obojętnym detergencie (NDF). Inne zastosowane w tym doświadczeniu techniki obróbki termicznej soi powodowały prawdopodobnie termiczne uszkodzenie białka, co obniżyło jego strawność (tab. 3).

Bonilla i wsp. (6) badali wpływ tradycyjnego gotowania czarnej fasoli na aktywność inhibitora trypsyny i inhibitora alfa-amylazy. Do inaktywacji około 80% inhibitora trypsyny wystarczyło 10 minutowe gotowanie, ale do inaktywacji inhibitora α -amylazy gotowanie trzeba było wydłużyć do 30 minut.

Tab. 2. Wpływ ekstrudowania (ekstruder jednoślismakowy Insta Pro 600) nasion roślin strączkowych na aktywność inhibitora trypsyny (TIU/mg próby) (Leontowicz H. dane niepublikowane)

Nasiona	Nasiona surowe	Temperatura ekstruzji, °C	
		150	160
Soja brazylijska	31,3	23,0	-
Soja austriacka	17,5	-	10,8
Bobik Nadwiślański	2,1	0,7	-
Bobik Nadwiślański	1,5	-	0,5
Groch siewny Fidelia	2,3	0,3	-

Tab. 3. Wpływ różnych technologii obróbki cieplnej rozdrobnionej soi pełnotłustej i handlowej mączki sojowej na aktywność inhibitora trypsyny (TIA) oraz strawność białka i NDF (frakcja nierozpuszczalna w rozpuszczalniku obojętnym – celuloza, hemiceluloza, lignina) u prosiąt po odsadzeniu (wg 34)

Sposób obróbki cieplnej produktów sojowych	Aktywność inhibitora trypsyny, TI U/mg	Strawność, %	
		białko surowe	NDF
Soja surowa	71,4	-	-
Mączka sojowa, handlowa	5,2	76,6b	53,8c
Soja ekstrudowana (0,5 min. w 130°C - ekstruder Insta-Pro - jednoślismakowy)	5,7	87,8a	76,2a
Soja ogrzewana gorącym (316°C), krążącym powietrzem. 1,0 min. - temp. produktu 149-163°C (Jet-splotted, Model M-2, California Pellet Mill Co.)	6,1	80,9b	62,7b
Soja ogrzewana energią elektromagnetyczną podczerwieni (micronized). 1,5 min., 110-115°C. (Micro-soya, Semences Prograin Inc.)	6,2	80,8b	63,3b
Soja przypiekana w komorze ogniowej. 2-5 min., temp. produktu opuszczającego komorę - 110-130°C.	7,3	82,1b	61,9b

Objaśnienia: a, b, c – średnie w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Namoczenie a następnie gotowanie przez 5 minut nasion niki indyjskiej (*Cajanus cajan*) eliminowało całkowicie aktywność inhibitorów trypsyny i chymotrypsyny (39).

Poddanie nasion roślin strączkowych kiełkowaniu może wyeliminować od kilku do 100% aktywności inhibitora trypsyny i zmniejszyć zawartość inhibitora α -amylazy oraz tanin o ponad 50% (rev. 48). Kiełkowanie soi obniża też aktywność lipazy trzustkowej. Skutecznym sposobem eliminacji lipoksygenazy – enzymu odpowiedzialnego za psucie się tłuszczu – jest krótkie ogrzewanie pasz w kuchence mikrofalowej (59).

W badaniach własnych na rosnących szczurach stwierdzono, że ekstrudowanie nasion roślin strączkowych (bobiku, grochu i soi) w temperaturach 150-170°C skutecznie ograniczało w nich aktywność inhibitora trypsyny i lektyn; ekstruzja tych nasion w temperaturze 150°C zwiększała ponadto strawność białka u badanych zwierząt (25). Ekstruzja nasion soi w temperaturze 150°C eliminowała u szczurów powiększenie trzustki i okrężnicy z prostnicą zaś w przypadku diety z ekstrudowanym bobikiem nie dochodziło do powiększenia nerek, śledziony, żółćki i jelita czczego (26).

Aktywność inhibitora trypsyny (TIA) w surowych nasionach grochu i fasoli jest bardziej zróżnicowana w obrębie gatunku niż między gatunkami tych roślin. TIA w białym grochu odmian zimowych wynosi od 6-16 jednostek/mg suchej masy i jest dwukrotnie wyższa niż w odmianach jarych (1,7-5,5 jednostek/mg s.m.). U kurcząt karmionych mieszankami pasz treściwych z udziałem fasoli lub grochu (do 50% diety) wspomniane wyżej procesy techno-

logiczne prowadziły na ogół do wzrostu strawności białka. Nie zawsze obserwowano natomiast wpływ tak traktowanego grochu lub fasoli w żywieniu odsadzonych prosiąt (27). Przy żywieniu odsadzonych prosiąt paszą z 45% udziałem grochu odmian jarych ekstrudowanie poprawiało strawność białka o 4-5%; nie obserwowano tego efektu przy 3% udziale grochu w paszy. Żywienie szczurów i kurcząt dietą zawierającą mączkę sojową ogrzewaną z dodatkiem izolowanego z soi TI lub/i BBI nie hamowało istotnie przyrostów masy ciała zwierząt, ale powodowało istotne zwiększenie masy trzustki. Szczury żywione izolatami białkowymi z surowej soi miały znacznie niższe przyrosty masy ciała (4). Te ostatnie informacje wskazują, że hamujący wpływ na przyrosty zwierząt mają również inne termolabilne czynniki antyżywniowe, np. lektyny (21).

Mechanizmy adaptacyjne trzustki do obecności inhibitorów enzymów proteolitycznych w diecie funkcjonują u wielu gatunków zwierząt a nawet u tych, u których nie dochodzi do powiększenia trzustki np. u prosiąt i cieląt; nie dotyczy psów (23). Powstanie w jelicie szczura kompleksowych połączeń między trypsyną i chymotrypsyną a inhibitorami tych enzymów nasila straty aminokwasów siarkowych i zmniejsza drastycznie przyrosty zwierząt. Wzbogacenie surowych lub ogrzewanymi produktami sojowymi aminokwasami siarkowymi (metionina lub/i cystyna) zwiększa przyrosty zwierząt (24) przy czym efekt ten jest bardziej widoczny przy stosowaniu mieszanek zawierających surową soję (11). W badaniach własnych (Leontowicz – niepublikowane) stwierdzono, że szczury otrzymujące diety z surowym lub ekstrudowanym bobikiem lub surową soją

Tab. 4. Wpływ suplementacji aminokwasów siarkowych do diet zawierających nasiona roślin strączkowych na poprawę przyrostów masy ciała w porównaniu do zwierząt otrzymujących diety bez suplementacji aminokwasów

Dieta	Zwierzęta	Suplementacja aminokwasów g/kg	Poprawa przyrostów w %	Autor
Starter, 30% grochu surowego	prosięta	1,2 metioniny	140	*
Starter, 24% grochu surowego	prosięta	0,3 tryptofanu	105	(12)
Starter, groch surowy	kurczęta	2,5 metioniny 1,0 cystyny 0,7 tryptofanu	112	(38)
Starter, groch autoklawowany	kurczęta	2,5 metioniny 1,0 cystyny 0,7 tryptofanu	118	(38)
Dieta półsyntetyczna, 10% soi surowej	szczury	1,5 metioniny 1,5 cystyny	183	**
Dieta półsyntetyczna, 10% soi ekstrudowanej w temp. 160°C	szczury	1,5 metioniny 1,5 cystyny	102	**
Dieta półsyntetyczna, 10% bobiku surowego	szczury	1,5 metioniny 1,5 cystyny	197	**
Dieta półsyntetyczna, 10% bobiku ekstrudowanego w temp. 160°C	szczury	1,5 metioniny 1,5 cystyny	189	**

Objaśnienia: * Zivkovic i wsp. 1987 – cyt. za (8), ** Leontowicz H.: dane niepublikowane

(10%) po dodaniu aminokwasów siarkowych miały przyrosty masy ciała prawie dwukrotnie wyższe niż zwierzęta otrzymujące diety bez dodatku aminokwasów. Suplementacja aminokwasów siarkowych do diety zawierającej ekstrudowaną soję (10%) nie przynosiła natomiast istotnych zmian w przyrostach szczurów (tab. 4).

Inhibitory proteaz a zdrowie ludzi i zwierząt

Epidemiologiczne badania już dawno wykazały, że w populacjach ludzi spożywających przede wszystkim produkty pochodzenia roślinnego częstotliwość występowania schorzeń nowotworowych jest mniejsza niż w regionach spożywających dużo produktów pochodzenia zwierzęcego. Na przykład Armstrong i Dole (2) donosili, że rak piersi występuje najrzadziej w Tajlandii, gdzie dieta składa się głównie z ryżu i soi, zaś najczęściej występuje w Holandii gdzie spożywa się dużo mięsa i produktów mleczarskich. Fakt ten wiązano między innymi z zawartością inhibitorów proteaz. Przypuszczenia te zostały potwierdzone przez Trolla i wsp. (56) w badaniach modelowych na zwierzętach, w których wykorzystano syntetyczne inhibitory trypsyny i chymotrypsyny. W badaniach tych oraz innych autorów obecność w diecie inhibitorów proteaz hamowała tak inicjację jak i promocję nowotworów jelita grubego, raka piersi, a nawet skóry. Antynowotworowe działanie inhibitorów proteaz polega prawdopodobnie na hamowaniu tworzenia się reaktyw-

nych form tlenu przez neutrofile, hamowaniu ekspresji onkogenów i modulacji niektórych enzymów (56). Inhibitor Bowman-Birk oraz wyizolowany z amarantusa inhibitor proteaz efektywnie blokował estrogenozależną tumorogenezę komórek raka piersi McF7 *in vitro* (53). Syntetyczne niskomolekularne inhibitory proteaz, na przykład camostat i temu podobne, wnikają do trzustkowych komórek zewnątrzwydzielniczych i prawdopodobnie znajdują zastosowanie w leczeniu ostrych zapaleń trzustki (41). O możliwości stosowania inhibitorów proteaz w prewencji i leczeniu niektórych nowotworów dyskutowali między innymi Messina i Messina (35), Kennedy (18) oraz Birk w monografii wydanej w 1993 r. (5).

W doświadczeniu Puls i Keup (43) wykazano, że czyste preparaty inhibitora α -amylazy z pszenicy podane człowiekowi, psu lub szczurowi hamowały poposiłkowy wzrost koncentracji glukozy we krwi przy wzroście insuliny. Nasunęło to myśl, że preparaty takie mogą być stosowane w cukrzycy lub otyłości. Już w latach osiemdziesiątych próbowano do tego celu stosować surowe, nieoczyszczone, roślinne preparaty zawierające inhibitor α -amylazy. Preparaty te posiadały na ogół niską aktywność tego inhibitora, ponadto były zanieczyszczone lektynami, inhibitorami proteaz i innymi czynnikami antyżywnościowymi i dlatego nie wykazywały założonych efektów. Oczyszczone inhibitory α -amylazy (45) mogą być jednak przydatne w leczeniu otyłości u

ludzi i psów oraz mogą łagodzić przebieg cukrzycy insulinozależnej. Obiecujące są doświadczenia z leczeniem cukrzycy i otyłości u psów z wykorzystaniem handlowego, częściowo oczyszczonego preparatu inhibitora α -amylazy z pszenicy. Inhibitor ten hamuje zarówno α -amylazę trzustkową jak i amylazę ślinową. Jest to produkt odpadowy przy wytwarzaniu z pszenicy skrobi i glutenu. Koike i wsp. (19) podawali psom w dziennym posiłku przez 9 tygodni po 1,5 g preparatu częściowo oczyszczonego inhibitora α -amylazy z pszenicy. Ilość ta była wystarczająca do zahamowania >90% aktywności α -amylazy w dwunastnicy, co jest wystarczające do leczenia cukrzycy; do leczenia otyłości, zdaniem tych autorów, dawka inhibitora powinna być wyższa.

Na zakończenie rozważań o wpływie inhibitorów enzymów na organizm zwierzęcy warto podkreślić, że trzeba bardzo ostrożnie podchodzić do wyników badań tak *in vivo* jak i *in vitro*, w których stosowano pasze, a nawet wyciągi z pasz zawierające te inhibitory. Produkty te oprócz oznaczonych inhibitorów zawierają cały szereg innych biologicznie aktywnych związków (np. lektyny, saponiny), które mogą modyfikować odpowiedź na inhibitory enzymów. Potrzebne są więc dalsze prace nad izolacją i oznaczaniem poszczególnych inhibitorów enzymów, które pozwolą na lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów ich oddziaływania na organizm zwierzęcia. Niemniej ważne są badania nad wpływem różnych technologii przetwarzania i suplementacji nasion roślin wysokobiałkowych w celu zwiększenia efektywności i bezpieczeństwa ich stosowania w żywieniu człowieka i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. *Altabella T., Chrispeels M. J.*: Plant Physiol. 93, 805, 1990.
2. *Armstrong B., Doll R.*: Int. J. Cancer 15, 617, 1975.
3. *Bell J. M., Rakow G.*: Can J. Anim. Sci. 76, 423, 1996.
4. *Birk Y.*: W: Proc. Intern. Euro Food Tox. IV Conference, 22-24 Sept. 1994, Olsztyn. Red.: Kozłowska H., Fornal J. i Zduńczyk Z., s. 202.
5. *Birk Y.*: Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. Plenum, New York 1993, s. 97.
6. *Boniña A. R., Calzada C., Cooke R.*: Arch. Latinoamer. Nutr. 41, 609, 1991.
7. *Broadway R. M.*: J. Insect Physiol. 41, 107, 1995.
8. *Castell A. G., Guenter W., Igbasan F. A.*: Anim. Feed Sci. Technol. 60, 209, 1996.
9. *Desphande S. S.*: Critical Rev. Food Sci. Nutr. 32, 333, 1992.
10. *Fölsch U. R., Creutzfeldt W.*: Scand. J. Gastroenterology 20 (suppl.), 54, 1985.
11. *Friedman M.*: J. Agric. Food Chem. 42, 3, 1994.
12. *Gatel F., Feteke J., Grosjen F.*: Prod. 49, 330, 1989.
13. *Grala W., Jansman A. J. M., van Leeuwen P., van Kempen G. J. M., Verstegen M. W. A.*: W: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. van der Poel A. F. B., Huisman J., Saini H. S. (red.). Wageningen Pers, Wageningen 1993, s. 321.
14. *Grant G., Mordward P. M., Buchan W. C., Armour J. C., Pusztai A.*: Brit. J. Nutr. 73, 17, 1995.
15. *Gumbmann M. R., Friedman M.*: J. Nutr. 117, 1018, 1987.
16. *Iwai K., Fushiki T., Fukuoka S. I.*: Pancreas 3, 720, 1988.
17. *Kato Y., Matsuda T.*: W: Chemical Markers for Processed and Stored Foods. Lee T.-C., Kim H.-J. (red.), New York, Amer. Chem. Soc., 1996, s. 227.
18. *Kennedy A. R.*: W: Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. Plenum, New York, 1993, s. 9.
19. *Koike D., Yamadera K., Dimagno E. P.*: Gastroenterology 108, 1221, 1995.
20. *Kotaru M., Iwami K., Yeh H.-Y., Ibuki F.*: Food Chem. 43, 47, 1992.
21. *Kulasek G., Leontowicz H., Krzemiński R.*: Mag. Wet. 4, 39, 1995.
22. *Kulasek G. W., Leontowicz H., Leontowicz M., Bałasińska B.*: Abstr. Internat. Congress Nutr, Montreal 1997, s. 250.
23. *Le Dréan G., Le Huërou-Luron I., Philouze-Romé V., Toullec R., Guiloteau P.*: Ann. Nutr. Metab. 39, 164, 1995.
24. *Leontowicz H., Gralak M. A., Leontowicz M., Kulasek G. W., Krzemiński R.*: Book of Abstracts – Bioavailability 97. Wageningen 1997, s. 100.
25. *Leontowicz H., Leontowicz M., Kostyra H., Kulasek G.*: Mat. X Kongresu PTNW, Wrocław 1, 76, 1996.
26. *Leontowicz H., Kulasek G., Leontowicz M., Wawrykowicz G., Krzemiński R.*: Mat. X Kongresu PTNW, Wrocław 1, 75, 1996.
27. *Leterme P., Beckers Y., Thévis A.*: Anim. Feed Sci. Technol. 29, 45, 1990.
28. *Liener I. E.*: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34, 31, 1994.
29. *Liener I. E., Kakade M.*: W: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, I. E. Liener (red.). Academic Press, New York, 1980, s. 7.
30. *Li Z., Alli I., Kermasha S.*: Food Res. Internat. 26, 195, 1993.
31. *Lipiec A., Pisarski R. K.*: Medycyna Wet. 50, 152, 1994.
32. *Lu L., Louie D. S., Owayang C.*: Amer. J. Physiol. 256 (Gastrointest. Liver Physiol. 19), G430, 1989.
33. *McArthur C., Robbinson C. T., Hagerman A. E., Hanley T. A.*: Can. J. Zool. 71, 2236, 1993.
34. *Marty B. J., Chavez E. R.*: Can. J. Anim. Sci. 73, 411, 1993.
35. *Messina J., Messina V.*: J. Amer. Diet. Ass. 91, 836, 1991.
36. *Miyasaka K., Guan D., Liddle R. A., Green G. M.*: Am. J. Physiol. 257 (Gastrointest. Liver Physiol. 20), G175, 1989.
37. *Mole S., Butler L. G., Iason G.*: Biochem. Systematics Ecol. 4, 287, 1990.
38. *Moran E. T., Summers J. D., Jones G. E.*: Can. J. Anim. Sci. 48, 47, 1968.
39. *Mulimani V. H., Paramjyothi S.*: J. Food Sci. Technol. 30, 62, 1993.
40. *Nitsan Z.*: W: Eggum B. O., Boisen S., Borting C., Danfaer A., Hvelplund T. (red.): Protein Metabolism and Nutrition. Proc. 6th Int. Symp. EAAP. Herning, Denmark 9-14 June, 1991, s. 103.
41. *Otani T., Atomi Y., Kuroda A., Muto T., Tamura M., Fukuda S., Akao S., Gorelick F. S.*: Pancreas 14, 142, 1997.
42. *Pastuszewska B., Ochtafińska A., Grala W.*: J. Anim. Feed Sci. 2, 147, 1993.
43. *Puls W., Keup G.*: Diabetologia 9, 97, 1973.
44. *Pusztai A., Grant G., Bardocz S., Baitner K., Gelenczar E., Ewen S. W. B.*: Am. J. Physiol. Gastrointestinal Liver Physiol. 35, G340, 1997.
45. *Pusztai A., Grant G., Duguid T., Brown D. S., Peumans W. J., Van Damme J. M., Bardocz S.*: J. Nutr. 125, 1554, 1995.
46. *Quesada C., Bartolomé B., Nieto O., Gómez-Cordovés C., Hernández T., Estrella I.*: J. Food Prot. 59, 185, 1996.
47. *Rackis J. J., Gumbmann M. R.*: W: Antinutrients and Natural Toxicants in Foods. Ory R. L., (red.), Food and Nutr. Press, Westport, Ct, 1982, s. 54.
48. *Savelkoul F. H. M. G., Van der Poel A. F. B., Tamminga S.*: Plant Foods Human Nutr. 42, 71, 1992.
49. *Silanikove N., Gilboa N., Nitsan Z., Perevolotsky A.*: J. Agric. Food Chem. 44, 199, 1996.
50. *Silanikove N., Gilboa N., Perevolotsky A., Nitsan Z.*: Small Ruminant Res. 21, 195, 1996.
51. *Silanikove N., Nitsan Z., Perevolotsky A.*: J. Agric. Food Chem. 42, 2844, 1994.
52. *Suzuki K., Ishimoto M., Iwanaga M., Kikuchi F.*: Theor. Appl. Genet. 90, 762, 1995.
53. *Tamir S., Bell J., Finlay T. H., Birk Y.*: Proc. Fifth Symp. Protein Soc., Herring, 1991, s. 64.
54. *Täufel A., Böhm H., Flamme W.*: J. Cereal Sci. 25, 267, 1997.
55. *Thompson L. U.*: Food Res. Internat. 26, 131, 1993.
56. *Troll W., Lim J. S., Frankel K.*: W: Ho C.-T., Osawa T., Huang M.-T., Rosen R. T. (red.): Food Phytochemicals for Cancer Prevention. II. Teas, Spices, and Herbs. Am. Chem. Soc., Washington DC, 1994, s. 116.
57. *Veterimani R., Jyothirmayi N., Haridas Rao P., Ramadoss C. S.*: Lebensm.-Wiss. Technol. 25, 532, 1992.
58. *Visentin M., Iori R., Valdicelli L., Palmieri S.*: Phytochemistry 31, 3677, 1992.
59. *Weidenbach H., Pritz H., Goke B., Koop I., Schafmayer A., Adler G.*: Res. Exp. Med. 189, 221, 1989.
60. *Zhao M., Naude R. J., Muramoto K., Oelofsen W.*: Int. J. Peptide Protein Res. 48, 174, 1996.