

BIALKOWE INHIBITORY α -AMYLAZY ZIARNIAKÓW ZBÓŻ

Endogenous Alpha-amylase Proteinaceous Inhibitors from Cereal Seeds

Janina ANDRZEJCZUK-HYBEL

Summary. Cereal grain contains proteins with inhibitory activity against α -amylases. The inhibitors from barley (BASI) and wheat (WASI), which are specific for endogenous α -amylase and for subtilisine, were isolated and well characterized. These proteins have Mr–20000 Da and pI–7.2. The amino acid composition and sequence show, that those inhibitors are homologous with the soyabean trypsin inhibitor (Kunitz) family. These inhibitors are active only against α -amylase of the high-pI isoenzyme group. There are indicators that ABA is promoting the synthesis of those proteins. An endogenous α -amylase inhibitor from cereal seeds has recently gained much attention due to its possible negative effect on the activity during grain maturation, germination and sprouting.

Key words. proteinaceous inhibitor, α -amylase, cereal seeds.

Dr Janina Andrzejczuk-Hybel, Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 02–528 Warszawa, ul. Rakowiecka 26/30

WSTĘP

W procesie kiełkowania ziarna zbóż, w jego warstwie aleuronowej syntetyzowane są liczne enzymy hydrolityczne, które następnie są wydzielane do endospermu w celu uruchomienia zgromadzonych tam materiałów zapasowych dla rozwijającego się zarodka. Jednym z tych enzymów jest α -amylaza o nazwie systematycznej 4-glukanohydrolaza α -1,4-glukanu (E. C.3.2.1.1.), która rozkłada skrobię endospermu.

α -amylazy ziarna zbóż dzielone są w zależności od ich punktu izoelektrycznego (pI) na dwie grupy izoenzymatyczne. Pierwsza grupa to α -amylazy o niskiej wartości pI w granicach 4.2–5.5, w literaturze oznaczane symbolem α -I lub LP (low pI), lub wcześniej „zielone” α -amylazy [1, 11, 26]. Enzymy tej grupy w procesie kiełkowania ziarna są syntetyzowane *de novo* w małej ilości, natomiast głównie pojawiają się one we wczesnej fazie wykształcania się ziar-

niaków i tylko w niewielkiej ilości występują w ziarnach w stanie spoczynku. Druga grupa to α -amylazy o wysokiej wartości pI w granicach 5.5–7.0, o symbolu α -II lub HP (high pI), lub wcześniej „słodowe” α -amylazy [11, 17, 27, 40]. Enzymy tej grupy są syntetyzowane *de novo* głównie w procesie kiełkowania i przedźniwnego porostania ziarna zbóż [17, 44]. Grupa HP izoenzymów α -amylazy występuje w ziarnach w stanie spoczynku, gdyż jest syntetyzowana *de novo* w małej ilości w późnej fazie ich wykształcania [11, 44]. Dla ziarna pszenicy wyróżnia się ponadto grupę izoform α -amylazy o wartości pI powyżej 10, oznaczone symbolem α -III lub VHP (very high pI) [11]. Enzymy tej grupy pojawiają się w I-ej fazie wykształcania się ziórnaków pszenicy, a następnie zanikają i nie stwierdzono ich obecności w ziarnie w stanie spoczynku [11].

Synteza grupy izoenzymów α -amylazy II (HP) jest regulowana przez substancje wzrosto-

we w dojrzalej warstwie aleuronowej [11, 15, 26, 27]. Kwas giberelinowy (GA) stymuluje, a kwas abscysynowy (ABA) hamuje syntezę tych enzymów, natomiast regulacja ich aktywności w ziarnie może zachodzić, między innymi, z udziałem specyficznych inhibitorów.

Znanych jest wiele związków występujących w roślinach zdolnych do hamowania aktywności α -amylazy. Do takich związków zalicza się kwas abscysynowy (ABA) [22], kwas mezoinozytylo-heksafluorowy (MHP) [64], jony Zn^{2+} [32], produkty działania α -amylazy na skrobię [2] oraz niektóre białka [2, 8, 13, 38, 55, 57].

Ziarna zbóż zawierają dużą grupę białek mających zdolność hamowania aktywności α -amylazy [2, 8, 12, 55, 57, 71]. Większość z tych zidentyfikowanych białek nie hamuje amylaz własnych, lecz tylko amylazy zwierzęce, głównie ssaków i owadów. Tę grupę białek mających zdolność hamowania aktywności tylko amylaz egzogennych wyizolowano z ziarna pszenicy, oczyszczono i dobrze scharakteryzowano [12, 66, 74]. Obszerne wiadomości na temat białkowych inhibitorów amylaz egzogennych ziarna zbóż zebrane są w licznych artykułach przeglądowych [2, 12, 66, 74].

Badania nad białkowymi inhibitorami endogennej α -amylazy ziarna zbóż zapoczątkował Warchalewski [71], który w ziarnie pszenicy słodowej wykrył trzy termostabilne białka hamujące aktywność α -amylazy z tej pszenicy. Dotychczas wyizolowano i dobrze scharakteryzowano takie białka z ziarna jęczmienia [45, 46, 60, 67, 75, 76, 83], pszenicy [19, 48, 52, 65, 67], pszenżyta [4, 58, 76], częściowo także z ziarna żyta [16, 18, 48, 49, 68], kukurydzy [7, 31], prosa [9, 10], owsa [78] i ryżu [34, 56]. Także rośliny dwuliścienne zawierają tego typu białka [33, 39, 40, 59, 65].

Rola fizjologiczna tej grupy białek ziarna zbóż nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Przypuszcza się, że mają one swój znaczący udział w regulacji procesu kiełkowania i dojrzewania ziarna [17, 27, 66, 68, 78], oraz mogą działać jako czynnik ochronny przed mikrobiologicznym rozkładem kiełkującego ziarna, gdyż są zdolne do równoczesnego hamowania aktywności proteaz bakteryjnych [9, 16, 21, 53,

54, 56, 81]. Ponadto istnieją nieliczne dane w literaturze wskazujące, że białka te mogą stanowić jeden z czynników zwiększających tolerancję roślin zbożowych na stres wodny i inne rodzaje stresów [28, 61, 62].

Białkowym inhibitorom α -amylazy ziarna zbóż poświęca się ostatnio dużo uwagi ze względu na możliwą znaczącą ich rolę w odporności poszczególnych odmian na proces porostania przedżniwnego [4, 16, 17, 49, 65], a także możliwość ich technologicznego zastosowania [50, 66, 79, 80, 82].

WYSTĘPOWANIE, STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKOWYCH INHIBITORÓW α -AMYLAZY ROŚLIN ZBOŻOWYCH

Białkowe inhibitory endogennych amylaz wykryto w ziarnie wszystkich znanych rodzajów zbóż [66]. Dotychczas wyizolowano, oczyszczono i dobrze poznano budowę i własności tych białek z ziarna jęczmienia [20, 21, 26, 67, 76], pszenicy [46, 53, 72, 73] i pszenżyta [81, 83]. Wykaz podstawowych cech struktury i właściwości fizyko-chemicznych tych białek zebrano w tabeli 1.

Wszystkie te poznane dotychczas białka są bifunkcyjne, to znaczy hamują działanie α -amylazy-endogennej i z ziarna innych zbóż, oraz proteazę-bakteryjną subtylizynę (E. C.3.4.21.14). Wszystkie one mają dość znaczną termostabilność (Tabela 1) i w przeciwieństwie do inhibitorów α -amylazy egzogennej nie zawierają reszty cukrowej w swojej budowie. Te najbardziej poznane inhibitory wyizolowane z ziarna jęczmienia (BASI), pszenicy (WASI) oraz inhibitor z pszenżyta odmiany Carman (TASI) mają masę cząsteczkową 20000 Daltonów. Dla inhibitorów BASI i WASI ustalono skład i sekwencję aminokwasową [21, 46]. Okazało się, że białka te mają zbliżony skład aminokwasowy (Tabela 2). W ich składzie jest wysoka zawartość aminokwasów hydrofobowych – glicyny, alaniny, proliny, waliny i leucyny, a także wysoka zawartość glutaminy, asparaginy i argininy. Białka te wykazują wysoką homologię sekwencji aminokwasów między sobą [67] i tylko częściową homologię z białkami inhibitorów amylaz egzo-

Tabela 1. Wykaz podstawowych cech struktury i właściwości białkowych inhibitorów endogennej α -amylazy.
 Table 1. Physicochemical properties of endoflaneous α -amylase proteinaceous inhibitors from cereal seeds

Symbol	BASI [barley amylase subtilisine inhibitor]	WASI [wheat amylase subtilisine inhibitor]	AT-WI [amylase trypsin wheat inhibitor]	TASI [triticale amylase subtilisine inhibitor]PAPI	PAPI [probable amylase protease inhibitor],
Literatura	(41, 55, 60, 65)	(46, 53)	(72, 73)	(81)	(52, 54),
Źródło	jęczmień	pszenica	pszenica	pszenżyto cv. Carman	ziarno jęczmienia-warstwa aleuronowa,
Specyficzność	bifunkcyjny (double headed)	bifunkcyjny	bifunkcyjny	bifunkcyjny	bifunkcyjny,
Ciężar cząsteczkowy	20500	20000	23300 lub 10800 i 11500	20000	10000,
Ilość wiązań S-S	2	2	nb	nb	nb
pI punkt izoelektryczny	7.2–7.3	7.2	7.3	1. 7.25 2.6.95	–
Termostabilność	70°15' – traci 60% aktywności 100°15' – traci całą aktywność	jak BASI	70°15' – traci 10% aktywności 100°10' – traci całą aktywność	jak BASI	–

Tabela 2. Skład aminokwasowy.
Table 2. Amino acid composition.

Inhibitor	BASI	WASI
Aminokwas	Ilość reszt	
Asparagina	17.3	19.1
Treonina	8.7	7.0
Seryna	9.9	9.5
Glutamina	15.7	15.4
Prolina	15.3	15.9
Metionina	2.2	2.0
Glicyna	20.7	20.6
Alanina	16.8	17.1
Walina	13.1	14.7
Izoleucyna	7.0	7.1
Leucyna	12.2	11.9
Tyrozyna	6.6	6.0
Fenylalanina	7.1	6.7
Histydyna	9.4	7.7
Lizyna	6.8	6.2
Arginina	11.9	13.9
Cysteina	4.2	4.1
Tryptofan	3.0	2.9

gennych [21, 46], a wysoką homologię sekwencji i struktury II-rzędowej z roślinnymi białkowymi inhibitorami proteaz z rodziny inhibitorów trypsyny typu Kunitza, wyizolowanych z soji [37]. Maeda [46] ustalił, że inhibitory BASI i WASI mają między sobą 31%, a z inhibitorami proteazy 29% homologii sekwencji. Oba te najlepiej przebadane inhibitory amylaz endogennych mają w swojej strukturze II-rzędowej około 57% α -struktury i około 3% β -heliksu, natomiast inhibitory trypsyny typu Kunitza mają także około 60% β -struktury i nie posiadają struktury α -heliksu [37]. Na podstawie znacznej homologii sekwencji aminokwasowej i struktury II-rzędowej wnioskuje się, że białka ziarna mające zdolność hamowania α -amylaz endogennych i sojowe białka mające zdolność hamowa-

nia proteaz mają wspólne pochodzenie ewolucyjne. Prawdopodobnie były to białka zapasowe, które w procesie ewolucji wyspecjalizowały się w kierunku dwóch różnych funkcji, przeciwko dwóm typom hydrolaz α -amylazom i proteazom. Te białka występujące w nasionach soji (inhibitor trypsyny typu Kunitza), gdzie materiałem zapasowym są tłuszcze, zatraciły swoją zdolność hamowania aktywności amylaz [46].

Inhibitory endogennej α -amylazy ziarna zbóż wydają się być białkami polimorficznymi, co stwierdzono dla tych wyizolowanych z ziarna pszenicy [57], z jęczmienia [26, 63] oraz żyta [47]. Jednakże wielorakie formy inhibitora endogennych amylaz zbożowych zostały wyizolowane i scharakteryzowane tylko z ziarna pszenżyta odmiany Carman [82].

LOKALIZACJA W ZIARNIE, SYNTEZA I REGULACJA

Dotychczas poznane białkowe inhibitory α -amylazy ziarna zbóż występują głównie na terenie endospermu ziarniaków oraz w niewielkiej ilości w warstwie aleuronowej i w zarodku [41, 50, 76, 81]. W wielu pracach wykazano, że białka te są rozproszone na terenie całego endospermu i razem z innymi białkami zapasowymi stanowią otoczkę ziarenek skrobiowych [41, 50, 52, 76]. Wyjątek stanowi białko PAPI (Tabela 1), którego występowanie stwierdzono wyłącznie w warstwie aleuronowej ziarna pszenicy [54]. Dla ziarna pszenicy i pszenżyta wyliczono, że białko inhibitora stanowi około 0,35% całego białka ziarna, podczas gdy w ziarnie jęczmienia białko to może stanowić około 1,3% całej jego ilości [81].

Synteza tych białek rozpoczyna się już około 8–12 dnia po zapyleniu [4, 28, 56, 60], podobnie jak to wykazano dla białek inhibitorów amylaz egzogennych [2]. Maksimum nagromadzenia się tego białka przypada około 35 dnia rozwoju ziarniaka [4, 43, 56, 60], kiedy to jest szczytowy moment nagromadzenia się wszystkich białek zapasowych ziarniaka zbóż [60, 66, 78]. mRNA kodujący białko inhibitora jest wykrywalny już w 4-tym dniu po zapyleniu, a maksymalny jego poziom stwierdzono pomiędzy 13 a 18 dniem od zapylenia [41]. Nie stwierdza się obecności tego mRNA w ziarnie dojrzałym w stanie spoczynku i w ziarnie kiełkującym [41].

W procesie kiełkowania ziarna obserwuje się stopniowy spadek zawartej w nim aktywności antyamylolytycznej, związany prawdopodobnie z proteolityczną degradacją białka inhibitora [43, 66, 74], lub też na skutek wiązania się tego białka z syntetyzowaną *de novo* α -amylazą [41].

Istnieje pogląd, że synteza białka inhibitora endogennej α -amylazy jest regulowana przez kwas abscysynowy [62], znany inhibitor procesu kiełkowania i syntezy α -amylazy [36, 84]. Proces syntezy białka inhibitora w ziarnie jęczmienia badali: Hill i współpracownicy [28], Mundy [51] oraz Robertson i współpracownicy [61, 62]. W wykształcającym się ziarnie tego zboża stwierdzali oni dodatnią korelację pomię-

dzy poziomem białka inhibitora i poziomem ABA. Maksimum nagromadzenia się białka inhibitora obserwowano w IV-ej fazie rozwoju ziarniaka, w której także stwierdzano maksymalny poziom kwasu abscysynowego [61]. Wykazano także wpływ egzogennej ABA na syntezę tych białek w ziarnie jęczmienia [62]. W kiełkujących 21-dniowych ziarnach jęczmienia, umieszczonych w 10 μ M roztworze ABA obserwowano 9-krotny wzrost poziomu białka inhibitora i całkowite zahamowanie kiełkowania w stosunku do prób nasion nie traktowanych ABA. Podobną indukcję syntezy białka inhibitora stwierdzono na wyizolowanych zarodkach hodowanych w środowisku z ABA [62]. Jedynie inhibitor o symbolu PAPI okazał się nieindukowalny za pomocą ABA i uznano go za białko konstytucyjne dla warstwy aleuronowej ziarna pszenicy [54].

Robertson i Hill [28, 62] sugerują, że białko inhibitora amylaz, którego synteza jest regulowana z udziałem ABA jest jednym z wielu białek syntetyzowanych w roślinie w odpowiedzi na stres wodny. Wpływ stresu wodnego badano na 21-dniowych zarodkach, oraz na młodych siewkach jęczmienia. W 2-dniowych siewkach jęczmienia, poddanych stresowi odwodnienia w ciągu 5-ciu dni obserwowano 80-krotny wzrost poziomu ABA i ponad 20-krotny wzrost zawartości białka inhibitora BASI, w porównaniu z siewkami kontrolnymi [62]. Proces ten był odwracalny, gdyż po ponownym uwodnieniu następował szybki spadek zawartości białka inhibitora i powolniejszy spadek poziomu ABA. *De novo* syntetyzowane w tych warunkach białko inhibitora zlokalizowane było głównie na terenie zarodka, a tylko małe jego ilości na terenie korzenia i pozostałej części siewki, co dowodzi że miejscem syntezy tego białka jest zarodek.

Autorzy tych nielicznych prac zastanawiają się czy białka inhibitorów endogennych amylaz zaliczyć można do czynników współdziałających z ABA w pogłębianiu stanu spoczynku ziarna, czy też są to typowe białka stresowe i funkcjonują jako jeden z wielu czynników zwiększających tolerancję roślin zbożowych na stresy. Nie tylko na stres wodny, ale także na inne stresy, które jak wykazano w licznych pracach,

wyrażają się między innymi wzrostem poziomu ABA w roślinie [5, 35].

INTERAKCJA INHIBITOR-ENZYM

Jak wspomniano we wstępie, białkowe inhibitory amylaz zbożowych hamują tylko α -amylazy z grupy o wysokiej wartości punktu izoelektrycznego (α_{II} lub HP), czyli te syntetyzowane *de novo* głównie w czasie kiełkowania i przedzmiwnego porastania ziarna. Dotychczas nie stwierdzono ich oddziaływania na α -amylazy pozostałych grup [20, 21, 26, 54, 48]. Ponadto te dobrze poznane inhibitory BASI i WASI hamują α -amylazy własne i tylko innych zbóż z rodziny *Graminae* podrodziny *Festucoideae*, nie hamują α -amylaz z ziarna sorga, prosa i ryżu (podrodzina *Penicoideae*) [53, 56].

Wszystkie dotychczas poznane białkowe inhibitory ziarna zbóż są bifunkcyjne, czyli hamują dwa różne enzymy hydrolityczne, bo obok α -amylazy także proteinazy: subtylizynę lub trypsynę (Tabela 1). Wykazano, że aktywność α -amylazy jest hamowana niezależnie od hamowania subtylizyny [55, 81] lub trypsyny [74] i odwrotnie: dodanie α -amylazy nie ograniczało hamowania proteinazy [55, 74, 81]. Wnioskuje się, że białka te posiadają w swojej cząsteczce oddzielne miejsca wiązań dla każdego rodzaju enzymu [55, 81]. Niewiele wiadomo jeszcze o sposobie wiązania się białka inhibitora z białkiem enzymu. Wykazano, że białka te funkcjonują jako dimery – tworzą kompleks inhibitor-enzym w stosunku molarnym 2:1 (dwie cząsteczki inhibitora wiążą jedną cząsteczkę enzymu) [6, 53, 55, 74, 81]. Niewiele wiadomo o grupach funkcyjnych, którymi inhibitor wiąże się z enzymem. Ustalono, że optimum inhibicji występuje przy wartości pH 7.0–8.0, a więc znacznie powyżej pH optymalnego dla działania α -amylaz dla których przyjmuje się wartość w granicach 5.3–5.5 [1, 27, 43]. Robertson [62] wykazał, że inhibitor BASI wiąże α -amylazę 7-krotnie słabiej w pH 5.5 niż w pH 8.0. Podobnie zdolność inhibitora do wiązania się z enzymem spadała przy wzroście siły jonowej buforu. 15-krotny wzrost stężenia soli redukuje wiązanie inhibitora z enzymem 50-krotnie [61, 62]. Na tej podsta-

wie przypuszcza się, że interakcja inhibitor-enzym oparta jest w dużym stopniu na wiązaniach jonowych. Haleyko i wsp. [20] stosując metody spektroskopii różnicowej, miareczkowania fluorescencyjnego oraz selektywnego utleniania reszt tryptofanu za pomocą NBS (N-Bromosuccinimid) ustalili, że w tworzeniu kompleksu inhibitor-enzym bierze udział jedna reszta tryptofanu należąca do enzymu.

Sposób oddziaływania pomiędzy białkiem inhibitora i białkiem enzymu badano także na podstawie produktów hydrolizy substratu w mieszaninie reakcyjnej α -amylazy z inhibitorem metodą HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) [45]. Wykazano, że białko inhibitora wiąże się lub oddziałuje z miejscem w białku α -amylazy, którym ta łączy się z substratem [30], a nie z miejscem katalitycznym (które bierze udział bezpośredni w rozrywaniu wiązania α -1,4-glikozydowego w substracie) i w ten sposób hamuje działanie enzymu [6].

Podobnie w oddziaływaniu α -amylazy na surowe ziarna skrobi wykazano w mikroskopie skaningowym, że zarówno wobec inhibitora jak i bez inhibitora działanie enzymu na skrobię było głębokie [45]. Fakt ten oznacza, że inhibitor nie zmienia sposobu hydrolizy substratu, lecz tylko zwalnia jej szybkość. Zaobserwowano, że α -amylaza była efektywniej hamowana kiedy substratem dla niej były całe ziarna skrobi, niż w przypadku gdy substratem była amyloza. Hamowanie działania na ziarna skrobi było niezależne od ich stężenia, co pozwala wnioskować, że takie hamowanie ma miejsce *in vivo* w endosprzmie ziarniaków zbóż [45, 66].

ROLA FIZJOLOGICZNA

Białkowe inhibitory endogennej α -amylazy występują głównie na terenie endospermu ziarniaków i wydają się być ściśle zasocjowane z gromadzoną tu skrobią [41, 66], podobnie jak białkowe inhibitory amylaz egzogennych [2]. Zdolność do asocjacji tych białek ze skrobią potwierdzono w badaniach *in vivo* metodą immunofluorescencyjną [2], oraz w wielu badaniach *in vitro*, w których to obserwowano tworzenie się nie tylko kompleksu inhibitor-enzym,

lecz także inhibitor-substrat [45, 81]. Obserwacje te wskazują, że rola inhibitora w procesie rozkładu skrobi endospermu może polegać nie tylko na hamowaniu aktywności α -amylazy, lecz także przez osłonę dostępu substratu dla tego enzymu [45]. Przy badaniu interakcji inhibitor-enzym wyższe powinowactwo inhibitora do enzymu stwierdzono w przypadku gdy substratem były ziarna skrobi niż, gdy substratem była amyloza [45], co wskazuje, że hamowanie α -amylazy może mieć miejsce *in vivo* w endospermie, gdzie głównym jego substratem są ziarna skrobiowe.

W badaniach *in vitro* dobrze udowodniono, że białka te hamują tylko aktywność α -amylazy II, czyli tej izoformy, która jest syntetyzowana głównie w procesie kiełkowania i przedźniwne go porastania ziarna [15, 17, 44]. Występowanie tego białka wykazano tylko w tych częściach anatomicznych ziarna, gdzie stwierdza się obecność α -amylazy II, co wskazuje na możliwość jego oddziaływania z tym enzymem także *in vivo*. Nie stwierdzono dotychczas występowania białka inhibitora w częściach wegetatywnych roślin zbożowych, gdzie nie stwierdza się również występowania α -amylazy II [41].

Indukcja syntezy białka inhibitora przez ABA, który jest znanym inhibitorem kiełkowania i syntezy α -amylazy, wskazuje na udział tego białka w redukcji procesów metabolicznych związanych z kiełkowaniem.

W świetle przedstawionych tu wyników badań wydaje się, że białkowe inhibitory amylaz zbożowych można zaliczyć do czynników regulujących funkcję tej izoenzymatycznej formy α -amylazy, która ma zasadnicze znaczenie w uruchamianiu materiału zapasowego ziarna. Bifunkcyjny charakter tych białek, wyrażający się zdolnością do hamowania także proteaz bakteryjnych i trypsiny, wskazuje na ich funkcję ochronną przed atakiem drobnoustrojów podczas kiełkowania i przedźniwne go porastania, kiedy to przez otwarte pory w okrywie owocowo-nasiennej możliwość ich przenikania jest znacznie ułatwiona. Przypuszcza się także, że białka te mogą mieć swój udział w regulacji procesu wykształcania się ziarenek skrobi w wykształcającym się ziarnie,

choć nie ma tu jeszcze dostatecznych dowodów [65].

ZASTOSOWANIE

Porastanie przedźniwne jest głównym problemem w produkcji żyta, pszenicy i pszenżyta w klimacie umiarkowanym, ponieważ skrobia zapasowa ziarna ulega znacznej degradacji na skutek działania α -amylazy syntetyzowanej w tym procesie. Porośnięte ziarno ma obniżoną zdolność kiełkowania, a mąka otrzymana z takiego ziarna ma obniżoną wartość technologiczną.

Wydaje się, że zgromadzona dotychczas wiedza o białkowych inhibitorach α -amylazy ziarna zbóż może mieć zastosowanie w pracach hodowlanych nad selekcją odmian żyta, pszenicy i pszenżyta odpornych na porastanie. Wyniki niektórych badań wskazują, że odmiany odporne na porastanie charakteryzują się wyższą zawartością białka inhibitora obok niższej zawartości α -amylazy w ziarnie w stosunku do odmian wrażliwych [3, 4, 16, 49, 68]. Zdaniem niektórych autorów [49] odmiana odporna na porastanie powinna charakteryzować się, między innymi, genetycznie uwarunkowaną wysoką zdolnością do syntezy białka inhibitora, a niską zdolnością do syntezy α -amylazy. W tym celu Henry i wsp. [25] dokonali już pierwszych prób przeniesienia genu kodującego białko inhibitora z ziarna jęczmienia do ziarna pszenicy i uzyskali pozytywne rezultaty.

Ponadto sugeruje się zastosowanie białkowego inhibitora α -amylazy w przemyśle piekarskim do hamowania aktywności tego enzymu w mąkach z porośniętego ziarna pszenicy [79, 80, 82]. Jak wiadomo, główną cechą dyskwalifikującą porośnięte ziarno pszenicy do zastosowania w przemyśle piekarskim jest wysoka aktywność α -amylazy. Inne cechy takiego ziarna są często korzystniejsze, według Lemara i Swensona [42] porośnięte ziarno pszenicy zawiera znacznie więcej aminokwasu egzogenne go lizyny, niż ziarno nie porośnięte. Przebadano wiele czynników fizyko-chemicznych powodujących inaktywację α -amylazy w porośniętym ziarnie [13]. Żaden z badanych czynników nie

okazał się dobry, gdyż albo był toksyczny dla człowieka, albo zmieniał strukturę białek glutenowych ziarna na technologicznie niekorzystną. Taki białkowy inhibitor wyizolowany z ziarna zbóż wydaje się być w tym celu czynnikiem odpowiednim, gdyż działa specyficznie, nie oddziałuje na strukturę glutenu i dodatkowo wzbogaca swoim białkiem, gdyż jest trawiony przez enzymy proteolityczne przewodu pokarmowego. Jak wyżej wspomniano ziarno jęczmienia zawiera tego białka znacznie więcej niż ziarna innych zbóż i dlatego sugeruje się wykorzystanie go jako źródła inhibitora do celów technologicznych [19, 23, 24, 80, 82].

Artykuł napisano w ramach tematu KBN Nr 0185/S3/92/02

LITERATURA

- [1] AJANDOUZ E. H., ABE J. I., SVENSSON B., MARCHIS-MOLLEN G., 1992. Barley malt α -amylase: Purification, action pattern and subsite mapping of isoenzyme 1 and two members of the isoenzyme 2 subfamily using p-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1156**(2): 193–202.
- [2] ANDRZEJCZUK-HYBEL J., 1981. Plant and microbial inhibitors of amylolytic enzymes. *Post. Biochem.* **27**: 181.
- [3] ANDRZEJCZUK-HYBEL J., BIELAWSKI W., KACZKOWSKI J., 1993. Reducing sugar and amylase changes during germination of *Triticale* varieties resistant and susceptible to preharvest sprouting. *Acta Physiol. Plant.* **15** (3): 193–198.
- [4] ANDRZEJCZUK-HYBEL J., BARTOSZEWICZ K., BIELAWSKI W., KACZKOWSKI J., 1994. Changes of activity of some hydrolase during *Triticale* grain development differentiated in pre-harvest sprouting resistance. *Acta Physiol. Plant.* **16**(4): 279–284.
- [5] BANDURSKA H., 1991. Akumulacja wolnej proliny jako przejaw metabolizmu reakcji roślin na działanie stresu wodnego. *Wiad. Bot.* **35** (1): 35–46.
- [6] BATTERSHELL V. G., HENRY R. J., 1990. High-performance liquid chromatography of α -amylases from germinating wheat and complexes with the α -amylase inhibitor from barley. *J. Cereal Sci.* **12**: 73–81.
- [7] BLANCO-LABRA A., ITURBE-CHINAS F. A., 1981. Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.* **5**: 1.
- [8] BUONOCORE V., PETRUCCI T. and SILANO V., 1976. Wheat protein inhibitors of α -amylase. *Phytochemistry* **16**: 811.
- [9] CAMPOS F. A. P., RICHARDSON M., 1983. The complete amino acid sequence of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet, *Elusine coracana* G.). *FEBS Lett.* **152**: 300.
- [10] CAMPOS F. A. P., RICHARDSON M., 1984. The complete amino acid sequence of the α -amylase inhibitor I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, *Elusine coracana* G.). *FEBS Lett.* **167**: 221.
- [11] DAUSSANT J., RENARD H. A., 1987. Development of different α -amylase isoenzymes having high and low isoelectric points during early stages of kernel development in wheat. *J. Cereal Sci.* **5**: 13–21.
- [12] DEPONTE R., PARLAMENTI R., PETRUCCI T., SILVANO V., TOMASI M., 1976. Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. *Cereal Chem.* **53**: 805–810.
- [13] DORFER J., KOBALL G., 1980. Untersuchungen zur Inhibierung der Alpha-Amylase durch ausgewählte anorganische und organische Substanzen. *Baeker und Konditor* **2**: 58.
- [14] DOJCZEW D., ANDRZEJCZUK-HYBEL J., KACZKOWSKI J., 1986. The protein inhibitors of amylases and peptidases isolated from cereal grains. *Die Naehrung* **30**: 275–279.
- [15] FINCHER B. G., 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Am. Rev. Plant Molec. Biol.* **40**: 305–346.
- [16] GABOR R., TAEUFEL A., BEHNKE U., HECKEL J., 1991. Studies on the germination specific α -amylase and its inhibitor of rye (*Secale cereale*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **192**: 230–233.
- [17] GALE M. D., FLINTHAM J. E., ARTHUR E. D., 1983. Alpha amylase production in the late stages of grain development – an easily sprouting damage risk period? W: KRUGER J. E. and LA BERGE D. E. (red.) *Third Int. Symp. on Preharvest Sprouting in Cereals*. ss. 29–35.
- [18] GRANUM P. E., 1987. Purification and characterization of α -amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*) flour. *J. Food Biochem.* **2**: 103.
- [19] GRANUM P. E., ESKELAND B., 1981. Nutritional significance of α -amylase inhibitors from wheat. *Nutr. Rep. Int.* **23**: 155.
- [20] HALEYKO A. J., HILL R. D., SVENSON B., 1986. Characterization of the interaction of barley α -amylase II with an endogenous α -amylase inhibitor from barley kernels. *Biochim. Biophys. Acta* **873**: 92–101.
- [21] HEJGAARD J., SVEDSEN J., MUNDY J., 1983. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor II. N-terminal amino acid sequence and homology with inhibitors of the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family. *Carlsberg Res. Commun.* **48**: 51.
- [22] HEMBERG T., 1967. Subtilisin II as an inhibitor of α -amylase. *Acta Chem. Scand.* **21**: 1665.
- [23] HENRY R. J., BATTERSHELL V. G., BRENNAN P. S., OONO K., 1992. Control of wheat α -amylase using inhibitors from cereals. *J. Sci. Food Agric.* **58**: 281–284.
- [24] HENRY R. J., BLAKENEY A. B., 1990. Post-harvest management of alpha-amylase. *Aspect App. Biol.* **25**: 387–393.
- [25] HENRY R. J., MCKINNON G. E., HAAK J. C., BRENNAN S., 1992. Use of α -amylase inhibitors to control sprouting. W: WALKER-SIMMONS, M., RIED J. C. (red.), *Preharvest Sprouting in Cereals*. ss. 232–235.
- [26] HENSON C. A., STONE J. M., 1988. Variation in α -amy-

- lase and α -amylase inhibitor activities in barley malts. *J. Cereal Sci.* **8**: 39–46.
- [27] HILL R. D., MACGREGOR A. W., 1988. Cereal – amylases in grain research and technology. *Adv. Cereal Sci. Technol.* **9**: 217–261.
- [28] HILL R. D., WALKER-SIMMONDS M., ROBERTSON M., 1990. Effect an environment and ABA on the synthesis of alpha-amylase inhibitor in cereal grains during development and germination. W: RINGLUND K., MOSLETH D., MARES J., (red.), *Fifth International Symposium on Preharvest Sprouting in Cereals* ss. 130–138.
- [29] HUANG W. Y., TIETZ N. W., 1982. Determinations of amylase enzymes in serum by use of a selective inhibitor. *Cli. Chem.* **28**: 1525.
- [30] HUTNY J., 1979. Modele amylolyzy i topografia miejsc wiążących amylaz. *Post. Biochem.* **25**: 533–546.
- [31] HUYNH Q. K., BORGMEYER J. R., ZOBEL J. F., 1992. Isolation and characterization of 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**(1): 1–5.
- [32] IRSHAD M., GOEL M., SHARMA C. B., 1981. Effect of Zn^{2+} on plant α -amylases in vitro. *Phytochemistry* **20**(9): 2123–2126.
- [33] IRSHAD M., SHARMA C. B., 1981. Purification and properties of an α -amylase protein inhibitor from *Arachis trypogea* seeds. *Biochim. Biophys. Acta* **659**: 326.
- [34] IZUMI H., ADACHI T., FUJII N., MATSUDA T., NAKAMURA R., TANAKA K., URISU A., KUROSAWA Y., 1992. Nucleotide sequence DNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds. Homology of deduced amino acid sequence with member of the alpha-amylase/trypsin inhibitor family. *FEBS-Letters* **302**(3): 213–216.
- [35] JONES H. G., 1978. How plant respond to stress. *Nature* **271**: 610.
- [36] KING R. W., 1976. Absciscic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta* **132**: 43–51.
- [37] KOIDE T., TSUNASAWA S., IKENKA T., 1973. Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequence around the reactive site soybean trypsin inhibitors (Kunitz). *Europ. Biochem.* **32**: 404–416.
- [38] KONAREV A. V., 1982. Identification of inhibitors of own and alien α -amylase in proteins wheat. w: Peculiarities of biology and utilization of species and varieties of cultivated plants in breeding. *Bull No.1 of the Vavilov Institute of Plant Industry* **118**.
- [39] KRISHNA SHARMA K., PATTABIRAMAN T. N., 1980. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and characterization of two α -amylase inhibitors from *Colocasia antiquorum* tubers. *J. Sci. Food Agric.* **31**: 981.
- [40] KRISHNA SHARMA K., PATTABIRAMAN T. N., 1982. Purification of porcine pancreatic amylase by affinity chromatography with amylase inhibitor of *Discorea alata* immobilized in DEAE-cellulose. *Indian J. Biochem. Biophys.* **19**: 54.
- [41] LECOMMANDEUR D., LAURIERE Ch., DAUSSANT J., 1987. Alpha-amylase inhibitor in barley seeds: localization and quantification. *Plant Physiol. Biochem.* **25**(6): 711–715.
- [42] LEMAR L. E., SWANSON B. G., 1976. Nutritive value of sprouted wheat flour. *J. Food Sci.* **41**: 719.
- [43] MACGREGOR A. W., 1977. Isolation, purification and electrophoretic properties of α -amylase from melted barley. *J. Inst. Bren.* **83**: 100–103.
- [44] MACGREGOR A. W., MARCHYLO B. A., KRUGER J. E., 1988. Multiple α -amylase components in germinated cereal grains determined by isoelectric focusing and chromatofocusing. *Cereal Chem.* **65**(4): 326–333.
- [45] MACGREGOR A. W., WESELAKE R. J., HILL R. D., MORGAN J. E., 1986. Effect of an α -amylase inhibitor from barley kernels on the formation of products during the hydrolysis of amylose and starch granules by α -amylase II from melted barley. *J. Cereal Sci.* **4**: 125–132.
- [46] MAEDA K., 1986. The complete amino-acid sequence of the endogenous α -amylase inhibitor in wheat. *Biochim. Biophys. Acta* **871**: 250–256.
- [47] MASOJC P., 1991. Polymorphism of alpha-amylase from rye endosperm. *Genetica Polonica* **32**: 1–2.
- [48] MASOJC P., GALE M. D., 1990. The factor modifying α -amylase isoenzyme pattern from rye endosperm is any endogenous α -amylase inhibitor. *Hereditas* **113**: 151–155.
- [49] MASOJC P., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M., 1991. Variations of the levels of α -amylase and endogenous α -amylase inhibitor in rye and triticale grain. *Swedish J. Agric. Res.* **21**: 3–9.
- [50] MUNCK L., MUNDY J., VAAG P., 1985. Characterizations of enzyme inhibitors in barley and their tentative role in malting and brening. *Amer. Soc. Brew. Chem. J.* **43**: 35–38.
- [51] MUNDY J., 1984. Hormonal regulation of α -amylase inhibitor synthesis in germinating barley. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 439–444.
- [52] MUNDY J., HEJGAARA J., HANSEN A., HALLGREN L., JORGENSEN K. G., MUNCK L., 1986. Differential synthesis in vitro of barley alleuone and starchy endosperm proteins. *Plant Physiol.* **81**: 630–636.
- [53] MUNDY J., HEJGAARD J., SVENDSEN J., 1984. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. *FEBS* **167**(2): 210–214.
- [54] MUNDY J., ROGERS J. C., 1986. Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor in barley aluone cells: comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* **169**: 51–63.
- [55] MUNDY J., SVENDSEN J., HEJGAARD J., 1983. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor I. Isolation and characterization. *Carlsberg res. Commun.* **48**: 81–90.
- [56] OHTSUBOK J., RICHARDSON M., 1992. The amino acid sequence of 20 kDa bifunctional subtilisin/alpha-amylase inhibitor from bran of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *FEBS-Letters* **309** (1): 68–72.
- [57] PERUANSKII I. V., GABSATTAROVA B. S., 1979. Activity of natural inhibitors of α -amylase from wheat grain. *Khim. Prir. Soedin.* **5**: 742–746.
- [58] PERUANSKII A. R., GABSATTAROVA B. S., 1980. Polymorphism of natural inhibitors of wheat alpha-amylase. *Khim. Prir. Soedin.* **3**: 431–432.
- [59] PIERGIOVANNI A. R., 1992. Effect of some experimen-

- tal parameters on the activity of cowpea alpha-amylase inhibitors. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **25**(4): 321–324.
- [60] ROBERTSON M., HILL R. D., 1989. Accumulation of an endogenous alpha-amylase inhibitor in barley during grain development. *J. Cereal Science* **9**: 237–246.
- [61] ROBERTSON M., WALKER-SIMONS M., MUNRO D., HILL R. D., 1989. Induction of α -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and young seedlings by abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiol.* **91**: 415–420.
- [62] ROBERTSON M., 1990. Effect of environment and ABA on alpha-amylase/subtilisin inhibitor accumulation during kernel development and early seedlings growth in *Hordeum Vulgare* L. *Dissert. Abstr. Inter-B-Sci. and-Engin.* **6**: 125–139.
- [63] SADOWSKI J., MACGREGOR S., DAUSSANT J., 1986. Alpha-amylase inhibitor in cereals: comparison of the protein in different rye, wheat and triticall seeds by using immunoblotting. *Electrophoresis* **7**: 176–179.
- [64] SIARME Ch., GOEL M., IRSHAEL M., 1978. Myoinositol hexaphosphate as a potential inductor of α -amylases. *Phytochemistry* **17**: 201–204.
- [65] SHIVARAJ B., PATTABIRAMAN T. N., 1981. Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual α -amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* G.). *Biochem J.* **193**: 29–36.
- [66] SILANO V., 1987. α -amylase inhibitors. W: J. E. KRUGER, D. LINEBACK, C. E. STAUFFER (red.), *Enzymes and their role in cereal technology*. AACC Inc. St Paul, Minnesota. ss. 141–199.
- [67] SVENDSEN I. B., HEJGAARD J., MUNDY J., 1986. Complete amino acid sequence of the α -amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res. Commun.* **51**: 43–50.
- [68] TAEUFEL A., BEHNKE U., EMMER I., GABOR R., 1991. Studies on the germination α -amylase and its inhibitor of rye (*Secale cereale*). 2. Isolation and characterization of the inhibitor. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **192**: 234–238.
- [69] TOERROENEN A., LEISOLA M., HAORASILTE S., 1992. Inhibition of rye alpha-amylase activity by barley – amylase inhibitor. *Cereal Chem.* **69** (4): 355–358.
- [70] WALTON D. C., 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 453–489.
- [71] WARCHALEWSKI J. R., 1976. Preliminary investigation on purification of the native α -amylase inhibitors from durum wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci. Jer. Sci. Biol.* **24**: 559–563.
- [72] WARCHALEWSKI J. R., 1977. Isolation and purification of native alpha-amylase inhibitors from winter wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci. Jer. Sci. Biol.* **25**: 725–729.
- [73] WARCHALEWSKI J. R., 1977. Isolation and purification of native alpha-amylase inhibitors from malted winter wheat. *Bull. Acad. Polon. Sci. Jer. Sci. Biol.* **25**: 731–735.
- [74] WARCHALEWSKI J. R., 1983. Present day studies on cereal protein nature alpha-amylase inhibitors. *Nahrung* **27**: 103–117.
- [75] WESELAKE R. J., MACGREGOR A. W., HILL R. D., 1983. An endogenous α -amylase inhibitor in barley kernels. *Plant Physiol.* **72**: 809–812.
- [76] WESELAKE R. J., MACGREGOR W. A., HILL R. D., DUCKWORTH H. W., 1983. Purification and characteristics of an endogenous α -amylase inhibitor from barley kernels. *Plant Physiol.* **73**: 1008–1012.
- [77] WESELAKE R. J., HILL R. D., 1983. Inhibition of α -amylase catalyzed starch granule hydrolysis by cycloheptaamylose. *Cereal Chem.* **60**: 98–101.
- [78] WESELAKE R. J., MACGREGOR A. W., HILL R. D., 1985. Endogenous alpha-amylase inhibitor in various cereals. *Cereal Chem.* **62**(2): 120–123.
- [79] ZAWISTOWSKA U., LANGSTAFF J., MCVICAR L., FRIESEN A. D., 1987. Preparation and application of barley protein that inhibits alpha-amylase in sprouted wheat flour. Canadian Patent No 1206157.
- [80] ZAWISTOWSKA U., LANGSTAFF J., BUSHUK W., 1988. Improving effect of a natural α -amylase inhibitor on the baking quality of wheat flour containing malted barley flour. *J. Cereal Sci.* **8**: 207–209.
- [81] ZAWISTOWSKA U., LANGSTAFF J., FRIESEN A. D., 1989. Purification and characterization of two double-headed triticale iso-inhibitors of endogenous alpha-amylase and subtilisin. *J. Food Biochem.* **13**: 215–239.
- [82] ZAWISTOWSKA U., 1990. Alpha-amylase inhibitor. United States Patent No 4910297.
- [83] ZAWISTOWSKI J., ANSELL M., ZAWISTOWSKA U., HOWES N. K., 1992. A monoclonal antibody to endogenous alpha-amylase inhibitor of barley. *J. Cereal Sci.* **15**(1): 1–4.
- [84] ZEEVAART J. A., CREELMAN R. A., 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Molecular Biology* **39**: 439–473.