



Proteinazy trzustkowe – zróźnicowanie międzygatunkowe i wynikające z tego implikacje żywnieniowe i biotechnologiczne

Monika Żelazko¹, Józefa Chrzanowska¹, Antoni Polanowski²

¹Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

²Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Pancreatic proteinases – species diversity and the appending feeding and biotechnological implications

Summary

Pancreatic proteinases like trypsin, chymotrypsin and elastase are the main enzymes responsible for digestion of food proteins. In recent years, wide biochemical diversity and functional individualism of those enzymes in variety species have been affirmed. Abundance of catalytical forms as well as isoforms has been described for trypsin, chymotrypsin and elastase. They have been distinguished in e.g. amino acids composition, pI value or stability. Each form reveals individual biochemical feature like e.g. catalytical efficiency, substrate affinity or distinct interactions with protein inhibitors. The consequence can be both different sensitivity to antynutritional factors and variable properties of enzyme preparations obtained from pancreases.

Key words:

trypsin, chymotrypsin, elastase, activation, isoform, inhibitor.

Adres do korespondencji

Monika Żelazko,
Katedra Technologii
Surowców Zwierzęcych
i Zarządzania Jakością,
Uniwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu,
ul. Norwida 25/27,
50-375 Wrocław;
e-mail:
nikazelazko@poczta.fm

1. Wstęp

Prawidłowy rozwój zwierząt hodowlanych zależy m.in. od dobrze zbilansowanej diety i właściwego przebiegu procesu trawienia zawartych w niej składników. Pomimo podobieństwa ogólnego mechanizmu procesu trawienia u wszystkich zwierząt

wyższych, niektóre właściwości biochemiczne enzymów biorących w nim udział wykazują duże zróżnicowanie w poszczególnych gatunkach. Konsekwencją fizjologiczną tego może być np. różna podatność na czynniki antyżywniowe zawarte w paszach, a technologiczną odmienne właściwości preparatów enzymatycznych otrzymywanych z ich trzustek.

Enzymy proteolityczne odpowiedzialne za trawienie białek są syntetyzowane i gromadzone w komórkach trzustki, skąd pod wpływem impulsu nerwowego lub hormonalnego wydzielane są do dwunastnicy. Główną grupę stanowią endopeptydazy serynowe: trypsyna (EC3.4.21.4), chymotrypsyna (EC.3.4.21.1) i elastaza (EC.3.4.21.36). Enzymy te należą do klasy proteinaz serynowych, a na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej zaliczane są do rodziny chymotrypsynowej (S1) [1]. Posiadają podobne masy cząsteczkowe (23-26 kDa), optimum pH (7,0-8,0), identyczną triadę katalityczną (H57, D102, S195) oraz mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego [1-3]. Mimo tych podobieństw różnią się one specyficznością substratową [4,5]. Trypsyna hydrolizuje wiązania peptydowe utworzone przez grupę karboksylową lizyny lub argininy, chymotrypsyna utworzona przez hydrofobowe aminokwasy aromatyczne jak tyrozyna, fenyloalanina lub tryptofan, ale także alifatyczne jak leucyna czy metionina. Elastaza natomiast wykazuje specyficzność wobec aminokwasów takich jak alanina lub glicyna, choć znane są też elastazy hydrolizujące wiązania za aminokwasami aromatycznymi [1,2,4,5].

2. Biochemiczna różnorodność enzymów trzustkowych

2.1. Aktywacja i formy katalityczne enzymów trzustkowych

Enzymy proteolityczne są ekspresjonowane i gromadzone w ziarnistościach komórek trzustki w postaci zymogenów (trypsynogenu, chymotrypsynogenu i proelastazy) z N-terminalnym propeptydem różnej długości i najczęściej o nieuporządkowanej strukturze. Propeptyd utrzymuje enzym w formie nieaktywnej do czasu, aż dotrze on do miejsca swego przeznaczenia [6]. Wydzielanie enzymów z trzustki do dwunastnicy następuje m.in. w odpowiedzi na obecność pokarmu w żołądku, po około 1-2 godzin od jego spożycia, choć sekrecja na niewielkim poziomie utrzymywana jest w sposób ciągły [7]. Sok trzustkowy zawiera, obok innych enzymów, trypsynogen, chymotrypsynogen, i proelastazę trzustkową, a także zymogeny egzo-peptydazy: prokarboksypeptydazy A i B oraz wydzielniczy trzustkowy inhibitor trypsyny (PSTI) [8], który tworząc kompleks trypsyną, zapobiega przedwczesnej aktywacji pozostałych proenzymów w trzustce. Właściwa aktywacja zymogenów odbywa się w dwunastnicy i ma charakter kaskadowy. Zasadniczym etapem jest hydroliza trypsynogenu zachodząca pod wpływem zlokalizowanej w błonie śluzowej dwunastnicy enteropeptydazy (enterokinazy). Konwersja trypsynogenu do trypsyny od-

bywa się poprzez hydrolizę wiązania Lys15-Ile16 prowadzącą do odcięcia propeptydu, nazywanego także peptydem aktywującym trypsynogen TAP (ang. *trypsinogen activation peptide*) [5,6]. Enteropeptydaza rozpoznaje w propeptydzie specyficzną, wysoce konserwatywną sekwencję: -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych wykazano jednak, że w trypsynogenach niektórych gatunków reszty te są podstawione (tab. 1), mimo to proces aktywacji przebiega bez zakłóceń [11].

Tabela 1

Sekwencja aminokwasowa propeptydów trypsynogenów

Gatunek	Sekwencja aminokwasowa										Literatura
	8	9	10		11	12	13	14	15	16	
bydło (forma anionowa)	F	P	S		D	D	D	D	K	I	[11]
świnia	F	P	T		D	D	D	D	K	I	[11]
pies (forma kationowa)	T	P	T		D	D	D	D	K	I	[11]
człowiek	A	P	F		D	D	D	D	K	I	[11]
wielbłąd	V	P	I		D	D	D	D	K	I	[11]
koń	S	S	T		D	D	D	D	K	I	[11]
szczur (forma anionowa)	F	P	L		E	D	D	D	K	I	[11]
szczur (forma kationowa)	L	P	L	D	D	D	D	D	K	I	[11]
owca			V		D	D	D	D	K	I	[11]
dorsz atlantycki			F		A	E	E	D	K	I	[12]
łoś atlantycki I	F	A	T		E	D	D	D	K	I	[12]
łoś atlantycki II	F	A	T		E	D	D	D	K	I	[12]
łoś atlantycki III	P	I	D		D	E	D	D	K	I	[12]
rekin		A	P		D	D	D	D	K	I	[12]
struś (forma anionowa)	V	P	G	D	A	D	D	D	K	I	[13]

Numeracja reszt wg kolejności w chymotrypsynogenie. Zacięniowane pola wskazują na homologię do sekwencji trypsynogenu bydłowego. Reszta 16 jest pierwszą resztą w aktywnej trypsinie.

Aktywna trypsyna jako jedyny enzym trzustkowy zdolny do autoaktywacji uczestniczy następnie w aktywacji pozostałych zymogenów, w tym także dalszych cząsteczek trypsynogenu. W trakcie procesu aktywacji tworzone są różnorodne formy enzymów o zróżnicowanej stabilności, właściwościach katalitycznych i fizykochemicznych. Hydroliza wiązania Lys15 – Ile16 trypsynogenu prowadzi do powstania β -trypsyny, która następnie jest konwertowana do formy α poprzez autokatalityczne cięcia wiązania peptydowego Lys31 – Ser32. Dalsza modyfikacja poprzez hydrolizę wiązania Lys176 – Asp177 tworzy ψ – trypsynę. Wszystkie formy trypsyny są aktywne, różnią się jednak właściwościami fizycznymi, chemicznymi i katalitycznymi [14]. W trzustkach wieprzowych zidentyfikowano także ε -trypsynę, która powstaje w wyniku ograniczonej autolizy β -trypsyny w miejscach wiązań Lys60 – Ser61

oraz Lys145 – Ser146. Jest to forma trójłańcuchowa, która wykazuje obniżoną wydajność katalityczną [15].

Proces aktywacji chymotrypsynogenu zachodzi także etapowo z wytworzeniem kilku aktywnych form katalitycznych chymotrypsyny. W przypadku chymotrypsynogenu bydłęcego przejście zymogenu w pełni aktywny enzym następuje w wyniku hydrolitycznego działania trypsyny na wiązanie peptydowe Arg15–Ile16, prowadząc do usunięcia propeptydu. Powstała w wyniku tego chymotrypsyna π przeprowadza proces autolizy, prowadzący do usunięcia z cząsteczki dwóch dipeptydów: Ser14–Arg15 oraz Thr147–Asn148, co prowadzi do powstania chymotrypsyny γ , a następnie w wyniku zmian konformacji powstają kolejno: forma κ i stabilna chymotrypsyna α . Obie formy (κ i α) składają się z trzech łańcuchów połączonych dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi. Podobnie jak w przypadku trypsyn, poszczególne formy enzymu różnią się stabilnością i właściwościami katalitycznymi, choć zarówno chymotrypsyna κ jak i α są w pełni aktywnymi jego formami [1].

Aktywacja proelastazy, która w zależności od sekwencji aminokwasowej i specyficzności substratowej przypisywana jest do jednego z czterech typów, następuje również przez odcięcie propeptydu, którego sekwencja jest słabo konserwatywna. Wszystkie proelastazy II są syntetyzowane jako proenzymy zawierające 12-aminokwasowy peptyd aktywujący. Natomiast w sekwencji bydłęcej elastazy I stwierdzono obecność peptydu aktywującego obejmującego 10 reszt aminokwasowych [12]. Jedynym wysoce konserwatywnym aminokwasem, zachowanym we wszystkich elastazach jest reszta argininy, rozpoznawana przez trypsynę w procesie aktywacji zymogenów [17].

2.2. Izofomy enzymów trzustkowych

Proteiny serynowe trzustki występują w postaci izoform różniących się m.in. właściwościami fizykochemicznymi, kinetycznymi, składem aminokwasowym i wartością pI. Na tej podstawie wyróżniane są izofomy anionowe (o niższym pI) i izofomy kationowe (o wyższym pI). Znaczenie występowania w jednej tkance kilku form tego samego enzymu nie jest ciągle wyjaśnione. Przykłady przedstawiono w tabelach 2, 3, 4.

U większości gatunków ssaków, ptaków i ryb występuje więcej niż jedna forma trypsyny. U ssaków dominującą formą jest forma kationowa, natomiast u ryb anionowa [18]. Izofomy różnią się stabilnością temperaturową, wrażliwością na zakwaszenie środowiska, a także oddziaływaniem z inhibitorami (tab. 5) [19]. Formy anionowe enzymów są zazwyczaj mniej stabilne w niskim pH. Dobrym przykładem obrazującym różnice między izoformami są trypsyny człowieka (tab. 2). W ludzkich trzustkach syntetyzowane są trzy trypsynogeny: kationowy, anionowy oraz mezo-trypsynogen, z których powstają odpowiednie formy trypsyny. Forma kationowa jest formą dominującą, stanowiącą około 2/3 całej ilości trypsynogenu, forma anio-

nowa stanowi 1/3, a mezotrypsynogen to zaledwie około 5% całej puli proenzymu [19]. Forma kationowa wykazuje wysoką stabilność w szerokim zakresie pH od 2,0 do 8,2, natomiast anionowa oraz mezotrypsyna tracą stopniową aktywność w środowisku kwaśnym (pH poniżej 4,0). Zakwaszenie sprzyja aktywacji formy kationowej, hamuje natomiast aktywację formy anionowej. Mezotrypsyna wykazuje z kolei wysoką odporność na działanie inhibitorów trypsynowych (tab. 5) [19,20].

Tabela 2

Porównanie właściwości izoform trypsyny wybranych gatunków

Gatunek	Izoforma	Właściwości		Literatura
bydło	trypsyna anionowa	m.cz. 24 000 Da		[21]
	trypsyna kationowa	m.cz. 24 000 Da; pI 9,3		
świnia	trypsyna anionowa	m.cz. 23 435 Da		[22]
	trypsyna kationowa			
człowiek	trypsyna anionowa	m.cz. 22 535 Da; pI 4,92		[20]
	trypsyna kationowa	m.cz. 24 103 Da; pI 7,4;		
	mezotrypsyna	m.cz. 25 000 Da; pI 6,5		
owca	trypsyna kationowa	m.cz. 23 901 Da		[22]
szczur	trypsyna anionowa I	m.cz. 25 000 Da		[23]
	trypsyna anionowa II	m.cz. 24 000 Da		
	trypsyna kationowa	m.cz. 21 000 Da		
kura	trypsyna anionowa	m.cz. 23 500 Da		[24]
dorsz atlantycki	trypsyna anionowa I	pI 5,5	m.cz. 24 200 Da	[25]
	trypsyna anionowa II	pI 6,2		
	trypsyna anionowa III	pI 6,6		
łośń atlantycki	trypsyna anionowa I	pI 4,7	m.cz. 25 000 Da	[11,26]
	trypsyna anionowa II	pI 4,6		
	trypsyna anionowa III	pI 4,55		
	trypsyna kationowa	pI 9,3		
pstrąg tęczowy	trypsyna	m.cz. 25 700 Da		[27]

Różnice we właściwościach fizykochemicznych zaobserwowano także w izoformach trypsyny łososia atlantyckiego. Porównując formę kationową i anionową łososia (*Salmo salar*) z trypsyną bydlęcą, wykazano, że forma anionowa w środowisku o pH poniżej 5,0 zachowuje tylko 10-30% aktywności, podczas gdy trypsyna bydlęca wykazuje jednakową stabilność w całym zakresie pH od 2,0 do 12. Forma kationowa trypsyny łososia wykazuje cechy pośrednie i w pH poniżej 5,0 zachowuje ok. 60% aktywności. Enzym ten wykazuje wysoką aktywność w szerokim zakresie pH od 8,5 do 10,5, podobnie jak trypsyna bydlęca. Tymczasem optimum aktywności formy anionowej zlokalizowane jest blisko pH 10,5 [11].

U większości gatunków kręgowców zidentyfikowano kilka form chymotrypsyny, które, na podstawie sekwencji aminokwasowej i specyficzności przypisano do jednej z trzech izoform (izotypów) A, B i C (tab. 3). Typy A i B występujące zarówno jako izoformy kationowe jak i anionowe, wykazują niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej. Izoforma A wykazuje specyficzność substratową typową dla chymotrypsyny tzn. hydrolizuje z jednakową wydajnością wiązania peptydowe położone za aminokwasami, takimi jak: Phe, Tyr, Trp, natomiast wiązania położone za Leu i Met hydrolizowane są dwukrotnie wolniej. Chymotrypsyna B wykazuje podobną specyficzność substratową, przy czym wiązania utworzone przez Trp hydrolizuje z dwukrotnie niższą wydajnością niż wiązania za pozostałymi aminokwasami aromatycznymi. Różnice te wynikają z odmiennego ukształtowania w enzymie kieszeni wiążącej substrat [29].

Tabela 3

Porównanie właściwości izoform chymotrypsyny wybranych gatunków

Gatunek	Izoforma	Właściwości	Literatura
bydło	chymotrypsyna A kationowa	m.cz. 25 600 Da, pI 9,1	[21]
	chymotrypsyna B anionowa	m.cz. 25 000 Da; pI 5,2	
	chymotrypsyna C	tworzy kompleks z prokarboksypeptydazą A i proteinazą E	[30]
świnia	chymotrypsyna A		[31]
	chymotrypsyna B		
	chymotrypsyna C	tworzy kompleks z prokarboksypeptydazą A i proteinazą E	
człowiek	chymotrypsyna kationowa	m.cz. 26 300 Da	[32]
	chymotrypsyna anionowa	m.cz. 25 800 Da	
kura	chymotrypsyna 1	m.cz. 24 000 Da	[24]
	chymotrypsyna 2		
dorsz atlantycki	chymotrypsyna I (A)	m.cz. 26 000 Da; pI 6,2	[33]
	chymotrypsyna II (B)	m.cz. 26 285 Da; pI 5,8	
karp	chymotrypsyna I	m.cz. 28 000 Da; pI 5,6-5,8	[34]
	chymotrypsyna II	m.cz. 27 000 Da; pI 6,8-7,0	
pstrąg tęczowy	chymotrypsyna I	m.cz. 28 200 Da, pI 4,9-5,0	[35]
	chymotrypsyna II	m.cz. 28 800 Da, pI 4,9-5,0	

Typ C chymotrypsyny preferuje natomiast wiązania peptydowe utworzone przez leucynę. Sekwencja aminokwasowa tego enzymu jest znacząco różna od form A i B, a pI zlokalizowane w neutralnym pH. W strukturze chymotrypsyny C występują 2 łańcuchy u wszystkich gatunków zagregowane z prokarboksypeptydazą i proteinazą E [36]. Elastazy były początkowo charakteryzowane jako trzustkowe proteiny serynowe zdolne do trawienia elastyny i innych białek włóknikowych [37], obecnie wiadomo jednak, że część enzymów należących do tej rodziny nie wykazuje tych

zdolności (np. elastazy II). Wśród elastaz kręgowców wyróżnia się cztery izoformy określane jako typ I, II, III, IV. Różnice w sekwencji aminokwasowej pomiędzy poszczególnymi formami elastaz sięgają 60% [17]. Najbardziej rozpowszechnione są formy I i II. Podobnie jak w przypadku innych proteinaz, u większości gatunków zwierząt występuje dwie lub więcej form elastazy (tab. 4). Formy kationowe, należące do elastaz typu I, oraz proteinazy E i ludzka elastaza III są specyficzne wobec wiązań utworzonych przez małe, hydrofobowe aminokwasy, natomiast anionowe elastazy typu II wykazują aktywność chymotrypsynopodobą. U ryb stwierdzono głównie elastazy typu I, ale wyjątek stanowi elastaza C dorsza atlantyckiego o specyficzności chymotrypsynowej [33]. Liczne formy elastaz zidentyfikowano dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej. Analizując cDNA trzustki szczura zidentyfikowano elastazę, która jest słabo aktywna wobec typowych substratów elastazowych i zaliczono ją do typu IV. Wykazano ponadto, że jest to enzym zaangażowany w proces przekształcania angiotensynogenu I w angiotensynogen II [33]. Analiza biblioteki cDNA trzustki człowieka umożliwiła zidentyfikowanie dwóch proelastaz typu II oznaczonych jako A i B (homologicznych w 90%) [38], wykazując jednocześnie brak kationowej, alaninospecyficznej elastazy homologicznej do wieprzowej elastazy I [39]. Opisana wcześniej [40] ludzka elastaza I nie wykazuje podobieństwa do elastazy I wieprzowej lub bydłowej, nie posiadając przede wszystkim zdolności trawienia białek włókiennokowych tkanki łącznej (elastyny) [2]. W najnowszych badaniach wykazano natomiast jej podobieństwo w składzie aminokwasowym, charakterze jonowym i masie cząsteczkowej do anionowego, elastazopodobnego enzymu – proteinazy E [41], która posiada zdolność hydrolizy syntetycznych substratów elastazowych, nie hydrolizuje jednak elastyny [42]. Homologii proteinazy E zidentyfikowano także w trzustce wieprzowej i bydłowej. Wszędzie tworzą one kompleks z prokarboksypeptydazą A i chymotrypsynogenem C [30,43]. Kolejne homologii wieprzowej elastazy I zidentyfikowane na podstawie analizy cDNA trzustki człowieka nazwano elastazami III A i B. Homologia sekwencji między tymi formami wynosiła 93% [42].

Tabela 4

Porównanie właściwości izoform elastazy wybranych gatunków

Gatunek	Izoforma	Właściwości	Literatura
1	2	3	4
bydło	elastaza I		[44]
	elastaza II	m.cz. 29 000 Da	
	proteinaza E	tworzy kompleks z prokarboksypeptydazą A i chymotrypsynogenem C; pI 4,85	[30,43]
świnia	elastaza I	m.cz. 25 900 Da, pI 9,5	[45]
	elastaza II	m.cz. 21 900 Da	
	proteinaza E	tworzy kompleks z prokarboksypeptydazą A i chymotrypsynogenem C	

1	2	3	4
człowiek	elastaza I	m.cz. 27 812 Da	[40]
	elastaza II A	m.cz. 28 699 Da	[38]
	elastaza II B	m.cz. 30 790 Da	
	elastaza III A	pI 5,6	[42]
	elastaza III B		
	proteinaza E	tworzy kompleks z prokarboksypeptydazą A i chymotrypsynogenem C	[39]
szczur	elastaza I		[46]
	elastaza II	m.cz. 29 000 Da; pI 5,6	[1]
owca	elastaza I	m.cz. ok. 25 000 Da; pI 9,3	[47]
dorsz atlantycki	elastaza A	m.cz. 26 585; pI 6,3	[17]
	elastaza B	m.cz. 25 682; pI 6,2	
	elastaza C	m.cz. 25 501; pI 5,5	[33]

Warta podkreślenia jest także różnica między enzymami trzustkowymi ryb a enzymami ssaków. Wspólną cechą enzymów rybich, odróżniających je od enzymów ssaków, jest podwyższona wydajność katalityczna oraz niestabilność w kwaśnym pH i podwyższonej temperaturze [17,48]. Enzymy ryb określa się terminem psychrofilnych w odróżnieniu od mezofilnych enzymów ssaków [49]. Optimum działania enzymów rybich przypada często w temperaturze 40-50°C (np. trypsyny sardynki), a w przypadku dorsza grenlandzkiego nawet 35°C podczas gdy enzymy ssaków najwyższą aktywność osiągają w temperaturze 50-60°C. Z reguły powyżej temperatury 60°C enzymy rybnie ulegają szybkiej inaktywacji [33,35]. Enzymy ryb są też niestabilne w pH poniżej 5,0, w przeciwieństwie do enzymów ssaków stabilnych w kwaśnym zakresie pH. Jednocześnie wydajność katalityczna (wyrażana jako k_{cat}/K_m) trypsyn, chymotrypsyn i elastaz rybich może być od kilku do kilkudziesięciu razy wyższa niż odpowiednich enzymów ssaków [17]. Jest to rezultatem podwyższonej liczby obrotów (co obserwujemy jako podwyższenie wartości k_{cat}), lub jego podwyższonego powinowactwa do substratu (obserwowanego jako obniżenie wartości K_m), lub też obu tych właściwości enzymu równocześnie [48]. Przykładowo, trypsyna I sardeli japońskiej (*Engraulis japonicus*) wykazywała wartość k_{cat}/K_m dla BApNA dwukrotnie większą, trypsyna pstrąga tęczowego 12-15 razy większą [27], a trypsyna II sardeli japońskiej nawet 35 razy większą [50] niż bydłęca trypsyna kationowa.

3. Oddziaływania enzymów z białkowymi inhibitorami

Zróznicowanie enzymów trzustkowych ujawniają się m.in. w ich oddziaływaniu z egzogennymi inhibitorami proteinaz serynowych, które stanowią jeden z najważniejszych czynników anżywnieniowych występujących w pokarmie zwierząt i ludzi [51]. Ich bogatym źródłem są m.in. rośliny strączkowe, dyniowate, ziemniaki,

izolaty białkowe zbóż, a także jaja. Białkowe inhibitory mogą posiadać wąską specyficzność i hamować tylko jeden enzym (głównie trypsynę lub chymotrypsynę) lub wykazywać szerokie spektrum oddziaływania. Powoduje to, że działają one jako czynniki utrudniające lub nawet całkowicie blokujące trawienie białek zawartych w pożywieniu, uniemożliwiając ich właściwe wykorzystanie. Prowadzi to do wyeliminowania źródła aminokwasów egzogennych, co może skutkować zahamowaniem wzrostu zwierząt [51,52]. Unieczynnienie enzymów trawiennych powoduje także krytyczne obniżenia poziomu aktywnej trypsyny i chymotrypsyny w dwunastnicy, co na zasadzie mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego, prowadzi do uruchomienia mechanizmu kompensacyjnego, powodującego stymulację ich syntezy w trzustce. Rezultatem może być hipertrofia trzustki choć wyniki eksperymentów żywieniowych wskazują, że poszczególne gatunki zwierząt reagują bardzo indywidualnie. Powiększenie trzustki obserwowano u młodych świnek wietnamskich, kurcząt, myszy i szczurów karmionych mączką sojową bogatą w inhibitor trypsyny. Nie obserwowano natomiast u cieląt, psów, dorosłych świnek wietnamskich i człowieka. Trzustki szczurów i kurcząt adaptowały się do diety bogatej w inhibitory zwiększając produkcje trypsynogenu i chymotrypsynogenu i zmniejszeniem ilości wydzielanej amylazy [51,52].

Wymuszona wzmożona synteza proteinaz trzustkowych, przy jednoczesnym braku dostępności białek egzogennych prowadzić może także do degradacji własnych białek, które stają się źródłem niezbędnych aminokwasów, szczególnie siarkowych, potrzebnych do syntezy nadmiernych ilości enzymów [51].

Analiza biochemiczna oddziaływania enzymów trzustkowych z białkowymi inhibitorami wskazuje, że enzymy różnych gatunków zwierząt, jak i poszczególne izoformy enzymów jednego gatunku, mogą oddziaływać odmiennie z tymi samymi inhibitorami. Przykładem może być forma anionowa trypsyny ludzkiej, która w odróżnieniu od formy kationowej, jest silnie hamowana przez inhibitor trypsyny z soi (STI). Zahamowanie kationowej trypsyny wielbłąda wymaga ok. trzykrotnie większego stężenia STI niż, w tych samych warunkach, zahamowanie kationowej trypsyny bydłowej [51]. Z kolei kationowa chymotrypsyna wielbłąda jest bardziej podatna na działanie STI niż bydłowa chymotrypsyna A [36]. Odmiennie jest także hamowanie przez STI elastaz pochodzących od różnych gatunków. STI hamuje dobrze elastazę kurzą [24] i elastazę II szczura [2], słabiej elastazę z dorsza, nie hamuje natomiast elastazy wieprzowej [53], (tab. 5).

Tabela 5

Przykłady oddziaływań proteinaz różnych gatunków z białkowymi inhibitorami

Enzym	BPTI	STI	LBTI	Owomukoid kurzy	Owomukoid indyczy	PSTI	Literatura
trypsyna anionowa człowieka	+	+	+	+		+	[20]
trypsyna kationowa człowieka	+	+/-	+/-	+/-		+	[20]
mezo-trypsyna człowieka	-	-	-	-		-	[20]
trypsyna bydłęca	+	+	+	+	+	+	[32]
trypsyna dorsza	+	+/-			-		[32]
chymotrypsyna I człowieka	+/-	+/-	+	-	+/-		[25]
chymotrypsyna II człowieka	-	+/-	+	-	+		[25]
chymotrypsyna bydłęca	+	+/-	+	-	+		[25]
elastaza dorsza		+/-					[53]
elastaza wieprzowa	+	-					[53]

Legenda: BPTI – bydłęcy trzustkowy inhibitor trypsyny; STI – inhibitor trypsyny z soi, LBTI inhibitor trypsyny z *Lima bean*, PSTI – wydzielniczy trzustkowy inhibitor trypsyny; poziom hamowania – (+) >70%, 70% > (+/-) > 30%, (-) < 30%.

Innym przykładem jest oddziaływanie proteinaz z bydłęcym trzustkowym inhibitorem trypsyny (BPTI) (tab. 5). Jest on silnym inhibitorem trypsyny, ale nie hamuje mezo-trypsyny ludzkiej [20], która generalnie jest enzymem odpornym na działanie inhibitorów. BPTI hamuje efektywnie chymotrypsynę bydłęcą, ale bardzo słabo ludzką chymotrypsynę kationową (I) i prawie wcale nie oddziałuje z ludzką chymotrypsyną anionową (II) [25]. Wśród chymotrypsyn rybich podatność na działanie BPTI wykazują: chymotrypsyna dorsza, chymotrypsyna II pstrąga i chymotrypsyna II karpia, ale chymotrypsyna I karpia jest przez ten inhibitor hamowana bardzo słabo [54]. BPTI hamuje także elastazę z trzustki świni, ale nie hamuje elastazy kurzej [24]. Inne przykłady zróżnicowanego oddziaływania proteinaz a białkowymi inhibitorami przedstawiono w tabeli 5.

Duże zróżnicowanie w oddziaływaniu enzymów z białkowymi inhibitorami wpływać może na odmienną przyswajalność białka mieszanek paszowych i rodzi potrzebę indywidualnego doboru składników pasz dla poszczególnych gatunków zwierząt w celu zapewnienia im optymalnych warunków hodowli.

4. Proteiny trzustkowe w biotechnologii

Enzymy trzustkowe znalazły szerokie zastosowanie w laboratoriach medycznych i biochemicznych, a także w przemyśle, głównie spożywczym. Stosowane są zarówno w postaci pankreatyny, jak i preparatów oczyszczonych trypsyn, chymotrypsyn i elastaz [56,57,59]. Enzymy stosowane są w postaci roztworów lub immobilizowane na odpowiednich nośnikach [56,57]. Jednym z podstawowych zastosowań bio-

technologicznych jest produkcja hydrolizatów białkowych, np. z białek serwatkowych, albuminy jaja czy hemoglobiny. Na szeroką skalę produkuje się także hydrolizaty sojowe [51] i kazeinowe [52,54]. Już od 1970 r. hydrolizaty kazeiny i owoalbuminy uzyskane na drodze trawienia pankreatyną stosowane są jako dodatki do żywności dietetycznej [56]. Enzymy trzustkowe stosowane są także do odmięśniania kości wieprzowych i drobiowych oraz szkieletów ryb [61].

Zhydrolizowane białka często zyskują nową jakość biologiczną. Generowane w trakcie hydrolizy peptydy mogą wykazywać właściwości antybakteryjne, hamujące enzym konwertujący angiotensynogen I do angiotensynogenu II, też czy właściwości antyoksydacyjne. Znanych jest wiele peptydów uzyskiwanych m.in. z białek mleka czy jaja, działających jako agoniści i antagoniści opioidów [58,59]. Hydroliza pozwala także na polepszenie przyswajalności niektórych białek, gdyż w jelicie cienkim aminokwasy wchłaniane są zarówno w postaci wolnej jak i w postaci di- i tripeptydów. Częściowa hydroliza białek pozwala także na obniżenie ich właściwości immunogennych. Polepsza ona także cechy technologiczne materiału białkowego wpływając na właściwości emulgujące, rozpuszczalność czy zdolność tworzenia piany [61].

Najpowszechniej stosowanymi proteinazami są enzymy bydlęce i wieprzowe. Jednak rosnące zapotrzebowanie przemysłu, a także ryzyko chorób przenoszonych przez te zwierzęta, czy wreszcie występujące w niektórych religiach i kulturach ograniczenia, zmuszają do zastępowania tych enzymów proteinazami innych gatunków. Stąd też w wielu badaniach skupia się obecnie uwagę na porównywaniu właściwości funkcjonalnych enzymów poszczególnych gatunków zwierząt.

W wielu przypadkach proces kontrolowanej hydrolizy substratu kończy się poprzez zagotowanie lub silne zakwaszenie hydrolizatu. Zastąpienie enzymu bydlęcego enzymem rybim pozwala na zahamowanie tego procesu w mniej energochłonnych warunkach albowiem proteiny rybie ulegają inaktywacji znacznie szybciej niż stabilniejsze enzymy ssaków. Jednocześnie lepsze właściwości katalityczne enzymów rybich pozwalają na efektywniejsze przeprowadzanie procesu hydrolizy. Nie oznacza to jednak, że produkt hydrolizy będzie zawsze taki sam. Przykładowo w przeprowadzonej analizie specyficzności substratowej dla dwóch chymotrypsyn dorsza (T1 i T2), α -chymotrypsyny bydlęcej i wieprzowej chymotrypsyny C, w której trawiono utleniony łańcuch B insuliny bydlęcej, wykazano, że każdy z tych enzymów hydrolizuje inne wiązania peptydowe. Stwierdzono, że enzym bydlęcy przeprowadzał hydrolizę tylko czterech wiązań, utworzonych przez tyrozynę lub fenyloalaninę, podczas gdy chymotrypsyna T1 dorsza ośmiu, a T2 pięciu, w tym również wiązań utworzonych m.in. przez leucynę, ale także ze słabszym powinowactwem przez argininę czy skrajnie położoną resztą fenyloalaniny. Zupełnie odmienny sposób hydrolizy reprezentowała chymotrypsyna wieprzowa, która rozpoznawała siedem miejsc cięcia w łańcuchu B insuliny. Enzym ten nie hydrolizował wiązania usytuowanego między Tyr16-Leu17, charakterystycznego dla wszystkich pozostałych enzymów, ale za to wykazywał wysokie powinowactwo do reszt leucyny obecnych

w łańcuchu. Rodzaj peptydów uzyskanych zatem podczas hydrolizy tymi czterema enzymami był zupełnie inny [28]. Podobne wyniki otrzymano także przy produkcji hydrolizatów z białek ryb. Peptydy obecne w hydrolizatach otrzymanych za pomocą trypsyny wieprzowej i dorszowej różniły się rozkładem mas cząsteczkowych [28].

Z kolei w badaniach wykonanych dla porównania trypsyn wieprzowej i owczej wykazano, że posiadają one identyczne miejsca trawienia w sekwencji β -laktoglobuliny, lizozymu i α -kazeiny, jednakże różna jest szybkość katalizy poszczególnych reszt, a zatem inny też skład ilościowy peptydów w uzyskanych hydrolizatach [61].

Pozytywnym aspektem zróżnicowania funkcjonalnego enzymów trzustkowych może być możliwość generowania różnych produktów z wyjściowych substratów białkowych i otrzymywanie hydrolizatów o zróżnicowanych właściwościach i aktywnościach biologicznych.

5. Podsumowanie

Trzustkowe proteiny serynowe charakteryzują się zarówno dużą międzygatunkową różnorodnością strukturalną i funkcjonalną, jak i bogactwem form (formy katalityczne, izoenzymy) w obrębie jednego gatunku. Co za tym idzie zróżnicowane są także ich właściwości fizykochemiczne, katalityczne oraz oddziaływania z inhibitorami. Każdy z organizmów posiada swój indywidualny „zestaw enzymów” podlegający w odmienny sposób wpływom czynników modulujących ich aktywność. Konsekwencją tego jest odmienna wrażliwość poszczególnych gatunków na czynniki antyżywnicowe, do których zaliczyć można białkowe inhibitory proteinaz serynowych. Trzustki zwierząt są też tanim i bogatym źródłem enzymów o potencjalnie szerokim zastosowaniu w praktyce. Subtelne różnice w specyficzności i właściwościach fizykochemicznych mogą zostać wykorzystane do otrzymywania w wyniku hydrolizy białkowych substratów zróżnicowanych produktów.

Pracę dedykujemy Panu Profesorowi Tadeuszowi Wiluszowi z okazji Jego 70. rocznicy urodzin.

Literatura

1. Rawlings N. D., Morton F. R., Barrett A. J., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, D270-D272.
2. Stryer L., (1997), *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
3. Liu B., Schofield C. J., Wilmouth R. C., (2006), *JBC Papers in Press*, www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M600495200
4. Sichler K., Hopfner K. P., Kopetzki E., Huber R., Bode W., Brandstretter H., (2002), *FEBS Letters*, 539, 220-224.
5. Czapińska H., Otlewski J., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 260, 571-595.
6. Venekei I., Graf L., Rutter W. J., (1995), *FEBS Lett.*, 379, 139-142.
7. Mansfield C. S., Jones B. R., (2001), *J. Feline Med. and Surg.*, 3, 117-124.
8. Nyaruhucha C. N. M., Kito M., Fukuoka S. I., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 10573-10578.
9. Borgstrom A., Appelros S., Muller C. A., Uhl W., Buchler M. W., (2002), *Surgery*, 131, 125-128.

10. Gorelick F. S., Otani T., (1999), *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, 13, 227-240.
11. Genicot S., Rentier-Delrue F., Edwards D., van Beeumen (1996), *Comp. Biochem. Physiol.*, 115B, 33-45.
12. Outzen H., Berglund G. I., Smalas A. O., Willassen N. P., (1996), *Comp. Biochem. Physiol.*, 115B, 33-45.
13. Bodley M. D., Naude R. J., Oelofsen W., Patthy A., (1995), *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 719-728.
14. Foucault G., Seydoux F., Yon J., (1974), *Eur. J. Biochem.*, 47, 295-302.
15. Huang Q., Wang Z., Li Y., Liu S., Tang Y., (1994), *Refined Biochim. Biophys Acta.*, 1209, 77-82.
16. Gestin M., Le Huerou-Luron I., Wicker-Planquart C., Le Drean G., Chaix J. C., Puigserver A., Guilloteau P., (1997), *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 118, 181-187.
17. Gudmundsdottir E., Spilliaert R., Yang Q., (1996), *Comp. Biochem. Physiol.*, 113, 795-801.
18. Schreoder H., Willassen N. P., Smalas A. O., (1998), *Acta Cryst.*, D54, 780-798.
19. Kukor Z., Toth M., Sahin-Toth M. T., (2003), *Eur. J. Biochem.*, 270, 2047-2058.
20. Rinderknecht H., Renner I. G., Abramson S. B., Carmaack C., (1984), *Gastroenterology*, 86, 681-92.
21. Rick W., (1974), *Methods Enzym. Anal.*, 3rd ed. (ed. Bergmeyer H. U.), 1, 1045-1051.
22. Johnson K. D., Clark A., Marshall S., (2002), *Comp. Biochem. Physiol.*, 131, 423-431.
23. Watanabe T., Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., (1980), *FEBS Lett.*, 121, 369-371.
24. Guyonnet V., Tluščík F., Long P. L., Polanowski A., Travis J., (1999), *J. Chromatogr.*, A, 852, 217-225.
25. Asgeirsson B., Fox J. W., Bjarnason J. B., (1989), *Eur. J. Biochem.*, 180, 85-94.
26. Male R., Lorens L. B., Smalas A. O., Torrisen K. R., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 232, 677-685.
27. Kristjansson M. M., (1991), *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1738-1742.
28. Raae A. J., Flengsrud R., Sletten K., (1995), *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 393-398.
29. Hudaky P., Kaslik G., Venekei I., Graf L., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 259, 528-533.
30. Kobayashi Y., Kobayashi R., Hirs C. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, A, 256, 2466-2470.
31. Baza danych o proteinazach BRENDA: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
32. Feinstein G., Hofstein R., Koifmann J., Sokolovsky M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, 43, 572-581.
33. Asgeirsson B., Leth-Larsen R., Thorolfsson M., Norregaard M. M., Hojrup P., (1998), *Eur. J. Biochem.*, 255, 638-646.
34. Fong W. P., Chan E., Lau K. K., (1998), *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45, 409-418.
35. Kristjansson M. M., Nielsen H. H., (1992), *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B, 247-253.
36. AlAjlan A., Bailey G. S., (2000), *Mol. Cell. Biochem.*, 203, 73-78.
37. Bode W., Meyer E., Powers J. C., (1989), *Biochemistry*, 28, 1951-1962.
38. Kawashima I., Tani T., Shimoda K., Takiguchi Y., (1987), *DNA*, 6, 163-172.
39. Shen W. F., Fletcher T. S., Largman C., (1987), *Biochemistry*, 26, 3447-3452.
40. Largman C., Brodrick J. W., Geokas M. C., (1976), *Biochemistry*, 15, 2491-2500.
41. Mallory P. A., Travis J., (1975), *Biochemistry*, 14, 721-730.
42. Tani T., Ohsumi J., Mita K., Takibuchi Y., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 1231-1239.
43. Gomis-Ruth F. X., Gomez M., Bode W., Huber R., Aviles F. X., (1995), *EMBO J.*, 14, 4387-4394.
44. Azuma K., Banshou Y., Suzuki H., (2001), *J. Protein Chem.*, 20, 577-584.
45. Ardel W., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 341, 318-326.
46. Largman C., (1983), *Biochemistry*, 22, 3763-3770.
47. Erlendsson L. S., Filippsson H., (1998), *Comp. Biochem. Physiol.*, 120, 549-557.
48. Smalas A. O., Heimstad E. S., Hordvik A., Willassen N. P., Male R., (1994), *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 20, 149-166.
49. Schreoder Leiros H., Willassen N. P., Smalas A. O., (1999), *Extremophiles*, 3, 205-219.
50. Ahsan N., Watabe S., (2001), *J. Protein Chem.*, 20, 49-58.
51. Polanowski A., Wilusz T., (1998), *Materiały konferencji naukowej „Biotechnologia w technologii żywności, Wrocław (09.1998)*, 33-45.
52. Birk, Y., (1993), *Protease inhibitors of plant origin; role in human nutrition*, Eds. Walter Troll and Ann R. Kennedy, Plenum Press, New York.
53. Gildberg A., Arnesen J. A., Cariehog M., (2002), *Process Biochemistry*, 38, 475-480.
54. Fong W. P., Chan E., Lau K. K., (1998), *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45, 409-418.

55. McManus M. T., Laing W. A., Allan A. C., (2000), *Annual Plant Reviews*, Sheffield Academic Press, 76-119.
56. Ge S. J., Bai H., Yuan H. S., Zhang L. X., (1996), *J. Biotech.*, 161-170.
57. Netto F. M., Galeazzi M. A. M., (1998), *Lebensm.- Wiss. u Technol.*, 31, 624-631.
58. Korhonen H., Philanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T., (1998), *Trends Food Scien. Techn.*, 9, 307-319.
59. Clemente A., (2000), *Trend. Food Techn.*, 11, 254-262.
60. Meisel H., (1997), *Livestock Product. Scien.*, 50, 125-138.
61. Johnson K. D., Clarc A., Marshall S., (2002), *Comp. Bioche. Physiol. B.*, 132, 423-431.
62. Fonkwe L. G., Singh R. K., (1996), *Process Biochemistry*, 31, 605-616.