

ANALIZA MECANISMULUI PROTEOLIZEI FITOHEMAGLUTININEI SUB ACȚIUNEA LEGUMAINEI

Diana MORARI, Tatiana STEPURINA, Vitalie I. ROTARI

Mobilizarea proteinelor de rezervă (PR) în timpul germinării semințelor și în etapa timpurie a creșterii plantulei se efectuează într-un mod bine reglat. Acest proces este inițiat de către acțiunea unei proteinaze specifice asupra PR care modifică limitat structura acestor proteine și, în acest fel, le face sensibile la acțiunea altor proteinaze care le hidrolizează până la peptide și aminoacizi [1]. În semințele de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.), de exemplu, proteoliza fazeolinei, PR principale, este inițiată de către o proteinază cisteinică Asn-specifică, legumaina, iar ulterior o altă proteinază cisteinică papainică, CPPh, hidrolizează profund fazeolina modificată de către legumaină [2]. Se presupune că PR și proteinazele din semințe au influențat reciproc evoluția unora în așa fel ca să fie evitată degradarea PR în timpul depunerii lor în cotiledoane la maturizarea semințelor, iar la germinarea semințelor să poată fi efectuată mobilizarea eficientă a PR [3].

Pe lângă PR, semințele multor plante mai conțin și alte grupe de proteine [4], unele dintre care sunt biologic active, precum lectinele [5]. Funcțiile pe care le au lectinele *in vivo* nu sunt încă stabilite cu siguranță [6], însă este cunoscut faptul că prezența acestor lectine în cantități mari are un efect negativ asupra valorii nutritive a produselor alimentare [7]. De exemplu, semințele de fasole conțin o cantitate sporită de fitohemaglutinină (PHA) [5],

cea ce influențează negativ folosirea lor în diete [7]. Lucrul acesta se datorează și faptului că lectinele sunt rezistente la acțiunea proteinazelor tractului digestiv [8], fapt ce le permite să interacționeze cu receptorii celulelor epitelului intestinal și în acest mod să declanșeze reacții inflamatorii [8] cauzând dereglări ale tractului digestiv. Este cunoscut faptul că multe lectine sunt, de asemenea, alergeni puternici [7, 8], iar recent a fost stabilit că și PHA posedă un caracter alergic [9].

Deoarece producerea și folosirea proteinelor vegetale în industria alimentară are o importanță majoră pentru asigurarea populației cu alimente, găsirea unei soluții de îmbunătățire a valorii nutritive a izolatelor proteice din semințe prin înlăturarea compușilor dăunători, printre care se numără și PHA [10], reprezintă o problemă căreia i se acordă o atenție sporită în ultimul timp. Odată ce în procesul de germinare și creștere a plantulei lectinele sunt alături de PR profund hidrolizate, se consideră că cercetarea proteolizei lor la acțiunea proteinazelor endogene poate ajuta la clarificarea mecanismului stabilității (sau sensibilității) lor la acțiunea proteinazelor.

Este cunoscut faptul că fazeolina este rezistentă la acțiunea proteinazelor [11, 12] și devine sensibilă la acțiunea lui CPPh numai după modificarea ei de către legumaină [2]. De aceea, în această lucrare, am cercetat mecanismul proteolizei PHA la acțiunea legumainei.

Legumaina a fost purificată după o metodă proprie [2], iar PHA – după metoda lui Rigas și Johnson în modifiacția lui Karmanski [13]. Pentru determinarea purității legumainei, s-a efectuat măsurarea activității cu un substrat specific legumainei Bz-Asn-*p*-nitroanilide și cu un substrat specific pentru proteinazele papainice Bz-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide, iar pentru evitarea oricărei contaminări a legumainei cu alte proteinaze papainice, în preparatul final de legumaină a fost adăugat E64, 10μM, un inhibitor al proteinazelor papainice. Determinarea proteinei reziduale a fost efectuată după metoda Gofman [14], iar analiza hidrolizatului a fost înfăptuită prin electroforeză în prezența SDS-ului.

PHA este o proteină oligomerică cu masa moleculară (M_r) de 126 kDa alcătuită din două tipuri de subunități L și E cu M_r de 32 kDa și 34 kDa, corespunzător, care formează un tetramer în toate combinațiile posibile ale subunităților: L₄, L₃E, L₂E₂, LE₃ și E₄, astfel rezultând în cinci proteine. Legumaina hidrolizează limitat PHA, scindând numai 45% de proteină în 48 de ore. În urma analizei electroforegramei preparatului de PHA hidrolizat de către legumaină, s-a constatat că pe parcursul hidrolizei are loc scindarea catenelor polipeptidice ale PHA native și apare o bandă proteică majoră cu M_r aproximativ de 28,4 kDa, precum și formarea unui grup de fragmente cu M_r în diapazonul de 19-13 kDa. Concomitent cu subunitățile native ale PHA,

este hidrolizată și banda majoră formată la acțiunea legumainei. Acest proces este finisat în timp de 4 ore. Numărul benzilor ce corespund fragmentelor cu M_r se schimbă puțin, iar intensitatea lor crește treptat pe parcursul hidrolizei.

Aceste rezultate arată că proteoliza PHA la acțiunea legumainei se deosebește de proteoliza proteinelor de rezervă. Legumaina scindează mai profund PHA decât fazeolina, pe care doar o modifică [2], iar această scindare decurge paralel după două mecanisme, cooperativ și non-cooperativ, ceea ce este demonstrat prin dispariție concomitentă până la 4 ore de hidroliză a benzilor ce corespund catenelor polipeptidice native și a benzii cu M_r mare formate la acțiunea legumainei, precum și de variațiile spectrului de fragmente (detectate la SDS-electroforeză) formate în cursul proteolizei. Deci legumaina, la fel ca și o altă proteinază cisteinică endogenă, CPPH [15], hidrolizează PHA conform mecanismului mixt de proteoliză, doar numai că, spre deosebire de CPPH, acest proces se oprește după hidroliza a 45% de proteină.

Referințe:

1. SHUTOV, A.D. and VAINTRAUB, I.A. Degradation of storage proteins in germinated seeds. In: *Phytochemistry*. 1987, no.26, p.1557-1566.
2. ZAKHAROV, A., CARCHILAN, M., STEPURINA, T., ROTARI, V., WILSON, K., VAINTRAUB, I. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. In: *J Exp. Bot.* 2004, no.55, p. 2241-2249.
3. SHUTOV, A.D., BÄUMLEIN, H., BLATTNER, F.R. and MÜNTZ, K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. In: *J. Exp. Bot.* 2003, no.54, p.645-1654.
4. MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. In: *J Exp. Bot.* 1996, no.47, p.605-622.
5. RÜDIGER, H., GABIUS, H.-J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. In: *Glycoconjugate J.* 2001, no.18, p.589-613.
6. PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. In: *Plant Physiol.* 1995, no.109, p.347-352.
7. NACHBAR, M. and OPPENHEIM, J. Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. In: *Amer. J. Clin. Nutr.* 1980, no.33, p.2338-2345.
8. FREED, D.L.J. Do dietary lectins cause disease? In: *BMJ.* 1999, no.318, p.1023-1024.
9. KUMAR, S. et al. Phytohemagglutinins augment red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced allergic manifestations. In: *J. Proteomics.* 2013, no.93, p.50-64.
10. BOLLINI, R., CARNOVALE E., CAMPION, B. Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. In: *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1999, no.3, p.217-219.
11. ROTARI, V.I. et al. Proteinase A-like enzyme from germinating kidney bean seeds. Its action on phaseolin and vicilin. In: *Physiologia Plantarum.* 1997, no.100, p.171-177.

12. JIVOTOVSKAYA, A.V. et al. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure. In: *J. Agric. Food Chem.* 1996, no.44, p.3768-3772.
13. КАРМАНСКИЙ, И. М. Выделение фитогемагглютинина из семян фасоли. В: *Современные методы в биохимии.* / Под ред. В. Н. Орехова. Москва, 1977, с.254-256.
14. VAINTRAUB, I.A. and YATTARA, H.B. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity. In: *J. Agric Food Chem.* 1995, no.43, p.862-868.
15. MORARI, D., STEPURINA, T., ROTARI, V. Acțiunea proteinazei cisteinice endogene CPPh din semințele germinate de fasole asupra fitohemaglutininei. În: *Conferință științifică „Integrarea prin cercetare și inovare”, 26-28 septembrie 2013. Științe naturale, exacte și ingeneresti, USM.* Chișinău: CEP USM, 2013, p. 42-44.