

ACȚIUNEA PROTEINAZEI CISTEINICE ENDOGENE CPPh DIN SEMINȚELE GERMINATE DE FASOLE ASUPRA FITOHEMAGLUTININEI

Diana MORARI, Tatiana STEPURINA, Vitalie ROTARI

Producerea și folosirea proteinelor vegetale în industria alimentară are o importanță majoră pentru asigurarea populației cu alimente. Sursa de proteine care atrage atenția tot mai mult în ultimii ani sunt semințele plantelor leguminoase care conțin o cantitate mare de proteine de rezervă cu proprietăți funcționale bune pentru folosirea izolanțelor proteice ca supliment în produsele alimentare. Însă, pe lângă proteinele de rezervă, aceste semințe conțin cantități destul de ridicate de lectine care în unele specii ajung la 8% din totalul de proteine din cotiledoane. Lectinele sunt proteine capabile să lege reversibil glucidele libere sau glicoproteinele [1]. Până în prezent nu sunt cunoscute funcțiile pe care le îndeplinesc lectinele *in vivo*, însă este cunoscut faptul că prezența acestor lectine în cantități mari are un efect negativ asupra valorii nutritive a produselor alimentare [2]. În special, lectinele plantelor leguminoase cauzează dereglări ale tractului digestiv, fapt care a dus la înaintarea ipotezei, precum că ele servesc în scop de „apărare” a semințelor contra dăunătorilor, în special al insectelor [3]. Lectinele sunt principalele proteine vegetale capabile să recunoască și să lege gliconjugăți prezenți pe suprafața microorganismelor sau expuși în tractul intestinal al insectelor sau mamiferelor erbivore. Această apărare se presupune că se datorează parțial faptului că lectinele sunt rezistente la acțiunea proteinazelor tractului digestiv, fapt ce le permite să interacționeze cu receptori ai celulelor epitelului intestinal și, în acest mod, să declanșeze o reacție inflamatorie [3]. Pe de altă parte, nivelul ridicat al lectinelor în semințe și folosirea lor în procesul de germinare și creștere a plantulei [4] indică că în semințe sunt prezente proteinaze care hidrolizează profund lectinele.

În această ordine de idei, cercetarea proteolizei lectinelor la acțiunea proteinazelor endo- și exogene prezintă interes din punctul de vedere al clarificării sensibilității (sau stabilității) lor la acțiunea proteinazelor.

Este cunoscut faptul că proteina de rezervă 7S din semințele de fasole – fazeolina – este rezistentă la acțiunea proteinazelor [5]. De aceea cercetarea comportării lectinei din semințele de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.) – fitohemaglutinina (PHA) la acțiunea proteinazei endogene CPPh prezintă un interes particular.

Obiectul de cercetare – PHA constă din cinci proteine, fiecare dintre ele este un tetramer cu masa moleculară de 126 kDa, alcătuite din două tipuri de

subunități L și E. Subunitatea L cu masa moleculară 32 kDa are proprietatea de a aglutina leucocitele, iar subunitatea E cu masa moleculară 34 kDa are proprietate de a aglutina eritrocitele [6]. Subunitățile, corespunzător, pot fi numite ca PHA-L și PHA-E. Tetramerii fazeolinei constau din toate combinațiile posibile ale subunităților: L₄, L₃E, L₂E₂, LE₃ și E₄.

PHA a fost obținută după metoda lui Rigas și Johnson în modifi cația lui Karmanski [7], iar CPPh – după metoda proprie [5]. Determinarea proteinei reziduale a fost efectuată după metoda Gofman [8], iar analiza hidrolizatului a fost înfăptuită prin electroforeză în prezența SDS-ului.

CPPh hidrolizează profund fitohemaglutinina și după 48 de ore de hidroliză conținutul proteinei reziduale alcătuiește 12,8%. După cum arată rezultatele SDS-electroforezei, pe parcursul hidrolizei are loc dispariția benzilor corespunzătoare catenelor polipeptidice ale fitohemaglutininei native și apare o grupă de fragmente cu M_r în diapazonul de 28,6-14,2 kDa. Numărul benzilor ce corespund fragmentelor formate la acțiunea CPPh crește de la patru din primele minute al proteolizei, până la șase după 0,5 ore de proteoliză, iar apoi descrește la trei după 24 de ore de proteoliză. Până la 48 de ore de incubare schimbarea numărului și mobilității fragmentelor nu a fost observată.

Proteoliza proteinelor de rezervă decurge în două etape, care se deosebesc între ele după mecanismul proteolizei [9]. La prima etapă, de durată relativ scurtă, are loc o scădere bruscă a proteinei, iar apoi, la etapa a doua, dependența logaritmului concentrației proteinei de timpul hidrolizei devine liniară. Spre deosebire de proteoliza proteinelor de rezervă, proteoliza PHA decurge paralel după ambele mecanisme, ceea ce este demonstrat prin lipsa dispariției complete a benzilor ce corespund PHA native până la 4 ore de hidroliză și de variațiile spectrului de fragmente (detectate la SDS-electroforeză) formate în cursul proteolizei. Deci rezultatele arată că hidroliza PHA are loc conform mecanismului mixt al proteolizei.

Referințe:

1. BARONDES, S.H. Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. În: *Ann. Rev. Bioch.* 1981, no.50, p.207-231.
2. 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, 33, no. 2, p.2338-2345.
3. PEUMANS, W. J. and VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. In: *Plant Physiol.* 1995, no.109, p.347-352.
4. BOYLAND, M.T. and SUSSEX, I.M. Purification of an endopeptidase involved with storage protein degradation in *Phaseolus vulgaris* L. cotyledons. In: *Planta.* 1987, no.170. p.343-352.
5. 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.
6. SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. In: *Glycobiology.* 2004, no.14, p. 53-62.
 7. КАРМАНСКИЙ, И. М. *Выделение фитогемагглютинина из семян фасоли. Современные методы в биохимии.* Под ред. В. Н. Орехова. Москва, 1977, с. 254-256.
 8. 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.
 9. VAINTRAUB, I. Mecanismul hidrolizei enzimaticе a proteinelor. În: *Analele științifice ale USM.* 1996, p.169-172.