

## ELABORAREA PROCEDEULUI DE EXTRAGERE A HELIANTININEI DIN SEMINȚELE DE FLOAREA-SOARELUI

*Maria DUCA, Natalia LAPTEVA\*, Alexei LEVIȚCHI*

*LCȘ „Securitate Biologică”*

*\*LCȘ “Biochimia Proteinelor”*

The necessity of elaboration of a rapid method of helianthinin extract obtaining from a single seed is determined by the aim of individual analysis of homogeneity / polymorphism in sunflower populations. Thus, all the stages of the procedure should assure good quality of extracted protein and a sufficient protein quantity for several electrophoretic analyses and, besides, should to be easy in handling for a huge amount of samplings at hundred order.

Examinând problema privind proteinele de rezervă ale florii-soarelui, cercetătorii au ajuns la concluzia că acestea pot servi drept parametri calitativi utili în descrieri individuale, populaționale, speciale etc [1,2]. Aplicarea pe larg a acestor proteine în cercetări în calitate de parametri biochimici este determinată de simplitatea relativă de a lucra cu ele și de prețul relativ scăzut al implementării metodei [3].

Procedeul se bazează pe tehnici de biochimie vegetală și poate fi utilizat în agricultură pentru determinarea purității genetice a liniilor cosangvinizate de floarea-soarelui, calculată în baza spectrelor electroforetice ale heliantininei. La baza elaborării au stat lucrările efectuate de către Anisimova et al. [4,5], care utilizează metoda de extragere a heliantininei elaborate de ei pentru determinarea purității genetice a liniilor și identificarea genotipurilor, precum și lucrările lui Vaintraub și Lapteva [6], Artâcov [7], care au elaborat o metodă de extragere și purificare a extractului de heliantinină. Pentru realizarea design-ului extragerii și purificării heliantininei au fost combinate diferite etape ale ambelor metode.

Heliantinina, proteina de rezervă majoră a florii-soarelui, este reprezentată de o globulină oligomeră. Masa moleculară determinată de cercetători prin metode diferite constituie 300-305 kDa [8,9]. După caracteristicile hidrodinamice, forma moleculei nu este sferică. La electroforeză, în condiții denaturante, aceasta se caracterizează prin apariția unei serii de polipeptide cu masa moleculară între 20-40 kDa, la al căror nivel poate fi pus în evidență polimorfismul sau uniformitatea semințelor genotipului analizat [5].

### Material și metode

Analiza individuală a fost efectuată asupra semințelor decojate prealabil care fac parte din diferite genotipuri de floarea-soarelui, oferite de către AȘP „Magroselect” SRL (or.Soroca), în persoana dr.hab. T. Rotaru. Semințele se află în perioada de repaos fiziologic, fiind păstrate și uscate. Semințele se decojau în prealabil.

Analiza electroforetică a fost efectuată în baza metodei elaborate de Laemmli [10]. Concentrația gelului de poli(acrilamidă) (GPAA) a fost de 12 și 14%. După electroforeză, gelul a fost plasat în soluția de fixare și apoi colorat în soluția Coumassie 250G [11]. Decolorarea gelului s-a făcut în soluția de acid acetic 7%.

### Rezultate și discuții

Conform clasificării lui Osborn [12], extragerea fracționată a globulinelor, precum heliantinina, se efectuează în soluții slab saline de NaCl sau KCl. În cazul florii-soarelui au fost propuse mai multe posibilități de extragere a fracției globulinice. Aceasta poate fi sedimentată selectiv prin acidularea mediului până la pH 4,6 și ulterior supusă dializei contra soluției  $\text{CH}_3\text{COONa}$  20 mM la pH 4,6 și separată prin centrifugare [13]. O altă posibilitate este extragerea prin precipitare cu sulfat de amoniu. Joubert [14] a extras fracția proteinelor (11-12)S prin sedimentare cu soluția  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cu saturație de 22-30%. Utilizarea metodei cromatografice la fel permite purificarea fracției globulinice de cea albuminică. Cercetând proteinele florii-soarelui, Sabir et al. [15] au separat albuminele de globuline prin cromatografie pe Sefadex G200, iar Schwenke et al. [16] au utilizat cromatografia dublă pe DEAE Sefadex A50. Rahma și Narasinga [17] au propus utilizarea cromatografiei pe Sepharose 6B pentru purificarea globulinei 12 S după precipitarea selectivă cu sulfat de amoniu.

Varietatea de metode elaborate de extragere și purificare a extractului de heliantinină este limitată de unele probleme, printre care denaturarea proteinei și insolubilitatea ei. Acestea sunt determinate de prezența unor

substanțe, cum sunt fitatul și acidul clorogenic (AC). Multe proteine formează cu acidul fitic și fitina (sărurile de Ca, Mg și K ale acidului fitic) complexe insolubile [18]. Formarea complexelor proteină-fitat are loc în mediul acid (pH 2-3) și coincide cu protonarea grupărilor carboxilice ale proteinei. Titrarea turbidimetrică a complexului heliantinină-fitat a demonstrat insolubilitatea lui practic completă la pH 2,0 [19].

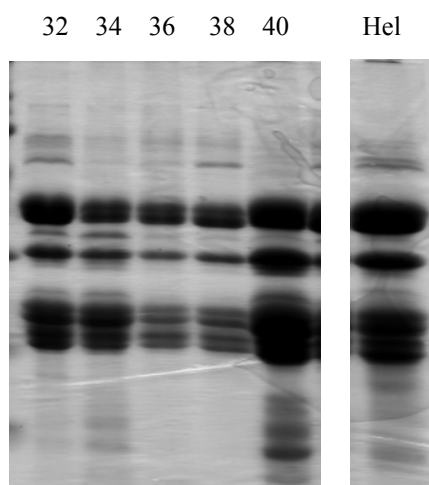
Utilizarea etapei cromatografice de purificare ar permite eliminarea polifenolilor liberi din extractele obținute. Aceasta au relatat Sabir [15], Baudet și Mosse [20] care eliminau acidul clorogenic liber din extractele proteice din semințele de floarea-soarelui. Ultimii autori au reușit totodată să separe parțial globulinele de albumine. Raymond et al. [21] au descris metoda de fracționare a proteinelor florii-soarelui pe octilsepharose CL-4B, care permite și eliminarea acidului clorogenic din extract.

Însă, utilizarea cromatografiei în scopul nostru este imposibilă, deoarece necesită cheltuieli considerabile de timp și materiale, ceea ce nu este admisibil și laborios. Astfel, a fost necesar de a efectua extragerea în astfel de condiții, care să permită să fie eliminat AC și fitatul. În mediul acid nu are loc oxidarea acidului clorogenic, iar cantitatea maximă de fitat se extrage într-un interval relativ mic de pH – 4,0-5,0. Totodată, solubilitatea proteinei este minimă la pH 4,0. Conform datelor izoelectrofocalizării, punctul izoelectric al Hel se află la pH 4,7 [8,9]. Coincidența valorilor de pH, care corespunde maximului de solubilitate a fitatului și minimului de solubilitate pentru proteină, permite eliminarea prealabilă a fitatului la tratarea materialului vegetal cu apă acidulată la acest pH [7].

Pentru eliminarea fitatului și acidului clorogenic [22,23], materialul vegetal este spălat cu apă la pH 5,0 (maximul de solubilitate a fitatului și punctul izoelectric al heliantininei) [19]. Pentru reprimarea activității polifenoloxidazelor, în soluție se adaugă 1mM EDTA, 0,1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> [24] și acid ascorbic [25,26].

Semințele de floarea-soarelui conțin o cantitate considerabilă de lipide, care determină anumite incomodități pe parcursul extragerii și purificării proteinei. În special, formarea unei faze lipidice după centrifugările extractului împiedică colectarea unui volum mai mare de extract, respectiv duce la pierderea cantitativă a heliantininei. Pentru înlăturarea sau micșorarea acestei fracții s-a propus degresarea prealabilă a semințelor în acetonă. Astfel, inițial se efectuează macerarea seminței în acetonă, iar apoi eprubetele se lasă pentru 2 ore în frigider. După care eprubetele se centrifughează, iar supernatantul se decantează. Datorită proprietății de a se dizolva în solvenți organici, o mare parte din lipide se înlătură împreună cu acetona decantată.

La extragerea cu soluție de sulfat de amoniu cu saturația de 32% din precipitat sunt eliminate impuritățile proteice, iar cristaloizii care conțin heliantinina rămân în sediment. A fost realizată extragerea comparativă cu soluțiile de sulfat de amoniu cu saturația de 32, 34, 36, 38 și 40%. În rezultat, concentrația de 32% a fost considerată cea mai optimă, datorită faptului că electroforeza a prezentat o imagine maximal asemănătoare cu spectrele heliantininei denaturate obținute de alți cercetători [4,7,27] (Fig.1).



**Fig.1.** Spectrele electroforetice obținute la extragerea în soluții cu salinitate diferită de sulfat de amoniu în GPAA 12%:

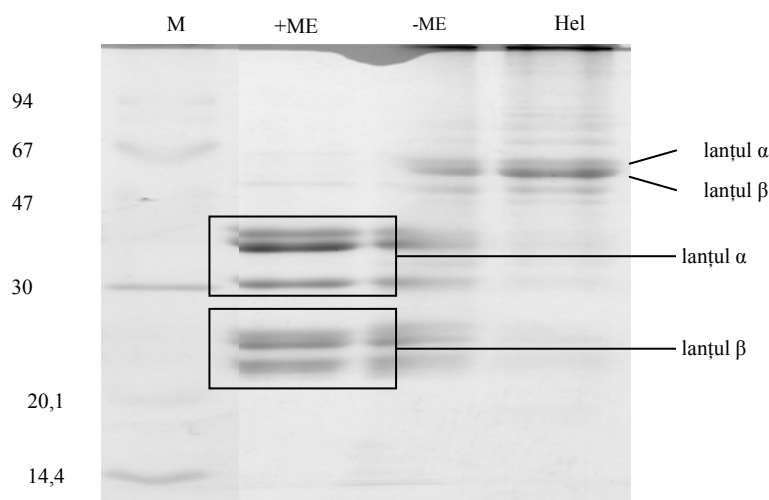
32, 34, 36, 38, 40 – procentul de salinitate a sulfatului de amoniu; Hel – extractul heliantininei (obținut prin metoda descrisă de Artăcov).

Ulterior, are loc extragerea heliantininei din sediment prin solubilizare cu 1 ml soluție de NaCl 10%. Astfel, heliantinina, fiind globulină, trece în soluție și, după centrifugare, din supernatantul obținut se colectează câte cca 0,9 ml în eprubete curate. După spălarea cu sulfat de amoniu și extragerea cu NaCl, conținutul acidului clorogenic în preparat constituie cca 0,5% din proteină [7].

Din extractul obținut proteina se precipită cu ajutorul soluției de acid tricloracetic (ATA) de 50%. Acesta se adaugă în volum, astfel ca concentrația lui finală să fie de cca 5-7%. Sedimentarea se efectuează la rece timp de cca 2 ore (sau peste noapte). Proteina se sedimentează pe fundul eprubetei și pereții ei. Aceasta permite spălarea sedimentului, după centrifugare, cu soluție de acetonă răcită prin vortexare. După decantarea acetonei, se adaugă eter pentru o spălare adăugătoare și uscarea proteinei la temperatura camerei.

O etapă intermediară importantă a fost stabilirea corespunderii polipeptidelor în condiții denaturante (Fig.1) și native (Fig.2) ale heliantininei obținute. Astfel, heliantinina în condiții native a disociat în două subunități  $\alpha$  și  $\beta$ , cu masele moleculare relative 56-57 și, respectiv, 54-55 kDa. Astfel, masa moleculară relativă a Hel, calculată empiric, este de cca 330-340 kDa.

Analizele electroforetice efectuate au demonstrat că extractul de heliantinină obținut a fost calitativ și suficient pentru scopul propus, iar utilizarea gelului de poliacrilamidă de 14% permite separarea și analiza mai reușită a spectrelor polipeptidice ale heliantininei (*a se vedea* Tabelul, date nepublicate). Aceasta prezintă și un șir de avantaje față de metoda descrisă de Anisimov [4], care este cea mai apropiată după esența sa.



**Fig.2.** Verificarea purității heliantininei extrase în condiții denaturante (+ME) și native (-ME):

M – marker proteic, kDa; Hel – heliantinina extrasă prin metoda Artăkov;  
ME –  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Tabel**

**Diferențele dintre metoda Anisimov și metoda elaborată**

Criteriul	Metoda Anisimova	Metoda elaborată
Durata extragerii	3-4 diurne	1-2 diurne
Etapete extragerii	lipsește metodele de purificare a extractului de heliantinină; doar metoda de degresare	sunt prezente mai multe etape de eliminare a impurităților de alte fracții proteice, lipide și compuși fenolici
Cantitatea de material extras	0,15-0,25 ml soluție de proteine dizolvate cu concentrația 1,5-4,0 mg/ml	cca 1 mg de heliantinină cu concentrația 10 mg/ml
Concentrația GPAA	12,5%	14%

Deci, prezenta elaborare reprezintă un procedeu rapid și relativ ușor de extragere a heliantininei în baza căreia se va determina puritatea genetică a liniilor consangvinizate și care ar asigura o precizie înaltă de deter-

minare a uniformității din cadrul liniilor de floarea-soarelui. Testările ulterioare ale diferitelor genotipuri de floarea-soarelui, pe lângă aspectul lor aplicativ pentru programele de selecție a florii-soarelui, vor avea și o importanță științifică, deoarece vor elucida polimorfismul populațional în baza heliantininei și, totodată, vor permite cercetarea geneticii heliantininei, dat fiind faptul că până în prezent sunt foarte puține informații la acest subiect.

#### Referințe:

1. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. - Москва: Колос, 1983. - 320 с.
2. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. - Москва: Наука, 1985.
3. Chenuil A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects // *Genetica*. - 2006. - Vol.127. - P.101-120.
4. Анисимова И.Н. Идентификация сортов, линий и гибридов подсолнечника по составу полипептидов гелиантинина // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. - 1987. - Т.114. - С.114-126.
5. Анисимова И.Н., Гаврилюк И.П. Гетерогенность и полиморфизм 11 S-глобулина семян подсолнечника // *Генетика*. - 1989. - Т.XXV. - №7. - С.1248-1255.
6. Vaintraub I.A., Lapteva N.A. Protein isolates from sunflower cake: problems and solutions. - Proc. of the Intern. Compositae Conference, Kiev. - 1994. - Vol.2. - P.617-626.
7. Artâcov G. Ameliorarea proprietăților funcționale ale proteinelor din semințele de floarea-soarelui prin modificarea proteolitică Autoreferat al tezei de doctor în științe biologice. - Chișinău, 2003. - 18 p.
8. Schwenke K.D., Pahtz W., Linov K.J., Raab B., Schultz M. Purification, chemical composition and some physico-chemical properties of the 11S globulin (Helianthinin) in sunflower seed // *Nahrung*. - 1979. - Vol.23. - P.241-254.
9. Dalgarrondo M., Raymond J., Azanza J.L. Sunflower seed proteins: characterization and subunit composition of the globulin fraction // *J. Exptl. Bot.* - 1984. - Vol.35. - No160. - P.1618-1628.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. - 1970. - Vol.227. - No5259. - P.680-685.
11. Duca M., Savca E., Port A. Fiziologia vegetală. - Chișinău, 2001. - 174 p.
12. Osborn T.B. The vegetable proteins. - London, 1924. - 154 p.
13. Гегэн Ж., Азанза Ж.Л. Биохимические и физико-химические свойства растительных белков. - В кн.: Растительный белок. - Москва: ВО Агропромиздат, 1991, с.149-175.
14. Joubert F.J. Sunflower seed proteins // *Biochem. Biophys. Acta*. - Vol.16. - 1955. - P.520-523.
15. Sabir M.A., Sosulski F.W., McKenzie S.L. Gel chromatography of sunflower proteins // *J. Agric. Food Chem.* - 1973. - Vol.21. - P.988-993.
16. Schwenke K.D., Pahtz W., Linov K.J., Raab B., Schultz M. Purification, chemical composition and some physico-chemical properties of the 11S globulin (Helianthinin) in sunflower seed // *Nahrung*. - 1979. - No23. - P.241-254.
17. Rahma E.H., Narasinga M.S. Isolation and characterization of the major protein fraction of sunflower seeds // *J. Agric. Food Chem.* - 1981. - Vol.29. - P.518-521.
18. Taha F.S., El-Nockrashy A.S. Low phytate, low chlorogenic acid sunflower seed protein concentrate // *Nahrung*. - 1981. - Vol.25. - No8. - P.759-764.
19. Bulmaga V.P., Lapteva N.A., Vaintraub I.A. The effect phytate on the solubility of sunflower seed proteins // *Nahrung*. - 1989. - Vol.33. - P.161-165.
20. Baudet J., Mosse J. Fractionation of sunflower seed proteins // *J. Am. Oil. Chem. Soc.* - 1977. - Vol.54. - P.82A-86A.
21. Raymond J., Azanza J.L., Fotso M. Hydrophobic interaction chromatography: a new method for sunflower protein fractionation // *J. of Chromatography*. - 1981. - Vol.212. - P.199-209.
22. Gheyasuddin S., Cater C.M., Mattil R.F. Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins // *J. Food Sci.* - 1970. - Vol.35. - P.453-456.
23. Cater C.M., Gheyasuddin S., Mattil R.F. Effect of chlorogenic, quinic and caffeic acids on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seeds // *Cereal Chem.* - 1972. - Vol.42. - P.508-514.
24. Stores D.M., Anderson J.W., Rowan K.S. Oxidation of chlorogenic acid in the presence of reducing agents // *Phytochemistry*. - 1968. - Vol.7. - P.1509-1511.
25. Milic B., Stojanovic S., Vucurevic N., Turcic M. Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal // *J. Sci. Food Agric.* - 1968. - Vol.19. - No2. - P.108-111.
26. Бузун Г.А. Выделение ферментов из растений в присутствии эндогенных фенолов // *Успехи Биол. Химии*. - 1972. - С.102-105.
27. Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Том 1. - Москва: Колос, 1993, с.287-289.

Prezentat la 18.07.2007