

ANALIZA HIDROLIZEI VICILINEI ȘI FAZEOLINEI DE CĂTRE PAPAİNĂ LA pH ACID

Tatiana STEPURINA, Natalia GAȘINA, Diana MORARI, Vitalie I. ROTARI

LCȘ „Biochimia Plantelor”

The vicilin and phaseolin proteolysis by papain at acidic pH has been studied *in vitro*. It has been found that vetch vicilin is practically completely degraded at pH 4.6. The phaseolin hydrolysis differs from that of vicilin, phaseolin being only modified by papain. This modification results in the formation of fragments that correspond to half subunits of native phaseolin that are resistant to further action of papain. These fragments remain associated in molecule's quaternary structure producing phaseolin-Pap. The phaseolin modified at pH 4.6 becomes insoluble, while at pH 5.6 it is soluble. These findings show that while the action of papain on vicilin is similar to the action of endogenous papain-like proteinases its action on phaseolin is slightly different.

Proteinele de rezervă (PR) din semințele plantelor leguminoase, în general [1], și cele din semințele de fasole, în particular [2], reprezintă o sursă importantă de proteine pentru alimentație. Plantele leguminoase au semințe cu un conținut de proteine mare și PR au atras o atenție deosebită în ultimii ani, dat fiind că au proprietăți „funcționale” (fizico-chimice) importante pentru folosirea lor în produsele alimentare [1]. Deși fasolele reprezintă o plantă cultivată în toată lumea atât pentru alimentație, cât și pentru furaj, folosirea ei este limitată de unele aspecte toxicologice [3]. Aceasta previne folosirea lor în diete [4].

Proteinele din semințele plantelor leguminoase diferă după valoarea lor nutritivă. Valoarea lor nutritivă este afectată de mai mulți factori, unul din principalii fiind susceptibilitatea lor la acțiunea proteinazelor tractului digestiv [6]. Prezența proteinelor cu o digestibilitate scăzută are o implicație negativă asupra nutriției [7]. De asemenea, a fost arătat că PR stabile reprezintă alergeni majori în produsele vegetale [8].

Gradul și viteza scindării a câtorva PR reprezentative ale leguminoaselor sunt relativ rapide [5]. O excepție în această privință este fazeolina, proteina 7S din semințele de fasole, a cărei hidroliză la acțiunea proteinazelor digestive se oprește după clivarea unui număr mic de legături peptidice (modificarea limitată a moleculei), care rezultă cu formarea fragmentelor cu masă moleculară ce corespunde jumătății subunităților fazeolinei [9]. Această rezistență a fazeolinei la acțiunea proteinazelor a fost atribuită particularităților structurii ei, care o deosebesc de alte proteine de rezervă [9,10].

Acesta și este temeiul care suscită atenția atrasă în acest aspect fazeolinei. Deoarece fazeolina este mobilizată în decursul germinării semințelor de fasole pentru a aproviziona germenul cu aminoacizi, se credea că în semințele germinate se conțin proteinaze care pot hidroliza complet fazeolina. Căutarea acestor proteinaze a rezultat în purificarea și caracterizarea parțială a trei proteinaze cisteinice – CPPh, legumaina și proteinaza A [10,11,12], însă nici una din ele nu hidroliza complet fazeolina. Numai acțiunea consecutivă a legumainei și CPPh duce la scindarea completă a fazeolinei [13]. Până în prezent nu a fost detectată nici o proteinază care să efectueze proteoliza profundă a fazeolinei. Deoarece majoritatea cercetărilor acțiunii proteinazelor exogene asupra fazeolinei s-au efectuat cu proteinaze digestive și la un pH care nu este caracteristic vacuolelor, am decis să cercetăm acțiunea asupra fazeolinei a unei proteinaze cisteinice, și anume: a papainei, la un pH acid, care este caracteristic vacuolelor [14].

Material și metode

Material. În această lucrare a fost folosită papaina (Sigma) cristalizată de două ori. Activitatea papainei la diferite pH-uri a fost determinată cu substratul sintetic Bz-Phe-Val-Arg-pNA·HCl [15]. A fost stabilit că papaina este activă în diapazonul de pH 4,6–8,0, având o activitate aproximativ egală la pH 4,6 și 5,6 – 113,6 și 113,2 mU/mg, corespunzător. Toate celelalte reactive erau de grad analitic.

Prepararea proteinelor. Pentru experimente au fost folosite PR extrase din semințele mature de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.) și mazărice (*Vicia sativa* L.). Fazeolina a fost izolată din semințele de fasole după metoda lui Schlesier și al. [16]. Vicilina din mazărice a fost izolată după cum a fost descris în [10].

Proteoliza proteinelor. Vicilina (2%) în soluție-tampon 120 mM fosfat-citrat, 180 mM NaCl, pH 4,6, care conținea 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA și 0,02% NaN₃, a fost amestecată cu un volum egal de papaină în aceeași soluție-tampon în raport de 1:50 și 1:200. Reacția a fost incubată timp de 48 ore la 30°C.

Fazeolina (2%) în soluție-tampon 120 mM fosfat-citrat, 180 mM NaCl, pH 4,6 și 5,6, care conținea 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA și 0,02% NaN₃, a fost amestecată cu un volum egal de papaină în aceeași soluție-tampon în raport 1:50. Reacția a fost incubată timp de 48 ore la 30°C.

Proteoliza ambelor proteine a fost repetată cel puțin de două ori. La anumite intervale de timp au fost luate probe pentru analiza electroforetică (SDS și nativă), precum și pentru determinarea proteinei reziduale (insolu-

bile în acid tricloracetic). În probele luate pentru electroforeza nativă reacția a fost oprită prin adăugarea I-acetatului de sodium, inhibitor al proteinazelor cisteinice din familia papainei, la concentrația de 0,1 mM. Proteina a fost determinată prin metoda de legare a colorantului brom-fenol albastru [17]. Copiile (4-5) determinărilor efectuate cu fiecare probă coincideau în diapazonul de 0,01 unități de absorbție.

Electroforeza în gel de poli(acrilamidă) (GPAA). Electroforeza în prezența dodecil-sulfatului de sodium (SDS) (electroforeza SDS) a fost efectuată în GPAA de 12,5% conform metodei Laemmli [18]. Fosforilaza b (94 kDa), albumina serului bovin (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anhidraza carbonică (30 kDa), inhibitorul Kunitz al tripsinei din soia (20,1 kDa) și α -lactoglobulina (14,4 kDa) au fost folosite ca standarde pentru determinarea masei moleculare (M_r). Gelurile au fost colorate cu Coomassie brilliant blue G-250 conform procedurii standard.

Electroforeza în condiții native în gradientul GPAA a fost efectuată într-un gradient vertical (4-30%) al GPAA folosind sistema de soluție-tampon 90 mM Tris-borat, pH 8,4. Electroforeza a durat 4500 Vh. Fazeolina (140 kDa) și albumina serului bovin (67 kDa) au fost folosite ca standarde pentru determinarea M_r . Procentul proteinei reziduale a fost calculat din descreșterea M_r . Gelurile au fost colorate cu Coomassie brilliant blue R-250 conform procedurii standard.

Rezultate

Hidroliza vicilinei și fazeolinei. La acțiunea papainei, în raport de 1:200, pH 4,6, conținutul vicilinei reziduale scade în timpul primelor 4 ore de hidroliză, iar apoi rata degradării se micșorează (Fig.1). Rezultate similare au fost obținute și la raportul enzimă:proteină de 1:50 (nu este arătat). Gradul final de hidroliză este de 66%.

La acțiunea papainei, în raport de 1:50, pH 4,6, conținutul fazeolinei reziduale practic nu se schimbă în timpul primelor 2 ore de hidroliză (Fig.1), iar apoi proteina începe a se sedimenta și nu poate fi determinată prin metoda dată. Gradul final de hidroliză atins în acest interval de timp este de numai 1%. La pH 5,6 pe parcursul proteolizei nu se formează sediment. La acest pH conținutul fazeolinei reziduale la acțiunea papainei scade pe tot parcursul hidrolizei (Fig.1), atingând un grad final de hidroliză de 21%.

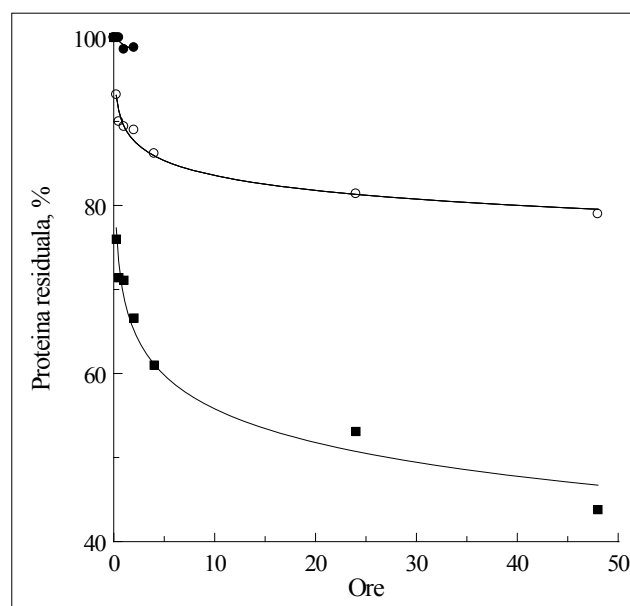


Fig.1. Cinetica proteolizei vicilinei și fazeolinei la acțiunea papainei: hidroliza vicilinei la pH 4,6 (■); hidroliza fazeolinei la pH 4,6 (●); hidroliza fazeolinei la pH 5,6 (○). Condițiile hidrolizei sunt descrise în Material și Metode. Concentrația inițială a proteinei este luată drept 100%.

Electroforeza SDS a proteinei reziduale. Electroforeza SDS a arătat că intensitatea benzilor ce corespund catenelor polipeptidice native ale vicilinei sunt hidrolizate foarte rapid de către papaină la pH 4,6. La raportul enzimă:proteină de 1:50 ele nu pot fi observate nici după 5 minute de incubare (nu este arătat). De aceea, am micșorat raportul enzimă:proteină la 1:200. Chiar și în aceste condiții catenele inițiale ale vicilinei sunt clivate complet în decurs de 15 minute de hidroliză (Fig.2). În rezultatul hidrolizei sunt formate fragmente cu M_r în diapazonul 48,4 kDa – 13,6 kDa (Fig.2). Aceste fragmente apar deja după amestecarea proteinei cu enzima și sunt foarte evidente la 0,25 ore de hidroliză și tot atunci dispar benzile corespunzătoare catenelor polipeptidice native ale vicilinei. După 0,5 ore de hidroliză sunt prezente 4 fragmente majore cu M_r de 48,4, 30,3, 24,2 și 21,2 kDa. Aceste fragmente intermediare sunt modificate pe parcursul hidrolizei și după 4 ore de hidroliză spectrul fragmentelor formate începe a se scimba. După 48 ore de hidroliză numărul fragmentelor formate este de șase cu M_r de 35,7, 27,4, 23,1, 21,0, 15,4 și 13,6 kDa. Spectrul electroforetic final al fragmentelor vicilinei este arătat în Figura 2.

Electroforeza SDS a arătat că, spre deosebire de vicilină, intensitatea benzilor ce corespund catenelor polipeptidice native ale fazeolinei sunt mai rezistente la acțiunea papainei. La raportul enzimă:proteină de 1:50 ele dispar complet numai după 24 ore de hidroliză la ambele pH-uri (Fig.2). După 15 minute de hidroliză apar fragmente care au M_r aproape de jumătate din subunitățile native. Aceste fragmente au același aspect la ambele pH-uri, dar diferite M_r . La pH 4,6 după 0,5 ore de hidroliză fragmentele se împart într-o grupă intensă, care nu se separă cu M_r în diapazonul 28,2 – 24,7 kDa, și un fragment cu M_r de 22,5 kDa. După 48 ore de hidroliză M_r a acestor fragmente se schimbă foarte puțin, ajungând în diapazonul 28,1 – 24,2 kDa și 22,1 kDa, corespunzător. La pH 5,6 după 0,5 ore de hidroliză fragmentele de asemenea se împart într-o grupă intensă, care nu se separă cu M_r în diapazonul 28,0 – 24,4 kDa, și un fragment cu M_r de 22,5 kDa. Însă, după 48 ore de hidroliză M_r a acestor fragmente se schimbă în trei fragmente cu M_r de 25,9, 23,8 și 21,5 kDa, corespunzător. Ceea ce arată că la pH 5,6 este o creștere ușoară, dar apreciazabilă, în mobilitatea fragmentelor formate. La hidroliza fazeolinei nu au fost observate fragmente intermediare. Spectrul electroforetic final al fragmentelor fazeolinei formate la ambele pH-uri este arătat în Figura 2.

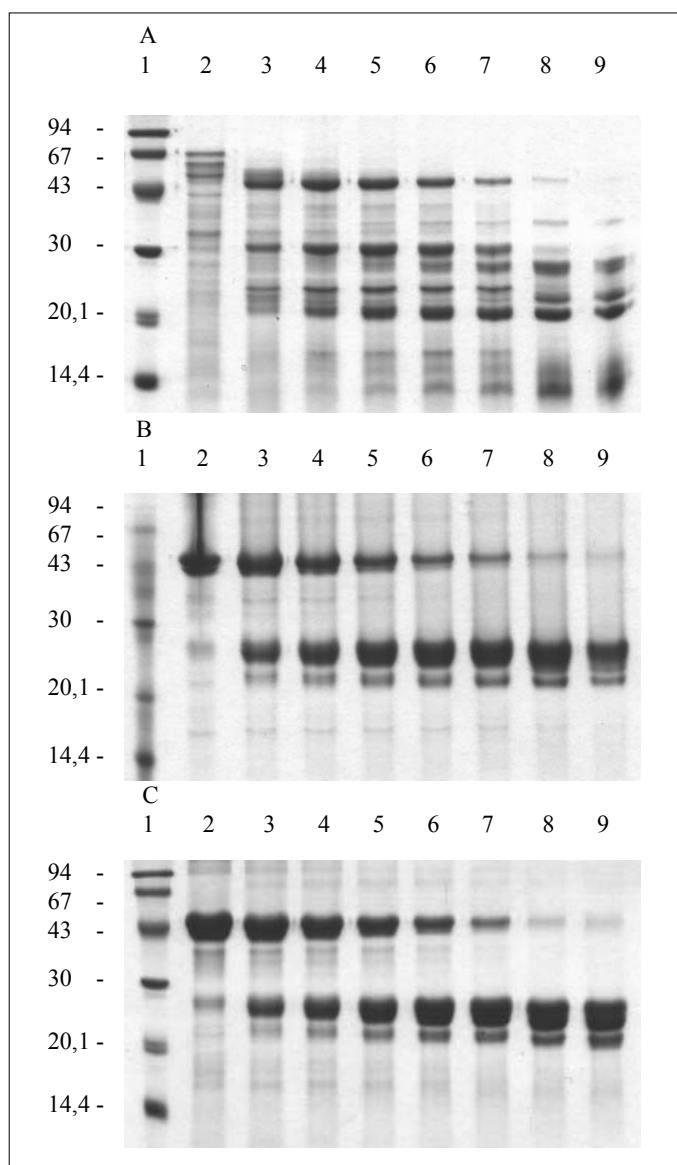


Fig.2. Spectrul SDS-electroforetic al vicilinei și fazeolinei pe parcursul desfășurării hidrolizei lor la acțiunea papainei.

A – Hidroliza vicilinei la pH 4,6. B – hidroliza fazeolinei la pH 4,6. C – hidroliza fazeolinei la pH 5,6: 1 – proteinele standard (M_r (în kDa) sunt arătate la stânga); 2-9 – 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 24 și 48 ore. Condițiile hidrolizei sunt descrise în Material și Metode.

Electroforeza nativă a fazeolinei modificate. Electroforeza în gradientul de pori al GPAA a arătat că fazeolina modificată își menține structura cuaternară după hidroliza cu papaina la ambele pH-uri (Fig.3). La pH 4,6 M_r a fazeolinei modificate de papaină descrește de la 140 la 131,9, 123, și 117 kDa după 0,5, 4 și 48 ore de hidroliză, corespunzător, iar la pH 5,6 la 131,9, 123 și 111,3 kDa aceasta reprezintă o diminuare a M_r după 48 ore de hidroliză cu aproximativ 16% la pH 4,6 și 21% la pH 5,6, corespunzător. Produsul final cu masă moleculară mare a fazeolinei hidrolizate de papaină va fi ulterior numit fazeolina-Pap (pentru a fi deosebit de produsul fazeolinei format la acțiunea pepsinei, numit fazeolina-P [9]).

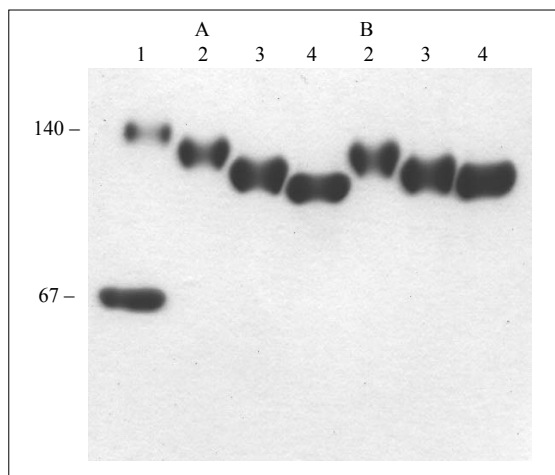


Fig.3. Electroforeza nativă a fazeolinei modificate de papaină în gradient al GPAA.

A și B – hidroliza fazeolinei de către papaină la pH 5,6 și 4,6, corespunzător:

1 – proteinele standard (M_r (în kDa) sunt arătate la stânga);
2-3 – 0,5, 4 și 48 ore.

Discuții

Determinarea conținutului total al proteinei la acțiunea papainei la pH 4,6 a arătat că vicilina este hidrolizată profund, în timp ce hidroliza fazeolina, până la apariția precipitatului, este neînsemnată. Această acțiune a papainei asupra fazeolinei se deosebește nu doar de acțiunea papainei asupra vicilinei, dar și de acțiunea proteinazei endogene CPPh asupra fazeolinei [10]. De aceea, am hotărât să cercetăm acțiunea papainei asupra fazeolinei la pH 5,6, la care fazeolina este hidrolizată complet de acțiunea consecutivă a proteinazelor cisteinice endogene CPPh și LLP [13]. După cum arată rezultatele obținute la acest pH, fazeolina modificată nu cade în precipitat.

Rezultatele noastre denotă că acțiunea papainei asupra vicilinei se aseamănă cu cea a proteinazei endogene CPPh, pe când acțiunea ei asupra fazeolinei se deosebește [10]. Dacă vicilina este hidrolizată complet, atunci fazeolina modificată la pH 4,6 devine insolubilă și numai la pH 5,6 ea rămâne solubilă pe tot parcursul hidrolizei. Însă, dacă la acțiunea proteinazei endogene CPPh fazeolina este degradată doar 9%, atât la pH 4,6, cât și la pH 5,6 [10,13], atunci papaina la pH 5,6 hidrolizează 21% de fazeolină. Fazeolina este cunoscută ca fiind foarte rezistentă la proteoliză [9,10,11,12,13] și până în prezent un grad atât de înalt de hidrolizare a fazeolinei a fost observat doar la acțiunea tripsinei [9].

Fazeolina este un trimer format din trei tipuri de subunități similare, numite β , α , și α' care constau din 397, 411 și 412 aminoacizi, respectiv [19]. Fiecare subunitate are două situsuri potențiale de glicozilare [20] și ambele specii glicozilate, la un situs și la ambele situsuri, sunt cunoscute că există *in vivo* [21], ceea ce cauzează aparența heterogenității moleculare a subunităților fazeolinei [22]. Ca rezultat, la electroforeză în prezența SDS-ului fazeolina poate fi separată în patru polipeptide, numite clase de mărime [23], cu M_r de la 45 la 52 kDa. Însă, aceste benzi se observă ușor doar la raportul acrilamidă:metilenbis(acrilamidă) de 200:1 [24], iar în condiții obișnuite [18] de obicei se observă doar două benzi inițiale.

Hidroliza fazeolinei rezultă cu formarea fragmentelor stabile la ambele pH-uri. Spectrul acestor fragmente nu se schimbă pe parcursul hidrolizei, iar M_r și intensitatea lor se schimbă ușor. Luând în considerație M_r a fragmentelor de fazeolină formate, putem presupune că scindarea ei la acțiunea papainei are loc în porțiunea de mijloc a subunităților fazeolinei. Nielsen și al. [5] au constatat că după 30 minute de hidroliză la pH 6,2 fazeolina este slab hidrolizată de papaină. În aceste condiții, pe lângă fragmentele ce corespund jumătăților de subunitate, se mai formează două grupe de fragmente: una cu M_r de aproximativ 35 kDa și alta în jurul la 14 kDa. În experimentele noastre la pH 4,6 și 5,6 nu am observat formarea acestor fragmente. Fragmentele formate la acțiunea papainei la aceste două pH-uri se aseamănă cu cele ce se formează la acțiunea proteinazei cisteinice endogene CPPh [10]. Mărimea fragmentelor, ca și lipsa produșilor intermediari ai scindării subunităților, arată că atacului proteolitic pot fi supuse numai sectoarele relativ scurte terminale și cel central al moleculei fazeolinei. Spre deosebire de fazeolină, hidroliza vicilinei cu papaina nu rezultă în generarea de fragmente majore stabile. Pe parcursul primelor patru ore de hidroliză se formează fragmente cu M_r în diapazon de la 48,4 kDa la 21,2 kDa, care dispar treptat și apar alte fragmente cu M_r în diapazon de la 35,7 kDa la 13,6 kDa.

Degradarea a 21% de fazeolină la pH 5,6, precum și scăderea M_r a fragmentelor indică clivarea de către papaină a unui număr considerabil de peptide. În cazul proteinazei CPPH a fost stabilit că fazeolina modificată își reține structura terțiară și cuaternară [10]. Rezultatele electroforezei native în gradient al GPAA au arătat că fazeolina modificată de papaină de asemenea își reține structura terțiară și cuaternară. Mai mult decât atât, aceasta are loc la ambele pH-uri. La pH 5,6 21% din masa moleculei au fost pierdute la hidroliză, iar la pH 4,6 – 16%. La pH 5,6 un procent asemănător a fost obținut și la determinarea proteinei reziduale. Însă, la pH 4,6 determinarea proteinei reziduale la începutul formării sedimentului arată că proteina este practic nehidrolizată, pe când determinarea M_r după rezultatele electroforezei native arată că ea se schimbă treptat pe parcursul hidrolizei. Deci, modificarea fazeolinei la acest pH provoacă expunerea unor porțiuni hidrofobe a moleculei care o face să se precipiteze.

La germinarea semințelor PR sunt hidrolizate până la aminoacizi, care servesc drept precursori pentru biosinteza noilor proteine ale plantulei, precum și a altor compuși ce conțin nitrogen. Proteinazele cisteinice (EC 3.4.22) sunt principalele proteinaze prezente în cotiledoane în timpul germinării semințelor plantelor dicotiledonate și sunt considerate principalele proteinaze responsabile de mobilizarea PR [25,26]. Ele se împart în două familii: una care cuprinde enzime cu specificitate mică din familia papainei și alta care cuprinde enzime Asn – enzime specifice din familia leguminei. Proteinazele papainice hidrolizează PR până la peptide scurte [10,25]. O excepție în această privință reprezintă fazeolina, care la acțiunea acestor proteinaze este doar modificată limitat prin clivarea subunităților în două părți aproximativ egale și înlăturarea unui număr mic de peptide scurte ce rezultă în modificarea structurii cuaternare a moleculei fazeolinei, pe când cea mai mare parte a moleculei fazeolina este remarcabilă prin rezistența ei la acțiunea enzimelor proteolitice [10,12]. Elucidarea cauzelor acestui comportament neobișnuit al fazeolinei prezintă un deosebit interes teoretic și practic.

Studierea hidrolizei proteinelor la acțiunea papainei a arătat că aceasta, în comparație cu alte enzime de proveniență animalieră sau microbiană, scindează mai profund proteinele [27]. Smith și Kimmel [28] au ajuns la concluzia că papaina are capacitatea de a hidroliza practic toate legăturile peptidice, cu excepția legăturilor Pro și Glu cu o grupă carboxilică în stare disociată. O caracteristică aparte a papainei este capacitatea ei de a-și păstra activitatea într-un larg interval de temperatură și pH [28]. De aceea, cercetarea acțiunii comparative a papainei asupra PR prezintă un interes deosebit în vederea clarificării cauzei rezistenței fazeolinei la proteoliză.

În prezenta lucrare noi arătăm că o acțiune asupra fazeolinei, similară endoproteinazelor papainice, are și papaina – proteinaza de reper a întregii familii. Astfel, papaina hidrolizează fazeolina nativă *in vitro* catalizând doar proteoliza limitată a acestui substrat. Metoda folosită nu permite detectarea schimbărilor la capătul carboxi-terminal al subunităților fazeolinei. Însă, este posibil ca câteva legături peptidice să fi fost scindate în segmentele carboxi-terminale dezordonate. Acțiunea papainei asupra fazeolinei este asemănătoare situației observate și la acțiunea altor proteinaze asupra fazeolinei – atât exogene [9], cât și endogene [10–13]. Astfel, aceste rezultate arată o dată în plus că stabilitatea fazeolinei la hidroliza enzimatică este determinată de proteină însăși. Prin urmare, cauza rezistenței fazeolinei la proteoliză trebuie căutată în particularitățile structurii fazeolinei.

În fiecare moleculă de proteină se află multe legături peptidice capabile să fie scindate [29]. Viteza de scindare a legăturii peptidice este influențată nu doar de resturile aminoacide, care formează această legătură, dar și de resturile aminoacide din vecinătate. Prima etapă a proteolizei o reprezintă scindarea legăturilor peptidice în locul cel mai „sensibil”, aflat la suprafața moleculei. Aceasta este proteoliza non-co-operativă sau limitată [30]. Proteoliza ce va urma depinde de faptul cum va influența scindarea primelor legături peptidice asupra structurii moleculei și poate continua pe două căi diferite. Dacă prima etapă a acțiunii enzimei proteolitice duce la destabilizarea moleculei proteice, atunci proteina va fi scindată complet. Dacă însă proteoliza limitată nu destabilizează structura moleculară a proteinei, atunci hidroliza se oprește [30]. Pentru a deosebi aceste două tipuri diferite de proteoliză, este suficient doar un singur criteriu, acesta fiind formarea sau lipsa fragmentelor înalt moleculare. O analiză detaliată a arătat că atât vicilina, cât și fazeolina la pH 5,6 sunt hidrolizate în două etape. În primele 4 ore de hidroliză are loc o scădere apreciabilă a proteinei reziduale, după care rata degradării se micșorează considerabil. Însă, dacă vicilina este hidrolizată profund după mecanismul mixt, ceea ce este caracteristic majorității PR [30], atunci fazeolina este doar modificată după mecanismul non-co-operativ.

Orice proteinază este capabilă să cliveze câteva segmente flexibile accesibile pe suprafața proteinei. Dacă aceste clivări destabilizează structura proteinei, atunci proteina își pierde structura, ceea ce duce la hidroliza ulterioară nelimitată. Aceste considerente ne permit să expunem explicații plauzibile pentru diferențele observate la proteoliza vicilinei și a fazeolinei. Este evident că clivarea vicilinei destabilizează structura ei și, ca rezultat, se observă o proteoliză profundă. În cazul fazeolinei acest fapt nu are loc, structura ei rămâne stabilă și, ca urmare, hidroliza se oprește. Oprirea hidrolizei fazeolinei doar după scindarea unei părți neînsemnate de proteină demonstrează că, spre deosebire de celelalte PR, la a căror degradare se observă decurgerea paralelă a proteolizei după mecanismul non-co-operativ și co-operativ [30], la acțiunea papainei asupra fazeolinei proteoliza are loc doar după mecanismul non-co-operativ. Toată scindarea proteinei este determinată de îndepărtarea peptidelor scurte prin proteoliza limitată. La pH 4,6 această modificare a fazeolinei produce expunerea unor segmente hidrofobe, ceea ce rezultă în precipitarea ei.

Deoarece problema privind deficiența proteinei în alimentația omului își păstrează actualitatea, rămâne viu interesul manifestat pentru studierea proteinelor vegetale [1,31]. Conform FAO (Food and Agriculture Organization), rația alimentară a oamenilor în toată lumea conține 70% proteine vegetale din culturile cerealiere și boboase, iar celelalte 30% rămase corespund proteinelor de natură animală [32]. Deci, proteinele vegetale prezintă o sursă proteică principală directă, în alimentație, sau indirectă, ca furaj. Semințele, care se caracterizează printr-o valoare nutritivă relativ înaltă, reprezintă o sursă proteică dintre cele mai ieftine și sursă de proteină vegetală de perspectivă pentru producerea produselor alimentare [31]. Cea mai mare parte din aceste proteine le reprezintă PR. Printre factorii care afectează valoarea nutritivă a PR unul dintre cei mai importanți este susceptibilitatea lor la hidroliză [6]. În contrast cu alte PR 7S, fazeolina nativă este foarte rezistentă la proteoliza *in vitro* [5,9–13]. Partea cea mai mare a moleculei fazeolinei este destul de rezistentă la atacul proteolitic. Degradarea ei se oprește după o scurtă proteoliză limitată, în rezultatul căreia este produs un product oligomeric cu masă moleculară mare. La acțiunea atât a proteazelor endogene [10–12], cât și a celor exogene [5,9], proteoliza ei limitată se oprește după ce un număr mic de peptide este înlăturat. O explicație a rezistenței fazeolinei la acțiunea proteazelor a fost dată în baza deosebirii structurii ei terțiare de structura altor proteine 7S omoloage [9–11]. Rezultatele prezentate în această lucrare arată că acțiunea papainei asupra fazeolinei de asemenea poate fi explicată de aceste cauze.

Referințe:

1. Wang T.L., Domoney C., Hedley C.L., Casey R., Grusak M.A. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? // *Plant Physiol.* - 2003. - Vol.131. -P.886-891.
2. Sathe S.K. Dry bean protein functionality // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2002. - Vol.22. - P.175-223.
3. Deshpande S.S., Sathe S.K., Salunkhe D.K. Dry beans of *Phaseolus*: a review. Part 3 // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* - 1984. - Vol.21. - P.137-195.
4. Geil P.B., Anderson J.W. Nutrition and health implications of dry beans: a review // *J. Am. Coll. Nutr.* - 1994. -Vol.13. - P.549-558.
5. Nielsen S.S., Deshpande S.S., Hermodson M.A., Scott M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins // *J. Agr. Food Chem.* - 1988. - Vol.36. - P.896-902.
6. Liener I.E., Thamsom R.M. *In vivo* and *in vitro* studies of the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*) // *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* - 1980. - Vol.30. - P.13-25.
7. Gilani G.S., Cockell K.A., Sepehr E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods // *J. AOAC Int.* - 2005. - Vol.88. - P.967-987.
8. Mills E.N.C., Jenkins J., Marigheto N., Belton P.S., Gunning A.P. and Morris V.J. Allergens of the cupin superfamily // *Biochem. Soc. Transactions.* - 2002. - Vol.30. - P.925-929.
9. Jivotovskaya A., Senyuk V., Rotari V., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure // *J. Agr. Food Chem.* - 1996. - Vol.44. - P.3768-3772.
10. Rotari V., Senyuk V., Jivotovskaja A., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteinase A-like enzyme from germinated kidney bean seeds. Its action on phaseolin and vicilin // *Physiologia Plantarum.* - 1997. - Vol.100. -P.171-177.
11. Senyuk V., Rotari V., Becker C., Zakharov A., Horstmann C., Müntz K. and Vaintraub I. Does an asparaginyl-specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? // *Eur. J. Biochem.* - 1998. - Vol.258. - P.546-558.
12. Rotari V.I. Purificarea și caracterizarea parțială a proteinazei A din semințele germinate de fasole // *Studia Universitatis, ser. "Științe ale naturii"*. - 2007. - Vol.7. - P.133-138.
13. Zakharov A., Carchilan M., Stepurina T., Rotari V., Wilson K., and 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 // *J Exp. Bot.* - 2004. - Vol.55. - P.2241-2249.
14. Müntz, K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles // *J. Exp. Bot.* - 2007. - Vol.58. - P.2391-2407.
15. Vaintraub I.A., Morari D. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation // *J. Biochem. Biophys. Methods* - 2003. - Vol.57. - P.191-201.
16. Schlesier B., Manteuffel R., Armin R., Jüttner G. A simple method for preparation of phaseolin // *Biochem. Physiol. Pflanz.* - 1984. - Vol.179. - P.665-678.
17. Vaintraub, I.A.; Yattara, H.B. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity // *J. Agric. Food Chem.* - 1995. - Vol.43. - P.862-868.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* -1970. - Vol.227. - P.680-685.
19. Lawrence M.C., IZARD T., Beuchat M., Blagrove R.J. and Colman P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins // *J. Mol. Biol.* - 1994. - Vol.238. - P.748-776.
20. Doyle J.J, Schuler M.A., Godette W.D., Zenger V., Beachy R.N. and Slightom J.L. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins // *J. Biol. Chem.* - 1986. - Vol.261. - P.9228-9238.

21. Sturm A., van Kuik J.A., Vliegenthart J.F.G., and Chrispeels M.J. Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol.262. - P.13392-13403.
22. Lioi L., Bollini R. Contribution of processing events to the molecular heterogeneity of four banding types of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. // Plant Mol. Biol. - 1984. - Vol.3. - P.345-353.
23. Bollini R, Vitale A. and Chrispeels M.J. In vivo and in vitro processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum: Evidence for two glycosylation steps // J. Cell Biol. -1983. - Vol96. - P. 999-1007.
24. Stockman D.R., Hall T.C. and Ryan D.S. Affinity chromatography of the major seed protein of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Plant Physiol. - 1976. - Vol.58. - P.272-275.
25. Shutov A.D. and Vaintraub I.A. Degradation of storage proteins in germinated seeds // Phytochemistry. - 1987. - Vol.26. - P.1557-1566.
26. Granell A., Cercos M., Carbonell J. Plant cysteine proteinases in germination and senescence. - In: Handbook of Proteolytic Enzymes / Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds. Academic Pr Inc, 1999.
27. Hill R. L. and Schmidt W. R. The complete enzymic hydrolysis of proteins // J. Biol. Chem. - 1962. - Vol.237. - P.389-396.
28. Smith E. L., Kimmel J. R. Papain (with a section on ficin). - In: The Enzymes, vol. 4, Acad. Press, New York and London. - 1960. - P.133.
29. Rupley J.A. Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. - In: Methods in Enzymology; Hirs C.H.W., Ed.; Academic Press: New York. - 1967. - Vol.11. - P.905-917.
30. Vaintraub I.A. Kinetics of co-operative proteolysis // Nahrung. - 1998. - Vol.42. - P.59-60.
31. Schwenke K. D. Reflections about the functional potential of legume proteins. A review // Nahrung. - 2001. - Vol.45. - P.377-381.
32. Brown L.R. The Changing World Food Prospect: The nine Tenth and Beyond // World watch Paper 85, October, Washington D.C., 1998.

Prezentat la 30.01.2009