

Evaluación de los inhibidores de proteasas en *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua durante la germinación

Martha Dávila P* y Dinah S. Seidl**

Resumen

Se estudió la presencia de proteínas de actividad biológica en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Tacarigua, partiendo del proceso de imbibición y a través de la germinación. Las proteínas estudiadas fueron los inhibidores de proteasas. Durante la imbibición, hay una salida de proteínas al agua que circunda a la semilla encontrándose entre éstas proteínas, inhibidores de la tripsina. Las semillas embebidas presentaron actividad de inhibidores de tripsina, principalmente en la fracción de albúminas, medidas estas mediante métodos espectrofotométricos. En los cotiledones obtenidos al ocurrir el proceso de germinación, así como los obtenidos de plántulas de una semana de desarrollo, se pudo observar un aumento en la actividad de los inhibidores de tripsina.

Abstract

Evaluation of proteases inhibitors in *Phaseolus vulgaris* L. cv Tacarigua during germination. Presence of proteins of biological activity in seeds of *P. vulgaris* L. c.v. Tacarigua during imbibition and germination, was evaluated. Proteins studied were proteases inhibitors. During imbibition proteins such as, trypsin inhibitors protein, leached from the seeds to the water. Measured by spectrophotometer methods, embebed seeds showed activity of trypsin inhibitors specially in the albumin fraction. Cotyledons obtained during germination and after a week showed an increase of the trypsin inhibitors activity.

Introducción

La semilla es por lo general la progenie que ha sido sexualmente producida y el órgano de dispersión de las plantas superiores. El desarrollo de la semilla debe ser visto entonces, como una preparación para la sobrevivencia durante la dispersión y para una subsecuente germinación exitosa.

La mayor parte del agua de una semilla seca (5-20% en base a peso fresco) está unida firmemente a coloides y permanece inaccesible a reacciones de hidrólisis. La cubierta seminal es por lo general impermeable a la entrada del agua. Sin embargo, algunos autores como Boulter (1.981) consideran que el bajo metabolismo de las semillas secas puede también ser explicado por la posible presencia de inhibidores del desarrollo.

La germinación ha sido definida como la

reanudación de la actividad metabólica y del crecimiento de los tejidos de la semilla todo lo cual envuelve una rehidratación, utilización de los nutrientes de reserva y el desarrollo gradual del sistema sintético, el cual permite a la planta joven asumir su propia existencia mediante mecanismos de autotrofismos (Street y Opik, 1.975; Boulter, 1.981).

Frecuentemente, se asume que las enzimas proteolíticas juegan un papel muy importante en el proceso de germinación (Pusztai y Duncan, 1.971). Chrispeels y Boulter (1.975), indican que durante la germinación ocurre un aumento en la actividad proteolítica, sugiriendo que esto puede deberse a la presencia de una endopeptidasa. Por otro lado se ha observado la presencia de enzimas proteolíticas en las semillas secas, sin embargo estas se mantienen inactivas por un mecanismo aún desconocido que se activa durante la germinación. Este comportamiento se atribuye a la presencia de inhibidores de enzimas proteolíticas en las semillas en latencia, que

* Profesora Instructor. Escuela de Agronomía. UCLA.

**Profesora. Escuela de Biología. UCV.

luego disminuyen o desaparecen con el proceso de germinación (Pusztai, 1.972; Tan-Wilson *et al.* 1.985)

Ryan (1.973), ha indicado que las proteasas, tanto en los tejidos de las semillas en latencia como en las plántulas en desarrollo, muestran una complejidad apreciable, siendo algunas específicas para algún tejido, mientras otras se encuentran indistintamente en muchos tejidos; algunas están envueltas en la degradación de las proteínas de almacenamiento en los cuerpos proteicos, mientras otras aparentemente funcionan en el recambio de las proteínas celulares de las plantas en crecimiento. El objetivo de este trabajo es detectar los posibles cambios de los inhibidores de proteasas presentes en las semillas de *Phaseolus vulgaris* var. Tacarigua durante sus procesos de imbibición y germinación.

Revisión de Literatura

La tripsina al igual que la quimiotripsina y la subtilisina, forman parte de un grupo de enzimas serínicas, las cuales se distinguen por la reactividad de un residuo de serina localizado en su sitio activo. Las dos primeras de origen animal y se han caracterizado como enzimas muy estrechamente relacionadas, las subtilisinas, de origen microbiano, se originan en cepas de *Bacillus subtilis* y bacterias relacionadas. Muchas de las especies de leguminosas estudiadas hasta el presente, contienen inhibidores activos de estas enzimas (Otensen, 1.970)

Los inhibidores de tripsina y quimiotripsina han sido caracterizados como proteínas de bajo peso molecular (Pusztai, 1.966; 1.968). Con respecto a las subtilisinas, se ha caracterizado un inhibidor consistente de un solo tetramero no covalente de una cadena simple con un solo puente disulfuro intracatenario (Ryan, 1.968).

Proteínas de Reserva.

Una gran proporción del peso seco de las semillas maduras de la mayoría de las

leguminosas es proteína. Grandes cantidades de proteína son acumuladas en un corto período de tiempo, este material de reserva acumulado, se ha indicado que proviene por lo general de las partes superiores de la planta. Sin embargo, a veces no es fácil decidir si una proteína presente en la semilla es de reserva o no, las proteínas de reserva según Boulter (1.981) deben estar depositadas en cuerpos limitados por membranas, llamados cuerpos proteicos, y usadas subsecuentemente luego de la degradación proteolítica, como fuente de nitrógeno durante la germinación.

Estas proteínas han sido caracterizadas por su solubilidad (Fox *et al.*, 1.964; Basha y Beevers, 1.975; Carasco *et al.*, 1.978). Así, las albúminas corresponden a la fracción hidrosoluble y representan la fracción más rica en aminoácidos sulfurados y en inhibidores de la tripsina y las globulinas corresponden a la fracción soluble en solución salina y representan aproximadamente un 60% de las proteínas totales de las semillas.

Imbibición.

Puesto que se ha observado que la imbibición con agua convierte a las semillas de un órgano quiescente en un órgano dinámico, activo en respiración, en biosíntesis y con capacidad de desarrollarse. Algunos autores han sugerido que ocurre un lavado de sustancias intracelulares durante este período, Hwang *et al.* (1.978), reportan la presencia de moléculas de muy alto peso molecular. Esta pérdida de solutos, ha sido atribuida a una falta de reorganización en la membrana en la transición del estado no hidratado al hidratado (Tan-Wilson y Wilson, 1.982) y se ha explicado la pérdida de solutos durante la imbibición como un mecanismo que responde solo a un fenómeno de difusión física (Powell y Matteus, 1.981).

Hwang *et al.* (1.978) mostraron que los inhibidores presentes en semillas de soja eran liberados a las 24 horas de imbibición, sugiriendo esto como una medida de defensa de las semillas

contra depredadores y agentes patógenos.

Materiales y métodos

Material Vegetal.

Se trabajó con semillas de *Phaseolus vulgaris* var. Tacarigua (caraota negra). Obtenidas en el CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (CENIAP), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Estas semillas fueron lavadas con una solución al 10% de cloro comercial por 5 minutos, luego de lo cual se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril, se secaron a temperatura ambiente y se guardaron en sitio seco hasta el momento de su utilización.

Las semillas fueron divididas en tres lotes; el primero se conservó seco para la posterior extracción de sus proteínas (Go), el segundo se puso a germinar en papeles de filtro en cámaras de humedad a temperatura ambiente luego de embebidas por el lapso de 1 hora, y el último lote fue utilizado para ensayos de imbibición.

Para los estudios de imbibición, 70 gr. de semillas secas fueron colocadas en agua destilada en una proporción de 1:4 peso / volumen a temperatura ambiente en recipientes de vidrio (Erlenmeyer) de 100 ml. de capacidad. A las muestras se les añadió azida de sodio hasta una concentración final de 0,001% con el fin de prevenir la contaminación microbiana y se dejaron embeber durante 6, 15, 24 y 48 horas, luego del cumplimiento de cada uno de estos lapsos, se determinó la toma de agua por la semilla, por la diferencia volumen remanente. Las semillas fueron lavadas con el fin de recolectar restos de solutos adheridos a estas y el agua de este lavado se sumó al agua restante que se obtuvo anteriormente, todo lo cual se denominó **Ar**.

Las semillas fueron mantenidas a temperatura de congelación para someterlas a extracción y el **Ar** fue procesada inmediatamente a 4 °C se midió un volumen de esta agua y se trató

con polivinil polipirrolidona (**PVP**) insoluble para la eliminación parcial de los taninos.

Extracción de Proteínas:

La extracción de las semillas correspondientes a los ensayos de imbibición (**SI**), fue realizado siguiendo el método de extracción neutra. En todos los casos, se homogeneizó la muestra en una licuadora de compota Oster a mediana velocidad (excepto las semillas secas, las cuales fueron molidas en un molino Arthur Thomas Co. modelo 475-A, con un tamiz de 40 Mesh antes de ser licuadas) utilizándose 100 ml. de NaCl 1% por cada 20 g. de muestra. Después de licuadas las muestras se dejaron con agitación constante durante 24 Hr. a 4 °C, luego de lo cual se centrifugaron a 500 X G. por 10 minutos. El sobrenadante se dializó contra H₂O destilada hasta la eliminación total de las sales y se centrifugó durante 30 minutos a 15.000 X g. El sobrenadante obtenido de esta segunda centrifugación se denominó FRACCION DE ALBUMINAS (**ALB**). El precipitado se lavó 3 veces con H₂O destilada, se disolvió en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.0 y 0.5 M NaCl con agitación constante durante 24 H a 4 °C. Al cabo de este tiempo se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriores. La fracción sobrenadante se denominó GLOBULINAS (**GLb**). Ambas fracciones se liofilizaron y se guardaron secas a 4 °C.

Determinación de la Cantidad de Proteína.

1) Método de Lowry *et al.* (1.951). Este método se utilizó para determinar la cantidad de proteínas en las fracciones de albúminas y globulinas de los extractos obtenidos en **Go** y **SI** y en el agua de imbibición tratada con **PVP**.

2) Método de MICROKJELDAHL según AOAC (1.970). Con este método se estimó la cantidad de proteína existente en el agua de imbibición que contenía alto porcentaje de taninos, estimando la cantidad de nitrógeno total en la muestra. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

Determinación de los Inhibidores de Proteasas.

Método de Kakade *et al.* (1.969). La actividad de los inhibidores de tripsina fue medida espectrofotométricamente empleando benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), como sustrato 0.1 a 0.5 ml. de muestra fueron colocados por triplicado y ajustados a un volumen final de 0.5 ml. con buffer Tris 0.05 pH 8.2. Se añadieron 0.5 ml. de una solución de tripsina bovina (40 mg / ml en HCL 10^{-3} M) a cada tubo. Los tubos se colocaron en baño de María a 37 °C. A los blancos se les añadió 0.5 ml. de ácido acético al 30% y a todos los tubos se les añadió 3.5 ml. de BAPNA. Luego de 10 minutos la reacción fue detenida con 0.5 ml. de ácido acético 30% y se leyó en un espectrofotómetro Gliford modelo 250 a 410 nm.

Resultados y discusión**A) Germinación.**

Las semillas de *P. vulgaris* var. Tacarigua comenzaron a germinar a los dos días de sembradas. La viabilidad de las semillas fue del 92% de un total de 120 semillas.

B) Toma de agua por las semillas y liberación de proteínas al medio.

La figura 1 muestra el curso de hidratación de las semillas en función del tiempo y la consecuente aparición de proteínas en el agua que circunda a las semillas. La hidratación aproximada de las semillas fue de 0.95 g / g de peso seco a las 6 horas de remojo, lo cual representa más del 60% de la hidratación total observada, la cual se registró a las 48 horas. Durante este período, la cantidad de proteína en el medio aumentó de 1 mg. por g. de semilla en las primeras 6 horas hasta 2 mg. por g. de semilla a las 48 horas. La velocidad inicial de aparición de proteínas en el medio aumentó rápidamente hasta las 15 horas, ajustándose a una curva lineal hasta las 48 horas

Cuantificación de proteínas en las semillas embebidas.

La figura 2 muestra que la cantidad de proteína tanto de la fracción **ALB** como de la fracción **GLB** tiende a permanecer constante hasta las 15 horas de remojo observándose una disminución mientras que la globulínica tiene un aumento de aproximadamente un 13% con respecto al valor anterior.

C) Inhibición de Proteasas.

1) Aguas de Imbibición. Con el método descrito, se pudo detectar una leve actividad inhibidora en el agua (Figura 3). Estos resultados indican un ligero aumento del inhibidor a medida que aumenta el período de imbibición.

2) Semillas Embebidas. Un análisis de los datos mostrados en la figura 4, indican que mientras a las 24 horas de imbibición el 50% de imbibición se alcanza con 28 microgramos de proteína, en las semillas secas, esto se alcanza con 50 microgramos.

D) Ensayos de Germinación.

1) Cuantificación de Proteínas. La figura 5 muestra los resultados de la cuantificación de proteínas en las semillas secas y germinadas. Se pudo observar al comparar los cotiledones de semilla a diferentes tiempos de germinación como la cantidad de proteínas en la fracción de globulinas permanecen aproximadamente constante, mientras que la cantidad de proteínas en la fracción de albuminas aumenta rápidamente hacia los primeros días de germinación para disminuir ligeramente hacia los días subsiguientes.

2) Inhibición de Proteasas. Los ensayos cuantitativos de inhibición (figura 6), mostraron un aumento significativo en la cantidad de inhibidores a medida que avanza la germinación. Así, 18 microgramos de proteína de la semilla seca disminuye la actividad de la tripsina a un

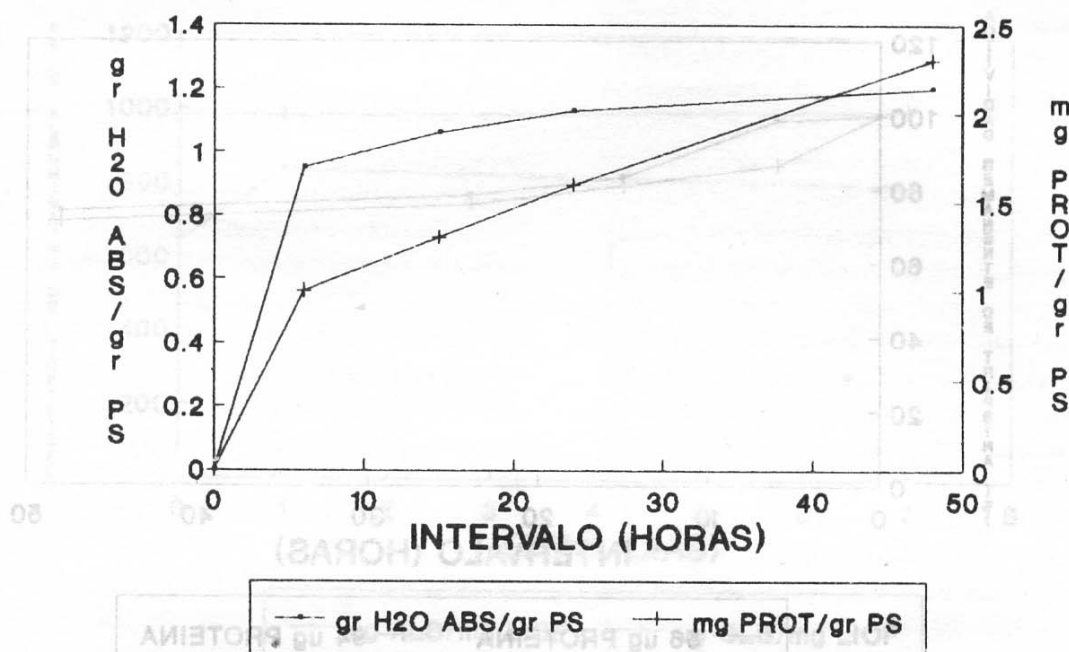


Figura 1. Curso de toma de agua y liberación de proteínas durante la hidratación de semillas de *P. vulgaris*.

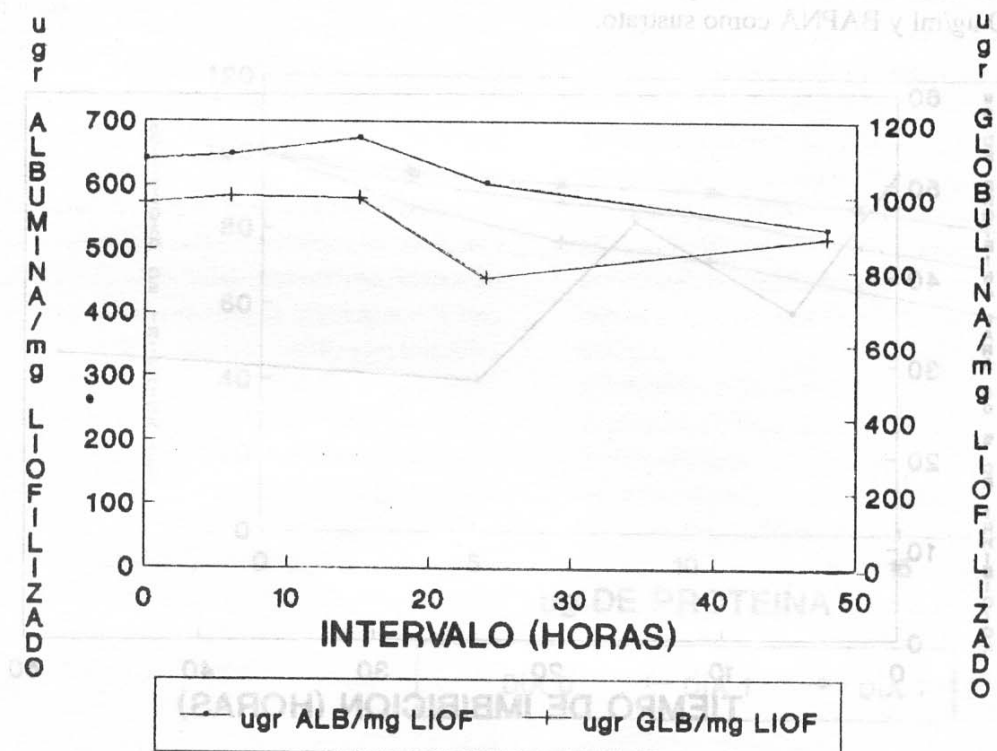


Figura 2. Variación de la cantidad de proteínas en las fracciones de albúminas y globulinas de semillas embebidas, en función al tiempo de imbibición.

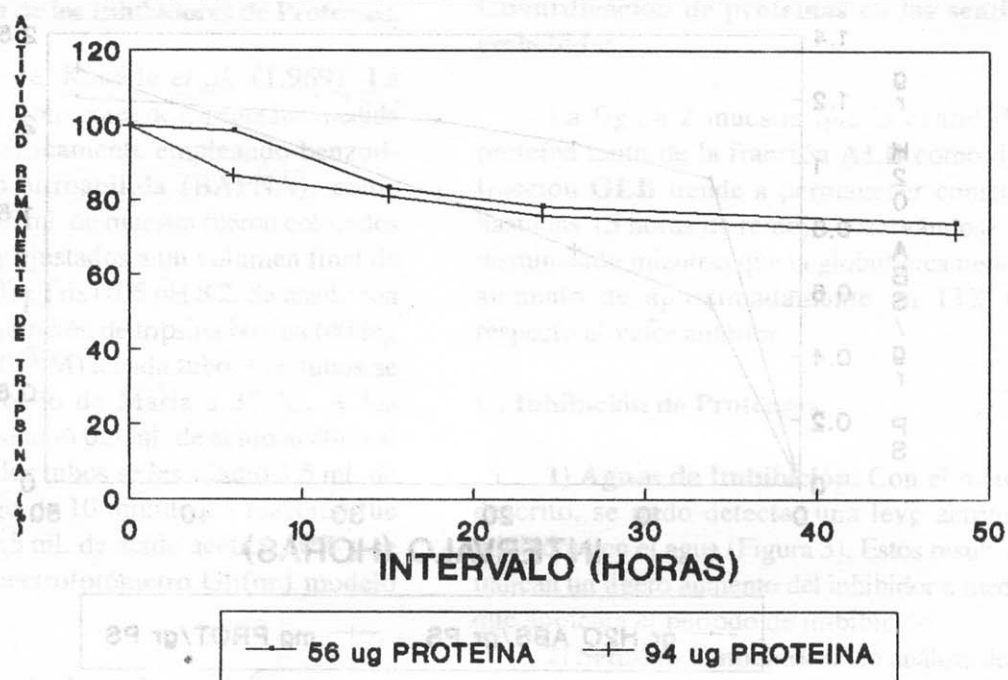


Figura 3. Actividad inhibidora del agua de imbibición sobre la tripsina. Se utilizó una solución de tripsina de 40 ug/ml y BAPNA como sustrato.

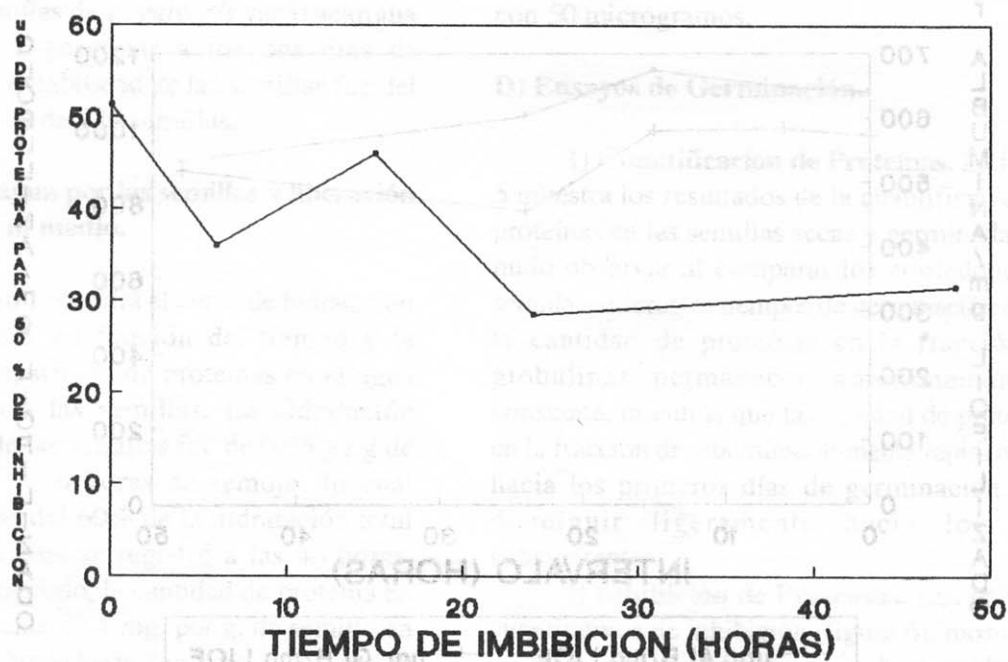


Figura 4. Relación de la cantidad de proteínas de semillas embebidas requerida para obtener un 50% de inhibición de tripsina (40 ug/ml) utilizando BAPNA como sustrato.

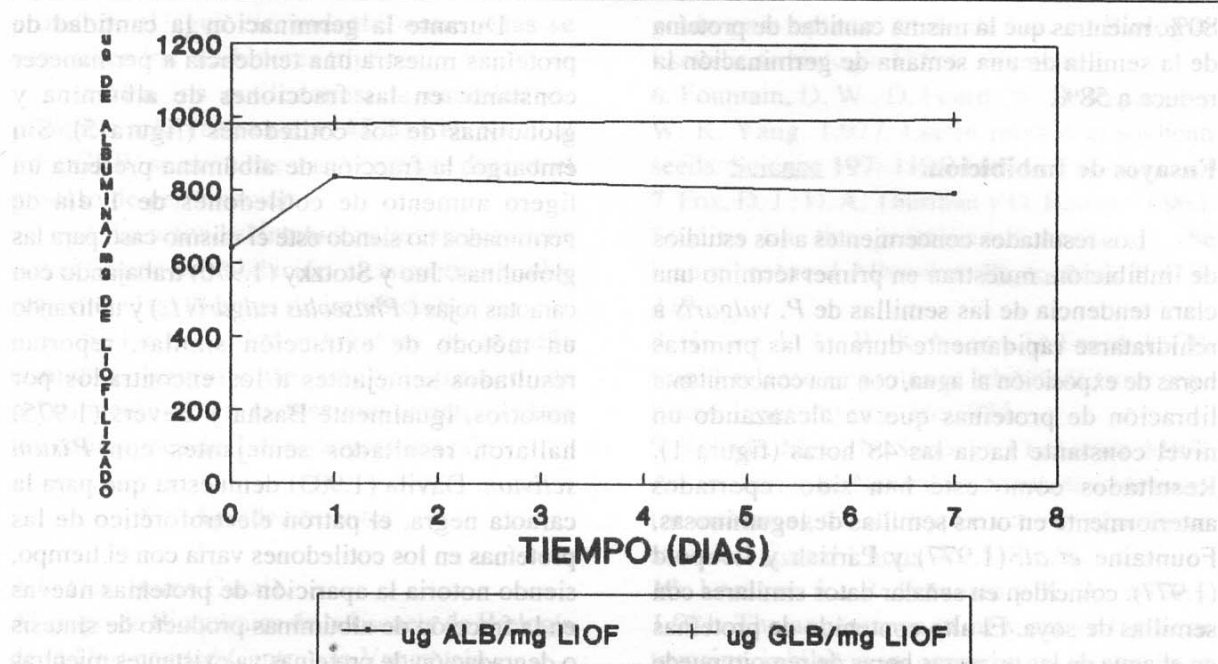


Figura 5. Cantidad de proteínas en las fracciones de albuminas y globulinas en cotiledones de semillas germinadas.

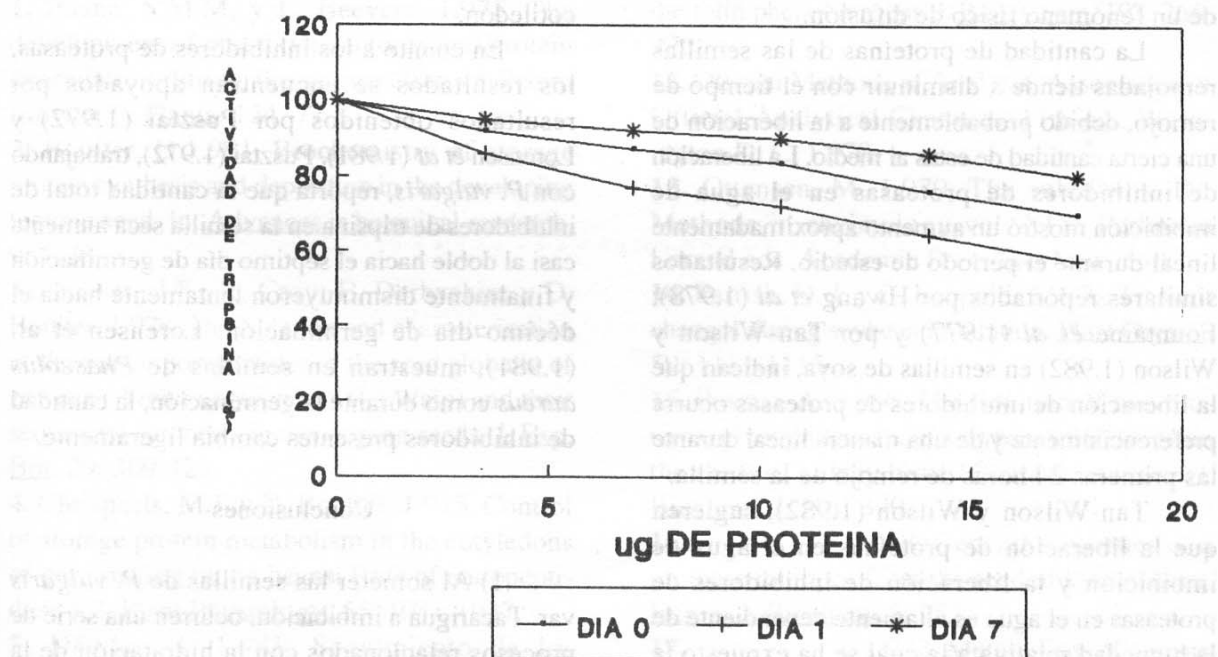


Figura 6. Actividad inhibidora de tripsina de las fracciones de albúminas de cotiledones de semillas germinadas. Se utilizó una solución de tripsina de 40 ug/ml y BAPNA como sustrato.

80%, mientras que la misma cantidad de proteína de la semilla de una semana de germinación la reduce a 58%.

Ensayos de Imbibición.

Los resultados concernientes a los estudios de imbibición, muestran en primer término una clara tendencia de las semillas de *P. vulgaris* a rehidratarse rápidamente durante las primeras horas de exposición al agua, con una concomitante liberación de proteínas que va alcanzando un nivel constante hacia las 48 horas (figura 1). Resultados como este han sido reportados anteriormente en otras semillas de leguminosas, Fountaine *et al.* (1.977) y Parrish y Leopold (1.977). coinciden en señalar datos similares con semillas de soya. El alto contenido de proteínas en el agua de las primeras horas de remojo puede explicarse por una rápida pérdida de proteínas de las capas más externas del embrión. Powell y Matheus (1.981), indican que este es el resultado de un fenómeno físico de difusión.

La cantidad de proteínas de las semillas remojadas tiende a disminuir con el tiempo de remojo, debido probablemente a la liberación de una cierta cantidad de estas al medio. La liberación de inhibidores de proteasas en el agua de imbibición mostró un aumento aproximadamente lineal durante el período de estudio. Resultados similares reportados por Hwang *et al.* (1.978); Fountaine *et al.* (1.977) y por Tan-Wilson y Wilson (1.982) en semillas de soya, indican que la liberación de inhibidores de proteasas ocurre preferencialmente y de una manera lineal durante las primeras 24 horas de remojo de la semilla.

Tan-Wilson y Wilson (1.982), sugieren que la liberación de proteínas en el agua de imbibición y la liberación de inhibidores de proteasas en el agua es altamente dependiente de la humedad relativa a la cual se ha expuesto la semilla previamente.

Ensayos de Germinación.

Durante la germinación la cantidad de proteínas muestra una tendencia a permanecer constante en las fracciones de albúmina y globulinas de los cotiledones (figura 5). Sin embargo, la fracción de albúmina presenta un ligero aumento de cotiledones de 1 día de germinados no siendo este el mismo caso para las globulinas. Juo y Stotzky (1.970) trabajando con caraotas rojas (*Phaseolus vulgaris* L.) y utilizando un método de extracción similar, reportan resultados semejantes a los encontrados por nosotros, igualmente Basha y Bevers (1.975) hallaron resultados semejantes con *Pisum sativum*. Davila (1.983) demuestra que para la caraota negra, el patrón electroforético de las proteínas en los cotiledones varía con el tiempo, siendo notoria la aparición de proteínas nuevas en la fracción de albúminas producto de síntesis o degradación de proteínas ya existentes mientras que en la fracción de globulina se observa, la desaparición de bandas lo cual se interpreta como la degradación de proteínas de reservas del cotiledon.

En cuanto a los inhibidores de proteasas, los resultados se encuentran apoyados por resultados obtenidos por Pusztai (1.972) y Lorensen *et al.* (1.981). Pusztai (1.972), trabajando con *P. vulgaris*, reporta que la cantidad total de inhibidores de tripsina en la semilla seca aumenta casi al doble hacia el séptimo día de germinación y finalmente disminuyeron lentamente hacia el décimo día de germinación. Lorensen *et al.* (1.981), muestran en semillas de *Phaseolus aureus* como durante la germinación, la cantidad de inhibidores presentes cambia ligeramente.

Conclusiones

1) Al someter las semillas de *P. vulgaris* var. Tacarigua a imbibición, ocurren una serie de procesos relacionados con la hidratación de la misma. La cantidad de proteína dentro de la misma varía solo ligeramente.

2) Durante el proceso ocurre una salida de

proteínas al agua circundante, entre estas se detectaron los inhibidores tripticos.

3) En los cotiledones, la cantidad de proteínas solubles en agua (ALB) y en Na Cl al 1% (GLB) se mantiene casi constante durante el proceso de germinación.

4) La actividad inhibidora de tripsina oscila con el tiempo de imbibición, alcanzando un valor máximo a las 48 horas de imbibición.

5) La actividad inhibidora de tripsina aumenta ligeramente con el tiempo de germinación observándose mayor actividad en los cotiledones de 7 días de germinación.

Agradecimientos

A la Dra. Irama Casale.

Al grupo de Bioquímica de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela.

Literatura citada

1. Basha, S.M.M. y L. Beevers. 1975. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L. *Planta*. 124: 77-87.
2. Boulter, D. 1981. Biochemistry of storage protein synthesis and deposition in the developing legume seed. In: *Advances in botanical research*. 9: 1-28.
3. Carasco, J.F.; R. Croy; E. Derbyshire y D. Boulter. 1978. The isolation and characterization of the mayor polypeptides of the seed globulin of cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) and their sequential synthesis in developing seeds. *J. Exp. Bot.* 29: 309-329.
4. Chrispeels, M.J. y D. Boulter. 1975. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of endopeptidase 1,2. *Plant Physiology*. 55: 1031-1037.
5. Dávila, M. 1983. Seguimiento de los inhibidores de proteasas y de las lectinas durante la germinación y el desarrollo de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua. Trabajo de grado para optar al título de Lic. en Biología. Escuela de biología U.C.V. Venezuela.
6. Fountain, D. W.; D. Foard; W. D. Replogle y W. K. Yang. 1977. Lectin release in soybean seeds. *Science* 197: 1185-1187.
7. Fox, D. J.; D. A. Thurman y D. Boulter. 1964. Studies on the proteins of seeds of the leguminosae -I Albumins. *Phytochem.* 3: 417-419.
8. Hwang, D. L.; W. K. Yang y D. Foard. 1978. Rapid release of protease inhibitors from soybeans. *Plant Physiol.* 16: 3034.
9. Kakade, M. L.; N. Simons y I E. Liener. 1969. An evaluation of Natural vs. Synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.* 46: 518-526.
10. Lorence, E.; R. Prevosto y K. A. Wilson. 1981. The appearance of new active forms of trypsin inhibitor in germinating mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *Plant. Physiol.* 68: 88-92.
11. Lowry, O. H.; H. J. Rousebrough; A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
12. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, 11th ed., Washington D. C. 1970.
13. Ottensen, M. 1970. The subtilisins. IN: *Methods in enzymology* vol. XIX. Perlmann Lorand eds. Academic Press Inc. New York.
14. Parrish, D. J. y C. Leopold. 1977. Transient changes during soybean imbibition. *Plant Physiol.* 59: 1111-1115.
15. Pusztai, A. 1966. The isolation of two proteins, glycoprotein I and a trypsin inhibitor from the seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.* 101: 379.
16. _____. 1968. General properties of a protease inhibitor from the seed of kidney bean. *Europ. J. Biochem.* 5: 252.
17. _____. 1972. Metabolism of trypsin inhibitory proteins in the germination seed of kidney bean. *Planta* 107: 121-129.
18. Pusztai, A. e I. Duncan. 1971. Changes in

proteolytic enzyme activities and transformation of nitrogenous compounds en the germinating seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta*. 101: 121-129.

19. Ryan, C. A. 1968. Synthesis of chymotrypsin inhibitor I portein in potato laflets induced by detachment. *Plant Physiol.* 43: 1895.

20. . 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 173-196.

21. Street, H. E. y H. Opik. 1975. The physiology of flowering plants. Edward Arnold (ed.) London. 280 p.

22. Tan-Wilson, A. L. y K. Wilson. 1982. Nature of proteinase inhibitors released from soybeans during imbibition and germination. *Phytochem.* 21 (7): 1547-1551.

23. Tan-Wilson, A. L.; P. H. Hartl; N. E. Deifel y K. Wilson. 1985. Differential expresion og Kunits and Bowman - Birk Soybean proteinase inhibitors in plant and callus tissue. *Plant Physiol.* 78: 310-314.

24. Wilson, A. 1980. The release of proteinase inhibitors from legume seeds during germination. *Phytochem.* 19: 2517-2519.

25. Youle, R. J. y D. L. Hwang. 1976. Protein bodies from the endosperm of castor bean. *Plant Physiol.* 58: 703-709.