

# EFFECTO DE HIDROLISIS ENZIMATICA SOBRE LA ACTIVIDAD FITOHEMOAGLUTINANTE DE LA FAVINA.

Cecilia A. de Martínez, Daniel G. Anzola R. y Virginia M. de Gómez  
Departamento de Química, Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

**Keywords:** Lectin, Favin, Tryptic Hydrolysis.

## RESUMEN

Se presenta un estudio comparativo de 4 métodos de extracción de la lectina del haba (favina). A partir de la favina, por hidrólisis con tripsina, se obtuvo la fracción peptídica con actividad hemoaglutinante. Para esta fracción se encontró un peso molecular entre 11000-15000 Daltons y su posible localización en la cadena  $\beta$  de la favina.

## ABSTRACT

Comparative study of four methods for extraction of favin from *Vicia faba* was performed. A fraction with hemagglutinant activity was obtained by tryptic hydrolysis of favin followed by purification by affinity chromatography on Sephacryl-S-200. The hemagglutinant fraction showed a molecular weight between 11000-15000 Daltons, and possibly located in the  $\beta$  chain of the favin.

## INTRODUCCION

Las lectinas son proteínas presentes tanto en semillas de leguminosas (1) como en algunos peces e invertebrados (2). Su peso molecular varía entre 20.000 y 400.000 Daltons, presentándose la molécula en subunidades asimétricas, asociadas en dímeros o tetrámeros según el pH (3). Tienen la propiedad de unirse a carbohidratos que forman parte de glicoproteínas y glicolípidos (4), y poseen propiedades biológicas tales como: capacidad hemoaglutinante (5), actividad mitótica (6), protección contra infecciones bacterianas (7) y efectos antinutricionales (8).

La favina, lectina del haba con peso molecular aproximado de 47500 Daltons, posee una cadena  $\alpha$  (51 residuos de aminoácidos) y una cadena  $\beta$  (180 residuos de aminoácidos), presentando residuos de glucosamina (1.6%) y manosa (7.4%) unidas a la asparagina 168 (9,10).

De los estudios realizados sobre la favina hasta el presente no se conoce la parte estructural de la molécula que le confiere su propiedad hemoaglutinante. En este trabajo se estudió el efecto de la hidrólisis triptica sobre la capacidad hemoaglutinante de la favina, para tratar de elucidar la fracción peptídica que le confiere dicha propiedad.

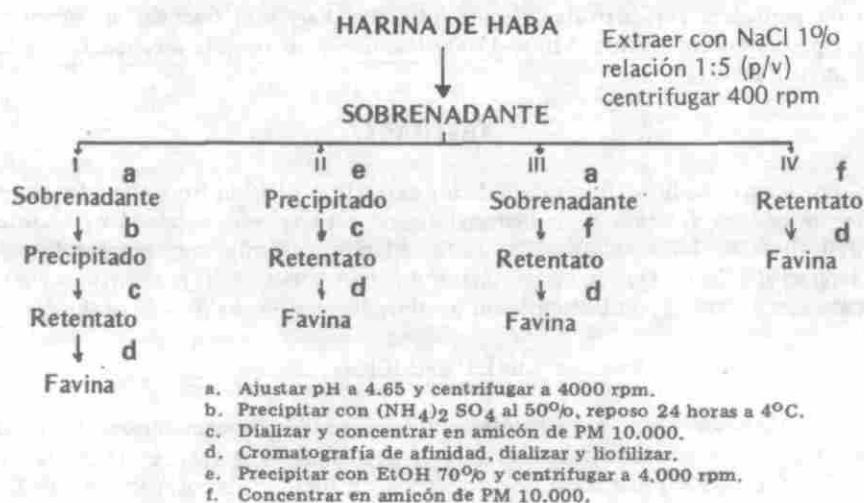
## PARTE EXPERIMENTAL

### Optimización del método de extracción de la favina.

La favina se obtuvo a partir de la harina de haba seca, variedad Cundinamarca. Se emplearon 4 métodos de extracción (diagrama No. 1) teniendo en común la extracción con NaCl 1% (p/v) y el proceso de purificación por cromatografía de afinidad en Sephacryl S-200.

Diagrama No. 1

### ESQUEMA COMPARATIVO DE LOS 4 METODOS DE EXTRACCION DE LA FAVINA



La lectina obtenida por los 4 métodos fue comparada en características mediante las siguientes pruebas:

- a) Aglutinación - 4 mg de liofilizado (favina más NaCl 0.3%) disueltos en 1 ml de NaCl al 1% se mezclaron con suspensión de eritrocitos al 2% en NaCl 1% en relación 1:1 y 1:2. La formación del aglutinado se observó directamente a las 2 horas 30 minutos y se valoró de acuerdo a la escala serológica (0: ausencia de aglutinación, + 4: máxima aglutinación) (11).

- b) Inhibición - Los ensayos de inhibición se realizaron utilizando soluciones de glucosa, fructosa y manosa al 5% en NaCl 1%. Se mezcló: solución de favina liofilizada (4 mg/ml en NaCl 1%), solución de eritrocitos al 2% en NaCl 1% y la solución de carbohidratos en relación 1:2:1. La formación del aglutinado se observó directamente y se valoró mediante la escala serológica.
- c) Porcentaje de proteína - Determinado por el método de Lowry (12).
- d) Título de la proteína - Determinado por diluciones seriadas de los liofilizados de favina en soluciones de NaCl 1%. El título de una proteína se define como el inverso de la máxima dilución de una solución de proteína de concentración conocida que presente actividad hemoaglutinante (13).
- e) Electroforesis - Se realizaron electroforesis en disco utilizando gel de poliacrilamida (GPA)T7C5 en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3 y electroforesis en placa con y sin dodecilsulfato de sodio (SDS) en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3 y en buffer fosfatos 0.2M pH 7.1.

#### Hidrólisis trípica de la favina

Se empleó como agente hidrolizante Tripsina bovina Merck (3.5 U/mg) y Tripsina Sigma T-8003 con actividad comprobada.

Se realizaron algunos ensayos preliminares para determinar las mejores condiciones de trabajo; éstos incluían: variación de la relación enzima-sustrato, variación en el tiempo de hidrólisis, variación en el tiempo de toma de alícuotas para el control de la hidrólisis. El curso de la hidrólisis se siguió por colorimetría cuantitativa después de reacción con ninhidrina, haciendo un control paralelo de la actividad hemoaglutinante y de la inhibición de ésta por carbohidratos.

Se realizaron varios ensayos para detener la actividad trípica sin afectar la actividad hemoaglutinante. Estos ensayos incluyeron:

- a) Disminución del pH. - Se utilizó ácido acético en diferentes concentraciones (3, 5, 15 y 30% v/v) con tiempos de contacto entre 30 minutos y 2 horas, realizando controles cada 5 minutos y ácido tricloroacético el 2 y 10% v/v, con tiempos de contacto entre 1 y 15 minutos, realizando controles cada minuto. Después del tiempo de contacto se centrifugó y el sobrenadante se neutralizó para realizar la prueba de aglutinación.
- b) Empleo de agentes químicos - Se utilizó sulfato de zinc 0.1, 0.01 y 0.001M con tiempo de contacto de las soluciones de 30 segundos.
- c) Variación de la temperatura. - Se emplearon temperaturas de 92°C durante 2 minutos y 4°C durante 15 y 30 minutos.

### Curvas de hidrólisis enzimática de la favina,

Establecidas las mejores condiciones de trabajo se realizaron simultáneamente ensayos de hidrólisis de la favina en buffer fosfato 0.2M pH 7.0 a 4°C y 37°C, utilizando relación enzima/sustrato 1/100 (p/p) y autodegradación de la tripsina a 37°C. Se tomaron alícuotas cada 4 horas para realizar ensayos cuantitativos de ninhidrina y ensayo de eritroaglutinación.

### Separación de los péptidos obtenidos por hidrólisis trípica de la favina.

Para la separación de los péptidos se empleó una columna de Sephacryl S-200 (42x3 cm). La muestra hidrolizada se eluyó inicialmente con NaCl 1% y posteriormente con glucosa 5% en NaCl 1%. Las fracciones recolectadas se leyeron a 230 y 280 nm. A las fracciones eluidas con glucosa, que presentaron absorción en el UV se les determinó su actividad hemoaglutinante e inhibición de ésta por carbohidratos. Las fracciones activas se reunieron y filtraron a través de membrana de amicón PM 30.000 Daltons. La fracción eluida presentó actividad y fue filtrada a través de amicón PM 10.000 Daltons, liofilizándose la parte retenida que presentó actividad hemoaglutinante.

### Pruebas de caracterización de la fracción peptídica con actividad hemoaglutinante.

Esta fracción fue caracterizada mediante las siguientes pruebas:

- a) Detección de carbohidratos mediante ensayos de Molisch, Felhing y Barfoed.
- b) Electroforesis analítica en GPA, en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3 con y sin SDS. La tinción se hizo con azul de Coomassie y peryodato Schiff.
- c) Electroforesis en GPA en buffer fosfato 0.2M pH 7.1 con SDS, para determinar peso molecular.
- d) Análisis cualitativo de aminoácidos por cromatografía bidimensional en capa delgada, de una muestra hidrolizada previamente con HCl 6N durante 24 horas a 110 °C, empleando como eluentes isopropanol:amoníaco:agua 12:1:1 en una dirección y butanol:ácido acético:agua 4:1:1 en la otra. El revelado se hizo con solución de ninhidrina/Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y calentamiento a 100°C.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Optimización del método de extracción de la favina

La favina obtenida por cada uno de los 4 métodos de extracción presentó igual perfil de elución, al someterla a cromatografía de afinidad. Por tanto, para la extracción de la favina no es necesario someter la harina de haba a diferentes tratamientos, que conllevan a un mayor consumo de reactivos y tiempo, sino que

directamente puede ser purificada del extracto salino, por filtración en membrana de amoníaco de peso molecular 10.000 Daltons.

#### Pruebas de caracterización

Las pruebas de caracterización se realizaron sobre liofilizados de favina, que contienen NaCl, y no sobre favina pura, pues cuando la concentración de NaCl es menor de 0.3%, la favina es insoluble (13).

- a) Aglutinación e inhibición. - La favina obtenida por los 4 métodos de extracción presentó igual capacidad hemoaglutinante (+4), la cual fue inhibida totalmente por glucosa, manosa o fructosa al 5%.
- b) Porcentaje de proteína. - En los 4 métodos se obtuvo un porcentaje de proteína muy similar, con valores de  $8.3 \pm 0.2\%$ .
- c) Título de la proteína. - En los 4 métodos de extracción el título específico de la proteína fue del orden de 3.0. Este resultado permite establecer que se requiere de una concentración de proteína mínima (0.33 mg/ml) para que en ella sea detectable la propiedad hemoaglutinante.
- d) Electroforesis. - El comportamiento de la favina obtenida por los 4 métodos de extracción fue igual en las diferentes electroforesis realizadas. En la electroforesis en GPA en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3, sin SDS, la concentración de la muestra es determinante pues a concentraciones bajas (4 mg del liofilizado/ml) aparece una sola banda, resultado que concuerda con la literatura (13), mientras que al aumentar la concentración (8-10 mg/ml), aparecen 2 bandas adicionales, igualmente concordantes con la literatura (14). En las mismas condiciones anteriores pero adicionando SDS, la electroforesis mostró la aparición de una banda de gran migración ( $R_f$  0.66); la bibliografía consultada no reporta resultados en estas condiciones. En la electroforesis en GPA en buffer fosfato 0.2M pH 7.1, con SDS, se presentaron un par de bandas (correspondientes a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la favina), resultados que coinciden con los descritos en la literatura (9). Los resultados de la electroforesis en las mismas condiciones pero sin SDS mostraron la aparición de una banda de pequeña migración, resultado que concuerda con lo descrito en la literatura (15).

#### Hidrólisis trípica de la favina.

- a) Ensayos preliminares. - La realización de estos ensayos permitió establecer que la hidrólisis trípica de la favina no afectó la actividad hemoaglutinante, aún después de 95 horas de hidrólisis, y aún utilizando relaciones altas de enzima/ sustrato (1/40), la actividad se mantuvo.
- b) Inhibición de la tripsina. - La actividad hemoaglutinante de la fracción peptídica, liberada durante la hidrólisis trípica, desapareció por el tratamiento con

soluciones de ácido acético o ácido tricloroacético en diferentes concentraciones.

El empleo de agentes químicos como el sulfato de zinc causó la hemólisis de eritrocitos, impidiendo observar cualquier aglutinación.

La actividad hemoaglutinante desapareció al someter la fracción peptídica a altas temperaturas (92°C) en tiempos bastante cortos (2 min.). Sin embargo, a bajas temperaturas (4°C durante 15 y 30 min.) su actividad hemoaglutinante permaneció, pudiendo así inhibirse la actividad enzimática de la tripsina sin afectar la actividad de la fracción peptídica.

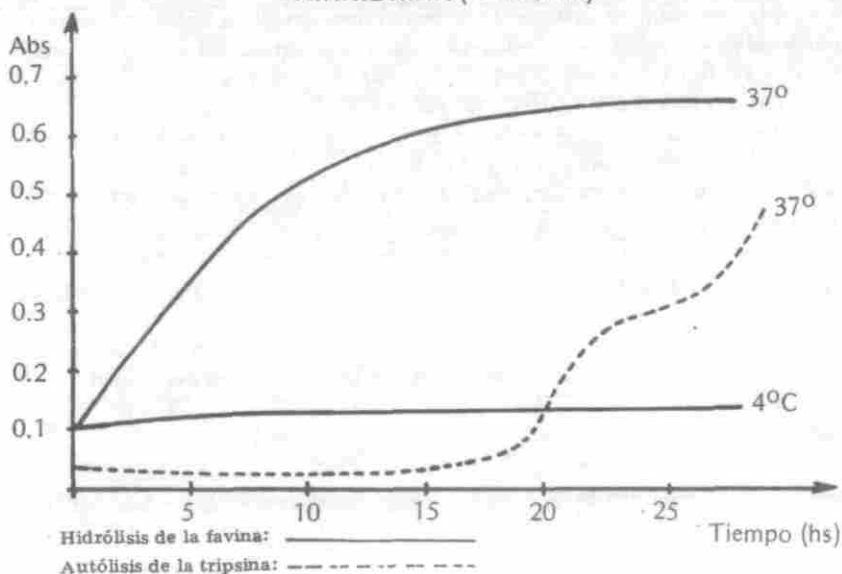
#### Curvas de hidrólisis enzimática de la favina.

La hidrólisis enzimática de la favina a 37°C se verificó rápidamente durante las 10 primeras horas (gráfica No. 1); de 10 a 18 horas su velocidad disminuyó y después de 18 horas no se presentó más hidrólisis. Durante todo el tiempo de hidrólisis la actividad hemoaglutinante se mantuvo constante y fue inhibida por los mismos carbohidratos utilizados en los ensayos preliminares.

A 4°C la curva obtenida fue prácticamente una paralela a la abcisa, durante todo el tiempo de hidrólisis. Este comportamiento indica que la actividad triptica, a esta temperatura, fue casi nula debido a que la tripsina, como toda enzima, posee un rango óptimo de temperatura (alrededor de 37°C) para su actividad.

Gráfica No. 1

#### CONTROL DE HIDROLISIS TRIPTICA DE LA FAVINA Y AUTOLISIS DE LA TRIPSINA POR EL METODO DE NINHIDRINA ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ )



En la curva de autodegradación de la tripsina a 37°C se observó que después de 20 horas, la autólisis de ésta es bastante notoria. Sin embargo, este aumento no se registró en la curva de hidrólisis de la favina a 37°C porque posiblemente existe algún tipo de interacción entre los péptidos generados por la hidrólisis triptica y la tripsina, que le confiere a ésta cierto grado de estabilidad e impide su autodegradación.

#### Separación de los péptidos obtenidos por hidrólisis triptica de la favina.

Se determinó que la fracción peptídica con actividad hemoaglutinante posee un peso molecular comprendido entre 10000 y 30000 Daltons. Este resultado indica que la actividad hemoaglutinante observada no es debida a la favina sino a péptidos liberados durante su hidrólisis.

#### Pruebas de caracterización de la fracción peptídica con actividad hemoaglutinante.

Detección de carbohidratos. - La fracción peptídica activa no posee carbohidratos, lo cual indica que no son indispensables para dicha actividad.

Electroforesis. - El comportamiento de la fracción peptídica en electroforesis en GPA, en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3 (Rf 0.17 y 0.34) y buffer fosfato 0.2 M pH 7.1 sin SDS (Rf 0.08), fue diferente al de la favina (9) y al de la tripsina (Rf 0.14 y 0.91 respectivamente). Dicha fracción posee una carga parcial negativa a pH 8.3.

Al realizar la electroforesis en buffer Tris-glicina 100 mM pH 8.3, con SDS, la fracción peptídica presentó una sola banda difusa que migra con el frente del solvente, mientras que con la tripsina y la favina la migración fue menor (Rf 0.8 y 0.7 respectivamente).

La tinción con peryodato-Schiff presentó resultados positivos para la favina y negativos para la tripsina y la fracción peptídica, comprobándose que dicha fracción no contiene carbohidratos.

Determinación de peso molecular por electroforesis. - Por interpolación en la curva de logaritmo decimal del peso molecular de proteínas patrones vs. distancia de migración relativa, se encontró que el peso molecular de la fracción peptídica oscila entre 11000 y 15000 Daltons.

Análisis cualitativo de aminoácidos. - En la fracción peptídica activa se detectaron 4 aminoácidos: lisina, serina, alanina y glicina, y posiblemente también están presentes triptófano, treonina y valina. Teniendo en cuenta que la secuencia de aminoácidos de la favina se conoce perfectamente, los aminoácidos detectados en la fracción activa solo se presentan en forma simultánea en el péptido denominado T7 (10) presente en la cadena  $\beta$  de la favina.

## AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestros agradecimientos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y a COLCIENCIAS por la ayuda financiera.

## BIBLIOGRAFIA

1. LISKE, R., *Nature*, 1968. **217**, 860.
2. DODD, R., *Vok Sang*. 1968. **15** 386.
3. LS, H., *J. Biol Chem*. 1966. **241**, (3), 684.
4. LIS, H. and SHARON, N., *Ann. Review Biochem*. 1973. **42**, 541.
5. ROBBINS, J., *Science*. 1964. **146**, 1648.
6. HIRSCHORN, K., *Science*. 1963. **142**, 1185.
7. NICOLSON, G., *Int. Rev. of Cytol*. 1974. **39**, 90.
8. LIERNER, I., *J. Agr. Food Chem*. 1974. **22**, (1), 17.
9. HEMPERLY, J., HOPP, T., BECKER, J. and CUNNINGHAM, B., *J. Biol. Chem*. 1979. **254**, (14), 6803.
10. HOPP, T., HEMPERLY, J. and CUNNINGHAM, B., *J. Biol. Chem*. 1982. **257** (8), 4473.
11. SALK, J.E., *J. Immunol*. 1944. **49**, 87.
12. SCOPES, R.K., "Protein Purification. Principles and Practice", Spring-Verlange, New York, p. 240. 1982.
13. ASECIO, E. "Estudio comparativo de la actividad hemoaglutinante de algunas leguminosas colombianas, Purificación y caracterización de la hemoaglutinina del haba (*Vicia faba*)", Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1975.
14. NAVARRO, Y. "Estudio de la eventual interacción *Rhizobium-lectina* de *Vicia faba*", Tesis de Magister Scientiae, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1982.
15. FAJARDO, A. "Estudio de la actividad eritroaglutinante de las subunidades de la fabina", Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1984.