

DETERMINACION DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA LA EXTRACCION DE LA LECTINA DE RAIZ DE HABA (*Vicia Faba*)

Y. de Navarro*, G. Pérez
Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
de Colombia. A.A. 14490. Bogotá, Colombia

Keywords: Lectin, root, *Vicia faba*, erythroagglutination, *fava bean*, Extraction.

RESUMEN

Para la determinación de las mejores condiciones de extracción de la lectina de raíz de haba (LRH), se utilizaron inicialmente raíces enteras y paredes celulares de raíces. De acuerdo con los resultados, se establecieron las condiciones experimentales para la preparación de paredes celulares por tres métodos. Se encontró que el Método I, en el cual se usó Sarkosyl 0.5%, KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0 para la obtención de paredes celulares y luego se extrajo la lectina con buffer de citrato de sodio 0.1 M pH 4.2, es el más adecuado. El fraccionamiento se realizó por filtración por gel usando Sephadex G-25.

ABSTRACT

For the determination of the best extraction conditions of the lectin from fava bean roots (LRH), whole root cell walls were used initially. According to the results three methods were established for the preparation of cell walls. The best method was I which used Sarkosyl 0.5%, KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0 to prepare the cell walls and 0.1 M pH 4.2 citrate buffer to extract the lectin. Fractionation of the lectin was performed by gel filtration with a Sephadex G-25 column.

INTRODUCCION

Dentro de los sistemas biológicos capaces de fijar el N_2 atmosférico, uno muy promisorio lo constituye la asociación simbiótica entre las bacterias del género *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas. En este sistema tanto la bacteria como la planta contribuyen a la especificidad de la simbiosis (1).

Bohlool y Schmidt (2) sugirieron que las lectinas producidas por la leguminosa hospedera podrían intervenir en la determinación de la especificidad. Las lectinas son proteínas que se enlazan, con un alto grado de especificidad, a la superficie celular a través de oligosacáridos (3). La hipótesis plantea que la lectina presente en un sitio sobre la superficie de la raíz de la leguminosa, interactúa específicamente en la superficie del *Rhizobium* apropiado, como preludio a la nodulación.

Han sido encontradas lectinas en varias partes de la planta como: Cotiledones, raíces, tallos, hipocótilos, hojas y cortezas variando la cantidad de proteína dependiendo de la especie, edad de la planta y órgano examinado (4 - 6).

Pueppke et al (4), Schmidt (7) y Gade et al (8) han descrito el aislamiento y caracterización de la lectina de raíz de soya. En el caso de la lectina de raíz de trébol las investigaciones han sido realizadas principalmente por el grupo de Dazzo (9, 10). La lectina de raíz de arveja ha sido detectada y caracterizada parcialmente por diversos investigadores (11 - 15); habiéndose en algunos casos estudiado su interacción con varias cepas de *Rhizobium*.

En este trabajo se determinaron las mejores condiciones para la extracción y fraccionamiento de la lectina de raíz de haba (*Vicia faba*) LRH, dado que la interacción R. leg biovar viciae - haba se realiza a nivel de la raíz.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de Raíces: Se utilizaron semillas de haba Var teusacá seleccionadas por tamaño uniforme, esterilizadas de acuerdo con la técnica descrita por Vincent (16). Para la germinación de las semillas se utilizaron diferentes soportes como: Musgo fresco, vermiculita o arena lavada. En un cristizador que contenía una capa de soporte más o menos compacta de unos 2 cm de espesor y 200 mL de H₂O; se cubrió con papel de aluminio y una banda de caucho; se esterilizó a 15 lb/pulg² de presión, 120°C, durante 30 min. Sobre el soporte se sembraron 40-50 semillas de haba, se dejaron germinar en la oscuridad y cuando los tallos alcanzaron una longitud aproximada de 2 cm se retiró el papel aluminio y se dejaron crecer al ambiente bajo el fotoperíodo solar. Cumplido el tiempo de seado (5, 6 o 7 semanas), se cortaron las raíces, se lavaron con H₂O destilada hasta que quedaran limpias y sin residuos del soporte. Se dejaron secar sobre papel de filtro, se pesaron y a partir de ellas se extrajo la lectina.

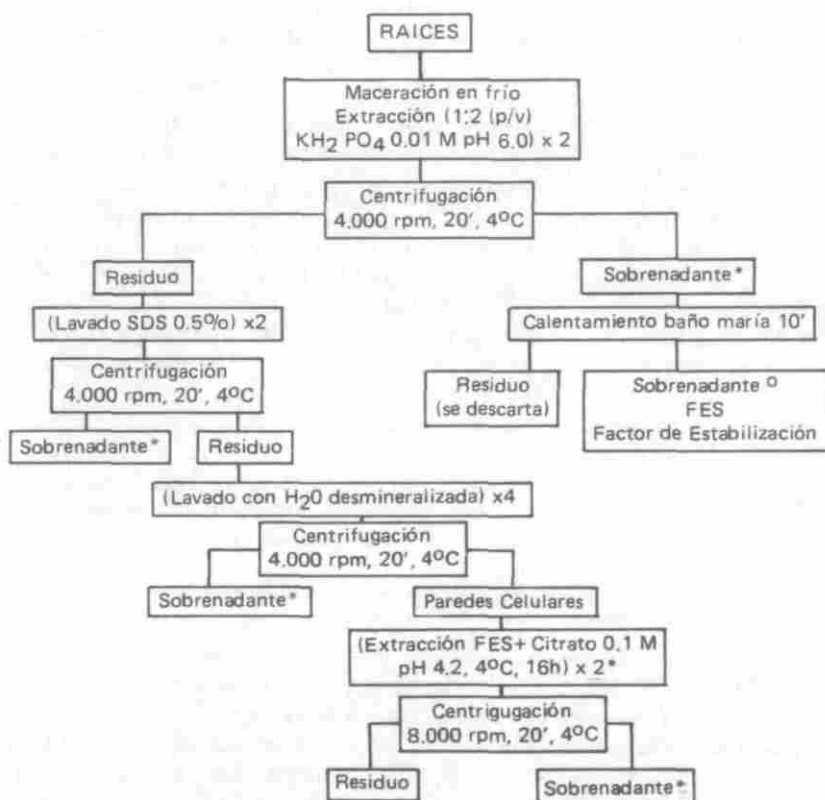
Ensayos preliminares con raíces enteras. Las raíces enteras de 4 semanas de edad se sometieron a la acción de las siguientes soluciones extractoras: a) NaCl 1%, b) K₂HPO₄ 0.5 M, pH 7.0 + β -mercaptoetanol 0.2% y c) glu 33 mM, gel 33 mM, gal 33 mM y sac 33 mM en NaCl 1%.

Las raíces se maceraron utilizando 3g de raíces frescas por cada 5mL de extractante. Una vez obtenido un macerado homogéneo se centrifugó a 1.000 rpm durante 20 min a 4°C. El residuo se reextrajo una vez más con cada uno de los extractantes. Con los sobrenadantes resultantes se efectuaron ensayos de eritroaglutinación (17) utilizando sangre de grupos A⁺ y O⁺. Una alícuota de cada uno se sometió a diálisis contra NaCl 1%, durante 3 días, efectuando 3 o 4 cambios diarios. Nuevamente se realizaron ensayos de eritroaglutinación con los retentatos. Como blanco se utilizó una alícuota de NaCl 1%.

De acuerdo con los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares, se prefirió utilizar un método de extracción a partir de paredes celulares de raíces de haba y no de raíces enteras.

Preparación de paredes celulares. Se siguió inicialmente el procedimiento descrito por el grupo de Kauss (18, 19) con algunas modificaciones en cuanto a la solución utilizada en la maceración (KH_2PO_4 0.01M pH 6.0) y las condiciones de centrifugación. Las condiciones experimentales empleadas se indican en el Esquema 1. Con una alícuota de cada uno de los sobrenadantes que se indican en este esquema, se efectuaron ensayos de eritroaglutinación adicionando NaCl sólido al extracto hasta obtener una concentración aproximada del 1% en NaCl.

Esquema 1
PREPARACION DE PAREDES CELULARES Y EXTRACCION DE LRH
DE LRH DE *Vicia faba*



- * Actividad hemaglutinante
- ° No presenta actividad hemaglutinante
- + Presenta hemólisis

Extracción de la lectina de raíz (LRH). En un ensayo preliminar se utilizaron como extractantes iniciales de las paredes celulares: Fosfato de potasio 0.5M en β -mercaptoetanol 0.2M pH 7.0, NaCl 1% y citrato de sodio 0.1M pH 4.2. De acuerdo con los resultados se usó como extractante buffer de citrato de sodio 0.1M pH 4.2. A las paredes celulares de raíces de 6 y 7 semanas de edad, tiempo de germinación del haba que contiene la mayor concentración de lectina (20), se le adicionaron 0.5 mL de FES (factor de estabilización) y 2 mL del extractante por 1 g de raíz fresca. Las etapas de preparación usadas según el esquema 1.

Los residuos obtenidos luego de la extracción con buffer citrato, fueron extraídos con EDTA- Na_2 0.05 M en idénticas condiciones a las descritas. Se efectuaron ensayos de aglutinación utilizando extractos de citrato obtenidos a partir de raíces con 6 y 7 semanas de edad dializados y sin dializar.

Métodos de preparación de paredes celulares y extracción de la LRH. De acuerdo con los resultados preliminares se establecieron las condiciones experimentales para la preparación de paredes celulares a partir de raíces de plántulas de 7 semanas.

En el método I (Esquema 2) se usó en la maceración de las raíces la misma solución de KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0 pero adicionándole Sarkosyl 0.5%. En el método II (Esquema 2) se utilizó solución de KH_2PO_4 0.01M, pH 6.0, ácido ascórbico 0.05M y polivinilpirrolidona (pvp) al 2%. Se aisló la LRH, en ambos casos, con buffer de citrato de sodio 0.1M, pH 4.2 en iguales condiciones a las descritas, obteniéndose así los extractos de EI y EII a los cuales se les determinó su actividad eritroaglutinante. En el método III (Esquema 3) las raíces se maceraron directamente con una solución de NaCl 1%. Posteriormente el residuo se extrajo con citrato 0.1M, pH 4.2 en las condiciones antes mencionadas (EIII).

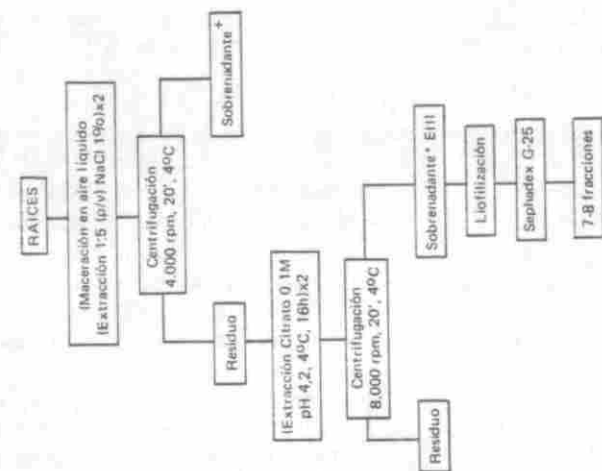
Fraccionamiento de la LRH. Los extractos EI, EII y EIII se fraccionaron en una columna Sephadex G-25 (80 x 2 cm) utilizando H_2O desm. Se colectaron fracciones de 2 mL con una velocidad de flujo aproximada de 8 mL/h. Se determinó $A_{230}^{1\text{cm}}$ y en algunos casos $A_{280}^{1\text{cm}}$. Las fracciones que presentaron absorción se reunieron, se liofilizaron y con ellas se realizaron pruebas de eritroaglutinación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayos preliminares con raíces enteras: Los extractos obtenidos con NaCl 1% y K_2HPO_4 0.5 M, pH 7.0 + B mercaptoetanol 0.2% presentaron una coloración negruzca debida posiblemente a la oxidación de taninos y compuestos fenólicos presentes en las raíces de haba. Cuando se sometieron a diálisis y luego a centrifugación se obtuvieron extractos claros. Las pruebas de aglutinación presentaron actividad hemolítica antes de dializarlos pero luego de la diálisis no hemolizaron ni tampoco aglutinaron los eritrocitos.

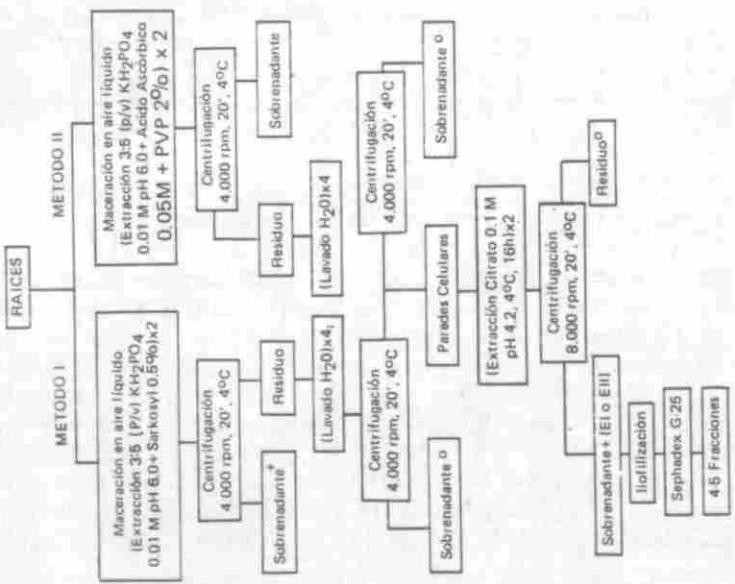
Únicamente el extracto resultante de la maceración de las raíces enteras con la solución de glu 33 mM, gal 33 mM y sac 33 mM en NaCl 1% sin dializar presen-

Esquema 3
 ESQUEMAS DE PREPARACION DE PAREDES CELULARES
 Y EXTRACCION DE LRH DE *Vicia faba*



* Actividad hemaglutinante
 + Presente hemolisis

Esquema 2
 ESQUEMAS DE PREPARACION DE PAREDES CELULARES
 Y EXTRACCION DE LRH DE *Vicia faba*



* Actividad hemaglutinante
 0 No presenta actividad hemaglutinante
 + Presente hemolisis

tó una actividad hemoaglutinante débil (+1) que se perdía al someterlo a diálisis. Estos resultados indicaron que la mezcla de azúcares utilizada fue capaz de extraer la **LRH** pero en baja proporción ya que su actividad hemoaglutinante fue débil. Dicha actividad se pudo observar sin necesidad de eliminar los azúcares debido a que ninguno de ellos es inhibidor de la **LRH** a la concentración utilizada (21).

Preparación de paredes celulares: De acuerdo con el Esquema 1, se hicieron ensayos de eritroaglutinación con el sobrenadante de la extracción con KH_2PO_4 0.01 pH 6.0, con los sobrenadantes de los lavados con SDS, con H_2O desm y con el sobrenadante que correspondería al factor de estabilización hallado por Kauss y Bowles (19). Los 3 primeros extractos hemolizaron los eritrocitos en muy breve tiempo, sea que se agregue o no NaCl sólido para una concentración final aproximada del 1% en NaCl. El factor de estabilización (FES) tampoco presentó actividad hemoaglutinante, lo cual indicaría que en esta etapa del proceso aún no se ha extraído la lectina. Kauss y Bowles observaron que en el caso de *P. aureus*, el FES parece mejorar la extracción de la lectina de las paredes celulares. De acuerdo con lo observado en este trabajo el FES no sería necesario para la extracción de la lectina a partir de paredes celulares de raíz de haba; por tal razón en las extracciones posteriores se omitió.

Extracción de la LRH: La solución que mostró mejores resultados como extractante de la **LRH** fue el citrato de sodio 0.1 M, pH 4.2. Resultados muy similares se encontraron en la extracción de las lectinas de raíces de arveja (14), frijol y alfalfa (22). Es posible, como lo anotan Kauss y Bowles (19) que en el enlazamiento de estas lectinas a la pared celular estén involucrados iones metálicos de naturaleza desconocida, que se remueven mediante el agente complejante utilizado, permitiendo así la liberación de la lectina. La utilización de EDTA-Na_2 0.05 M, como segundo extractante no produjo resultados satisfactorios; aunque es también un agente complejante, es posible que en el momento de su utilización, la lectina se hubiera liberado en gran proporción con el primer extractante.

Es así como, únicamente el extracto de paredes celulares con citrato de sodio 0.1M, pH 4,2 presentó una actividad eritroaglutinante fuerte (+3) (Esquema 1). En la aglutinación se observaron aglomerados de tamaño considerable y un cambio en la coloración de los eritrocitos de roja a parda debido posiblemente al pH ácido del extracto. Este resultado mostró en primer lugar, que las condiciones de lavado de las paredes celulares con SDS fueron adecuadas para la liberación posterior de la lectina sin perjudicar su actividad hemoaglutinante, diferente a lo reportado por Kauss y Bowles (19) quienes establecieron que con más de 4 lavados con este detergente se disminuiría el rendimiento en la extracción. En segundo término demostró que la lectina extraída está presente en las paredes celulares y no en el citoplasma de las células de raíces de haba, ya que los extractos iniciales con KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0 no presentaron actividad aglutinante.

El extracto de **LRH** obtenido a partir de paredes celulares presentó una actividad

hemoaglutinante más fuerte que cuando se extrajo con la mezcla de azúcares a partir de raíces enteras.

Por otra parte, cuando se efectuaron los ensayos de aglutinación usando los extractos de citrato obtenido de paredes celulares con 5, 6 y 7 semanas de edad dializados y sin dializar, se encontró que los extractos sin dializar presentaron una aglutinación inespecífica respecto a los dos grupos sanguíneos humanos utilizados, mientras que los extractos dializados perdían por completo la actividad hemoaglutinante (Tabla 1). Resultados muy similares encontró Luque (14) para las raíces de arveja y Maldonado (22) para las raíces de frijol y maní.

Tabla 1
CAPACIDAD ERITROAGLUTINANTE DE LOS EXTRACTOS CON CITRATO DE PAREDES CELULARES DE RAICES DE 5, 6 Y 7 SEMANAS Y VALORES DE ABSORBANCIA DE ESTOS EXTRACTOS ANTES Y DESPUES DE DIALIZAR

Extractos con citrato (Semanas)	Aglutinación (1) Eritrocitos				1 cm A ₂₈₀ antes de diálisis	1 cm A ₂₈₀ después de diálisis
	TIPO A ⁺		TIPO O ⁺			
	1 h	4 h	1 h	4 h		
5	+2	+3	+2	+3	0,920	0,032
6	+2	+3	+2	+3	1,200	0,027
7	+2	+3	+2	+3	1,300	0,025

(1) Aglutinación antes de diálisis en la cual se observó perreamiento. Después de diálisis no hubo aglutinación en ninguno de los casos.

Métodos de preparación de paredes celulares y extracción de la LRH. En el método inicialmente utilizado para la preparación de las paredes celulares existía la posibilidad de la ocurrencia de una proteólisis de los componentes presentes en los extractos incluyendo la lectina, ya que los lavados con SDS que disminuyen la actividad de las enzimas hidrolíticas, se realizaban después de la maceración de las raíces con KH_2PO_4 0.01 M pH 6.0. Además los extractos obtenidos mostraban una fuerte coloración oscura debido posiblemente a la presencia de taninos y compuestos fenólicos. Por estas razones se modificaron las condiciones para la preparación de paredes celulares.

En el método I (Esquema 2) la adición de Sarkosyl 0.5% a la solución de KH_2PO_4 0.1 M, pH 6.0 buscó inhibir la acción de enzimas proteolíticas evitando el rompimiento de la lectina presente en la pared. Este detergente se ha usado para inhibir hexoquinasa (23) e inhibe la tripsina en concentraciones del orden de 0.01%.

En el método II (Esquema 2) se adicionó pvp al 2% y ácido ascórbico 0.05 M a la solución de KH_2PO_4 0.01 M, pH 6.0, el primero con el objeto de eliminar

taninos y compuestos fenólicos y el segundo como agente antioxidante. En ambos métodos las modificaciones realizadas dieron como resultado la obtención de extractos claros poco pigmentados lo que indicó una inhibición de las oxidadas presentes en los extractos. Los ensayos de aglutinación con los sobrenadantes resultantes en las diferentes etapas del proceso mostraron actividad eritroaglutinante fuerte (+3) en los extractos **EI** y **EII**.

Posteriormente se empleó un esquema de extracción diferente que se denominó método III (Esquema 3) donde se utilizó NaCl 1% en la maceración de las raíces. Se obtuvo un sobrenadante que presentó coloración negruzca actividad hemolítica y un residuo que correspondió prácticamente a las paredes celulares de donde se liberó también con citrato la lectina. Este extracto **EIII** presentó una actividad hemoaglutinante similar a la de los extractos **EI** y **EII**. Esta forma de extracción de la lectina de raíz confirmó la presencia de ella en las paredes celulares y no en el citoplasma de las raíces.

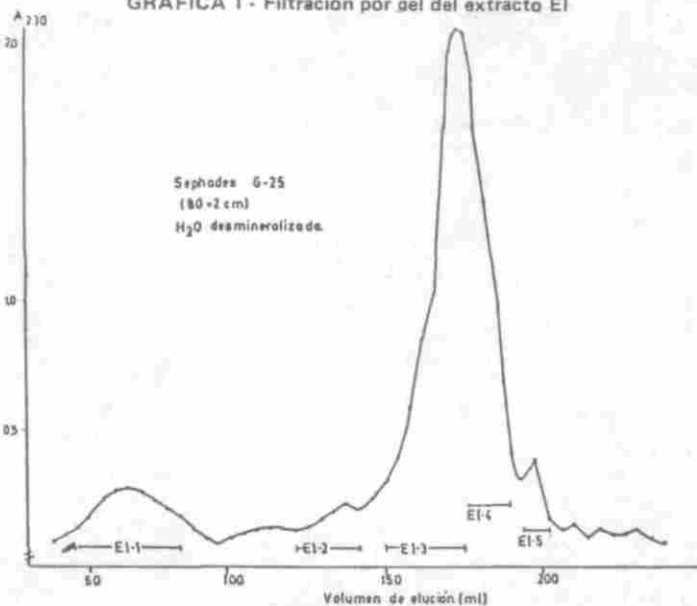
Los mejores resultados para la extracción de la **LRH** se obtuvieron con el método I ya que la adición de Sarkosyl como agente desnaturizante de las proteínas evitó la acción de enzimas proteolíticas y oxidasas, mientras que en el método III sí es posible la ocurrencia de proteólisis y de reacciones de oxidación. Además el extracto **EII** liofilizado presentó una coloración rojiza, debido posiblemente a la presencia de pvp complejoado con polifenoles el cual es insoluble mientras que el extracto **EI** liofilizado es poco pigmentado y esto facilitó la observación en los ensayos de eritroaglutinación

Fraccionamiento de la LRH. La cromatografía de **EI**, **EII** y **EIII**, por Sephadex G-25 produjo los perfiles de elución indicados en las gráficas 1, 3 y 4 respectivamente. En la Gráfica 1 se observa un pico muy elevado con actividad hemoaglutinante, cuyo volumen de elución fue moderado (entre 150 y 200 mL) y correspondió a las fracciones **EI-3** y **EI-4**. Análogamente la Gráfica 2 muestra el perfil cromatográfico típico, del extracto **EI** determinado a 230 nm y 280 nm. Las fracciones activas **EI-3** y **EI-4** se encuentran localizadas dentro del pico determinado a 230 nm.

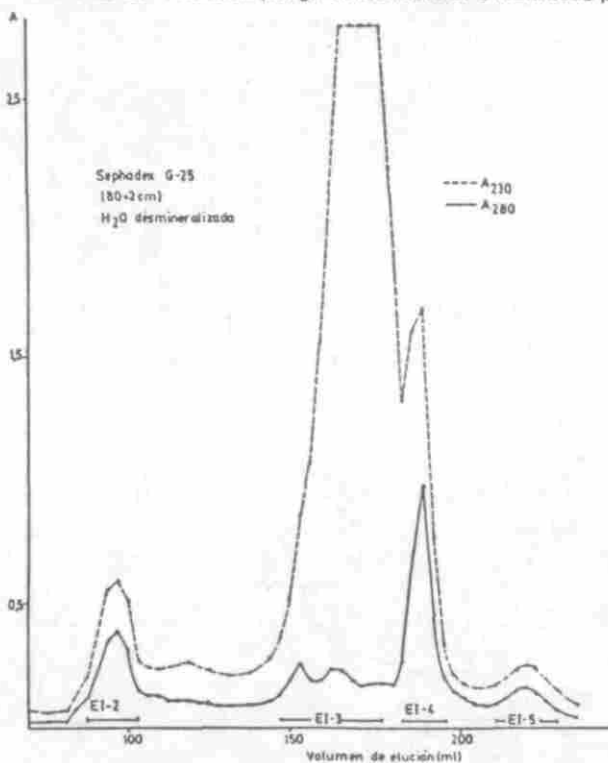
El perfil de elución del extracto **EII** (Gráfica 3) presentó también un elevado pico con actividad hemoaglutinante que corresponde a las fracciones **EII-3** y **EII-4**. El volumen de elución en este caso fue menor (entre 100 y 150 ml) que el observado en las Gráficas 1 y 2. En ambos casos las 3 fracciones restantes no presentaron actividad eritroaglutinante

En la Gráfica 4 se observó (perfil cromatográfico **EIII**) una mejor resolución y dos componentes con actividad hemoaglutinante; las fracciones **EIII-3** y **EIII-4** similares a las que presentaron las lectinas obtenidas por los métodos I y II. Como en los casos anteriores, las otras fracciones no presentaron actividad eritroaglutinante.

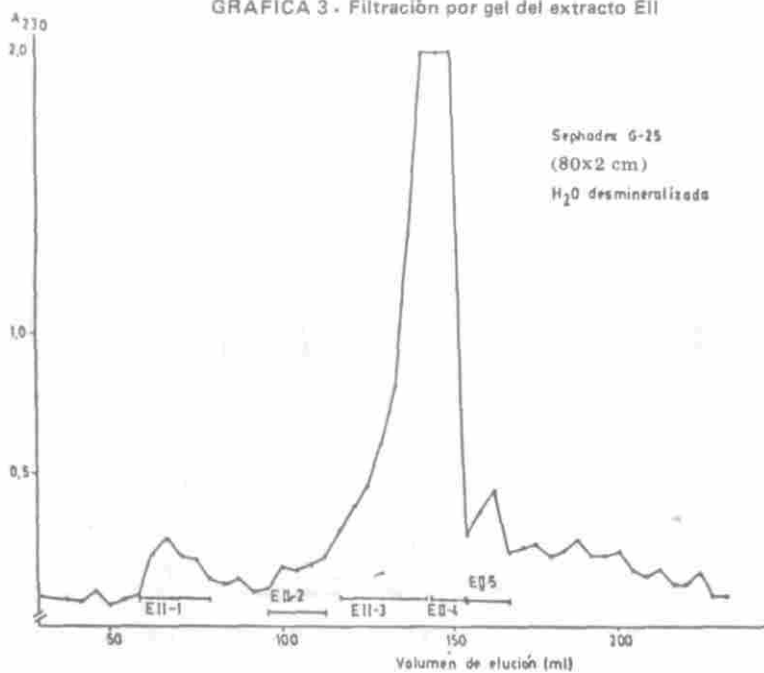
GRAFICA 1 - Filtración por gel del extracto EI



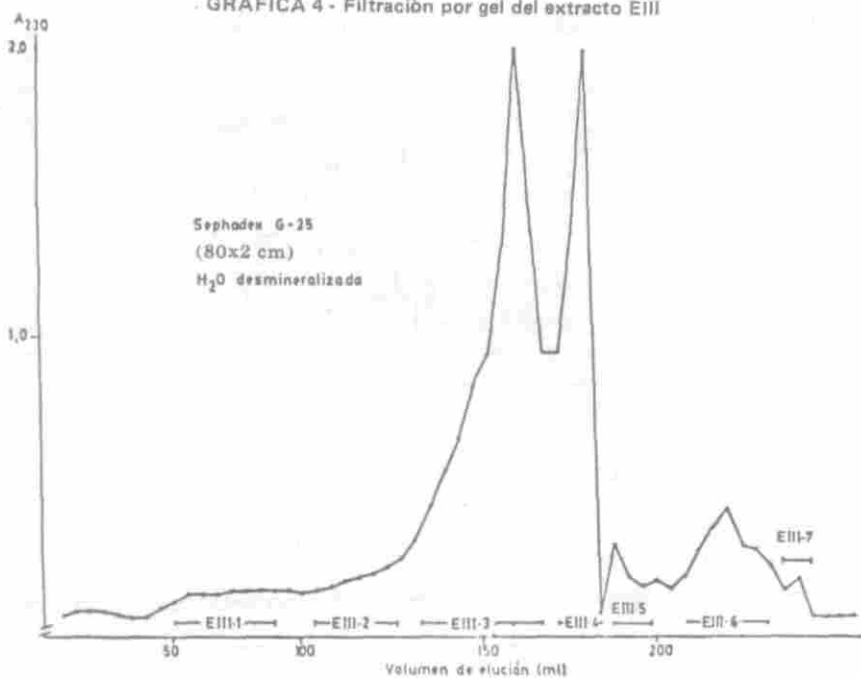
GRAFICA 2 - Filtración por gel del extracto EI Ultrafiltrado por UM05



GRAFICA 3 - Filtración por gel del extracto EII



GRAFICA 4 - Filtración por gel del extracto EIII



En la observación de todas las aglutinaciones donde se utilizaron los extractos de LRH se apreció pardeamiento en los eritrocitos. El buffer de citrato 0.1 M pH 4.2 utilizado como extractante y como blanco en todas las determinaciones de aglutinación por sí solo es capaz de aglutinar los eritrocitos humanos, pero su actividad es débil y lo hace después de 7 a 8 horas de incubación, tiempo superior al que requieren los extractos de LRH para exhibir su acción aglutinante.

Basados en los resultados similares obtenidos en los ensayos de aglutinación de la LRH, aislada de acuerdo con los métodos I, II y III, se pudo concluir que las modificaciones hechas en la obtención de paredes celulares no influyeron en la actividad hemoaglutinante de las lectinas aisladas con citrato. Por otra parte, no se observaron variaciones importantes en los perfiles de elución (Sephadex G-25) de los Extractos EI, EII y EIII, donde en cada caso se obtuvieron dos fracciones con poder eritroaglutinante.

Cabe recordar que el extracto EI liofilizado antes de ser sometido a filtración por gel presentaba poca pigmentación y en las fracciones resultantes EI-3 y EI-4 no se apreció ninguna coloración lo que facilitó los ensayos de aglutinación. El conjunto de resultados sugieren que el método I es el más adecuado para posteriores extracciones de la LRH.

Agradecimientos: Manifestamos nuestros agradecimientos a la Organización de Estados Americanos y el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero. Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por su gentil colaboración.

BIBLIOGRAFIA

1. BROUGHTON, W. J. *J. App. Bacteriol* **1978** 45, 165.
2. BOHLOOL, B. B.; SCHMIDT, E. L. *Science* **1974** 185, 269
3. LIS, H.; SHARON, N. *Ann. Rev. Biochem* **1973** 42, 541.
4. PUEPPKE, S. G.; BAUER, W. D.; KEEGSTR, K.; FERGUSON, A. L. *Plant. Physiol.* **1978**, 61, 779.
5. PUEPPKE, S. G. *Plant Physiol.* **1979**, 64, 575.
6. ETZLER, M. E. In "The Lectins" Liener I. E.; Sharon, N. and Goldstein, I. J, eds. Academic Press, Inc, Orlando, Florida, **1986**, pp. 371.
7. SCHMIDT, E. L. *Ann. Rev Microbiol.* **1979**, 33, 355.
8. GADE, W.; JACK, M. A.; DAHL, J. B.; SCHMIDT E.L.; WOLD, F. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 12905.
9. DAZZO, F. B.; YANKE, W. E.; BRILL; W.J. *Biochim Biphys. Acta.* **1978**, 539, 276.
10. DAZZO, F. B. In "Nitrogen Fixation." W.E. Newton and W.H. Orme-Jhonson eds, Vol II, University Park Press, Baltimore, Maryland. **1980**, pp. 165.

11. KIJNE, J.W.; VAN DER SCHAAL I.A.M.; De VRIES GE. *Plant Sci. Letters*. 1980, 18, 65.
12. KIJNE, J. W.; VAN DER SCHAAL I.A.M. "Pea lectins and Surface Carbohydrates of *Rhizobium leguminosarum*". Current Perspectives in Nitrogen Fixation, Proceedings of the fourth international symposium on Nitrogen Fixation held in Canberra, Australia, December 1980, 425.
13. GATEHOUSE, J.A.; Boutler, D. *Physiol. Plant*. 1980, 49, 437.
14. LUQUE, E. "Estudio de la Eventual Interacción *Rhizobium* Lectina de *Pisum sativa*". Tesis Magister en Ciencias. Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1981.
15. BUFFARD, J. M.; KAMINSKI, P. A.; STROSBERG, D. *Planta* 1988, 173, 367.
16. VINCENT, J. M., "Manual Práctico de *Rhizobiología*". 1o. Ed. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 1975.
17. NAVARRO, Y.; PEREZ, G. *Rev. Col. Quim.* 1978, 8, 25.
18. KAUSS, H.; GLASER, C. *FEBS Letters*. 1974, 45, 304.
19. KAUSS, H.; BOWLES, D. J. *Planta (Berl)* 1976, 130, 169.
20. DE NAVARRO, Y. "Estudio de la Eventual Interacción *Rhizobium*- Lectina de *Vicia faba*." Tesis Magister en Ciencias. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1982.
21. DE NAVARRO, Y.; PEREZ, G. *Rev. Col. Quim.* 1990, 19-1, 35.
22. MALDONADO, C. E. "Estudio comparativo de lectinas presentes en semillas y raíces de algunas leguminosas". Tesis. Químico, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá 1982.
23. PHARMACIA FINE CHEMICALS. "Separation media, equipment and Instrumentation for chromatography electrophoresis and cell studies". Catalogue, p. 11. 1979.