

**CARACTERIZAREA FAZEOLINEI MODIFICATE IN VIVO****Diana MORARI, Tatiana STEPURINA, Vitalie I. ROTARI**

LCȘ „Biochimia Plantelor”

Phaseolin, the 7S seed storage protein from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), partially modified *in vivo* during seed germination and seedling growth was isolated from cotyledons of 6 day germinated seedlings (phaseolin-*in vivo*). SDS-PAGE showed that the pattern of fragments of phaseolin-*in vivo* is similar to that of the phaseolin degraded by legumain - phaseolin-LLP. Native electrophoresis showed that phaseolin-*in vivo* consists of four molecular forms. 2-D electrophoresis showed that the molecular form of phaseolin-*in vivo* that is similar to phaseolin-LLP retains in its quaternary structure some of the fragments detected by SDS-PAGE. Phaseolin-*in vivo* retains the property to reversibly associate/dissociate with the changes in pH. At pH 4.6 it is present in its dodecameric form while at pH 8.0 in its protomeric form. The implications of the finding that phaseolin-*in vivo* retains the same property of native phaseolin to associate into dodecamers at acidic pHs are discussed.

Asigurarea cu produse alimentare a populației globului pământesc reprezintă o mare provocare la nivel mondial [1]. Deoarece problema privind deficiența proteinelor în alimentarea oamenilor este actuală, în prezent producerea și utilizarea în alimentație a proteinelor de origine vegetală are o importanță foarte mare. De aceea, interesul față de studierea proteinelor vegetale niciodată nu a scăzut [2]. Conform datelor Organizației pentru Alimentație și Agricultură a ONU (FAO), rația alimentară a oamenilor la nivel mondial conține 70% proteine vegetale din plantele cerealiere și leguminoase [3]. Deci, plantele leguminoase sunt printre cele mai importante plante de cultură [2,4,5] și reprezintă una dintre resursele majore de proteine care sunt considerate ca sursă principală de proteine dietare de origine vegetală [2].

Semințele plantelor de cultură folosite în alimentație conțin o cantitate mare de diferite grupe de proteine de rezervă (PR): albumine, globuline și prolamine [6,7,8]. În semințele plantelor leguminoase ele sunt reprezentate de două tipuri de globuline: leguminele (sau 11S) și vicilinele (sau 7S) [2,6,7]. PR din semințele plantelor leguminoase, în general [2,6], și cele din fasole, în particular [9], au o mare importanță economică, reprezentând o sursă nutritivă valoroasă de proteină pentru alimente și furaj. Mai mult decât atât, aceste proteine au atras o atenție deosebită în ultimii ani, datorită proprietăților lor „funcționale” (fizico-chimice) importante pentru folosirea în produsele alimentare [2].

Deși fasola reprezintă o plantă de cultură crescută în lumea întreagă pentru alimentație și furaj [10], ale cărei semințe conțin până la 30% de proteină după greutate [8], dintre care până la 75% sunt reprezentate de globuline [8], și fazeolina – PR principală, care alcătuiește 76% din globuline [8], posedă proprietăți funcționale excelente [11], folosirea fasolelor în alimentație este limitată de unele aspecte toxicologice [10], care împiedică utilizarea lor în diete [12].

Unul dintre cei mai importanți factori care afectează valoarea nutritivă a PR este susceptibilitatea lor la acțiunea proteinazelor tractului digestiv [13]. Prezența proteinelor cu o digestibilitate redusă are o implicație negativă asupra nutriției și reduce calitatea sursei proteice pentru alimentație [14]. Mai mult decât atât, a fost arătat că PR din superfamilia cupinei, care au o structură stabilă și rezistentă la proteoliză, reprezintă alergeni majori în produsele de origine vegetală [15].

Viteza hidrolizei câtorva PR native din semințele plantelor leguminoase este relativ rapidă [16], ceea ce rezultă în hidroliza profundă a acestor PR [16]. Singura excepție de la această regulă este reprezentată de fazeolină [16,17]. Hidroliza ei la acțiunea proteinazelor exogene (inclusiv digestive) se oprește după clivarea unui număr mic de legături peptidice (modificarea limitată a moleculei), care rezultă în formarea fragmentelor cu masă moleculară ( $M_r$ ) ce corespunde aproximativ cu jumătate din subunitate a catenelor fazeolinei native [16,17]. Deoarece fazeolina este mobilizată pe parcursul germinării seminței (adică, hidrolizată până la aminoacizi), se considera că în semințe pe parcursul acestui proces sunt expresate proteinaze care pot înfăptui o hidroliză profundă a fazeolinei. Însă, două proteinaze cisteinice majore purificate din semințele germinate de fasole, CPPh – o proteinază papainică [18] și legumaina – o proteinază Asn-specifică [19], individual înfăptuiesc numai hidroliza limitată a fazeolinei [18,20,21]. Până în prezent nu s-a obținut hidroliza profundă a fazeolinei la acțiunea a nici uneia dintre proteinazele testate. Această rezistență a fazeolinei la

acțiunea individuală a proteinazelor, atât exogene, cât și endogene, a sugerat că se datorează particularităților structurale ale fazeolinei ce o deosebesc de alte PR [17,18,19]. De aceea, determinarea cauzelor exacte ale acestei proprietăți neobișnuite a structurii fazeolinei reprezintă un interes teoretic și practic.

Acțiunea consecutivă a diferitelor proteinaze asupra fazeolinei are în general un caracter adiativ [17]. Numai acțiunea CPPH-ului asupra fazeolinei modificate de către legumaină duce la scindarea completă a fazeolinei [21]. Însă, nu se știe dacă însăși fazeolina modificată de către legumaină, fazeolina-LLP [22], este susceptibilă la proteoliza profundă sau dacă ea devine susceptibilă numai după modificarea adăugătoare de către CPPH. Până în prezent, căutarea formei moleculare a fazeolinei susceptibile la hidroliza profundă s-a făcut doar prin analiza fazeolinei modificate *in vitro* de către diferite proteinaze. Dar, există și o altă cale – purificarea fazeolinei modificate *in vivo* pe parcursul germinării semințelor de fasole. Anume caracterizarea proprietăților fazeolinei modificate *in vivo* a și reprezentat scopul acestei lucrări.

### Material și metode

**Purificarea fazeolinei.** Fazeolina a fost izolată din semințele mature de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.) după metoda lui Schlesier și al. [23]. Fazeolina parțial degradată *in vivo* (fazeolina-*invivo*), care reprezintă o mixtură complexă a câtorva forme moleculare ale fazeolinei care au un diferit grad de scindare (modificare) a moleculei, a fost izolată din semințele de fasole germinate șase zile. A fost ales anume acest termen, deoarece până la șase zile crește activitatea proteinazelor endogene [24], iar fazeolina atinge un nivel de modificare destul de profund [19,24], totodată nefiind complet modificată [19, 24]. Fazeolina-*invivo* a fost izolată prin modificarea metodei lui Hall și al. [25], inițial fiind elaborată pentru izolarea fazeolinei native, prin adăugarea cocktailului de inhibitori ai proteinazelor din diferite clase (Pepstatin 1μM, EDTA 5mM, Pefabloc 0,5mg/ml, Iodacetat 50μM, Iodacetamidă 50μM, E64 5μM) la etapa de extragere a proteinei.

**Electroforeza în gel de poliacrilamidă (GPAA).** Electroforeza în prezența dodecil-sulfatului de sodiu (SDS) (electroforeza SDS) a fost efectuată în GPAA de 12,5% conform metodei Laemmli [26]. Fosforilaza b (94 kDa), albumina serică bovină (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  $M_r$ . Gelurile au fost colorate cu Coomassie brilliant blue G-250 conform procedurii standard.

Electroforeza în condiții native în gradientul GPAA (electroforeza nativă) 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 serică bovină (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.

Electroforeza bidimensională (electroforeza 2-D) a fost efectuată într-un gradient vertical (4-30%) al GPAA în condiții native în prima direcție și apoi benzile proteice au fost tăiate din gel și supuse electroforezei SDS în a doua direcție.

**Gel-filtrarea.** Soluțiile de fazeolină și de fazeolină-*invivo* cu concentrația de 20 mg/ml au fost supuse gel-filtrării pe coloana cu sephacryl S200 (0,72 × 80 cm) la două pH-uri:

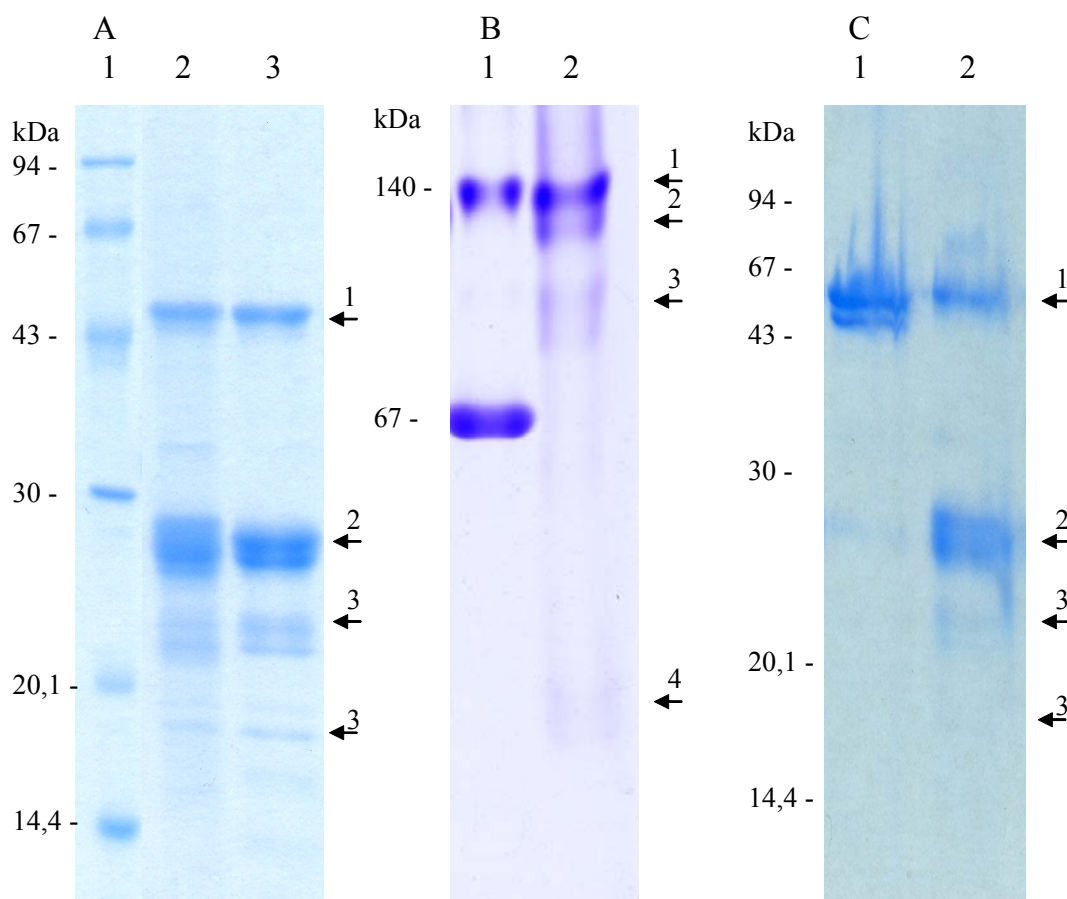
- 1) pH 4,6 – tampon fosfat-citrat 120 mM, 180 mM NaCl, 0,04% NaN<sub>3</sub>, 0,5 mM EDTA;
- 2) pH 8,0 – tampon tris-HCl 50 mM, 500 mM NaCl, 0,04% NaN<sub>3</sub>, 0,5 mM EDTA.

Coloana a fost echilibrată cu tamponul corespunzător și cromatografia a fost efectuată la viteza de 12,6 ml/oră. Absorbanța la 280 nm a fost înregistrată continuu și au fost colectate fracțiile de 1, 9 ml (9 min).

### Rezultate și discuții

Electroforeza SDS a arătat că fazeolina-*invivo* constă din subunități native și fragmente cu  $M_r$  cuprinse între 11 și 27 kDa (Fig.1A). Un astfel de spectru al fragmentelor ce constituie fazeolina-*invivo* a fost observat și atunci când fazeolina-*invivo* a fost izolată fără a fi protejată de acțiunea proteinazelor endogene prin adăugarea inhibitorilor [19,24]. Fragmentele cu  $M_r$  mai mică de jumătate de subunitate (grupul 3) sunt complet similare celor generate la hidroliza fazeolinei de către legumaină (Fig.1A) și, după cum a fost arătat de Senyuk și al. [19], provin din clivarea legăturilor peptidice cu Asn în poziția P1: N103-P, N220-T și N235-S, toate fiind situate pe aceeași parte a structurii moleculei de fazeolină [22]. Însă, fragmentele cu  $M_r$  aproximativ egală cu jumătate de subunitate (grupul 2) se deosebesc de cele prezente în fazeolina modificată de către legumaină (Fig.1A). Luând în considerație că la germinarea semințelor de fasole sunt active trei proteinaze

cisteinice [27] și toate modifică parțial fazeolina, generând fragmente aproximativ egale cu jumătate de subunitate [18,20,28], se poate presupune că aceste fragmente provin din clivarea moleculei de fazeolină de către diferite proteinaze. Electroforeza nativă confirmă această presupunere, arătând că fazeolina-in vivo constă din 4 forme moleculare (Fig.1B) ce au  $M_r$  de 137 kDa, 123 kDa, 97 kDa și 26 kDa. Deci, electroforeza nativă arată că scindarea subunităților fazeolinei și eliminarea unor peptide nu distabilizează structura cuaternară a moleculei fazeolinei. Forma moleculară de 137 kDa, care predomină, are aceeași  $M_r$  ca și fazeolina-LLP [22], iar celelalte trei forme au mase moleculare mai mici atât decât fazeolina-LLP [22], cât și de către fazeolina modificată de celelalte două proteinaze cisteinice endogene: CPPh – fazeolina-CPPh [18] și proteinaza A [28]. Este clar că aceste trei forme moleculare ale fazeolinei-in vivo pot proveni din acțiunea mai multor proteinaze endogene asupra fazeolinei. În ceea ce privește forma moleculară cu  $M_r$  de 137 kDa, electroforeza 2-D arată că numai trei fragmente cu  $M_r$  mai mică de jumătate de subunitate (grupul 3) fac parte din ea (Fig.1C) și rămân asociate în structura cuaternară a proteinei, ceea ce o deosebește de fazeolina-LLP [22]. Comparând masele moleculare ale acestor trei fragmente cu masele moleculare ale fragmentelor fazeolinei-LLP [22], se poate constata că ele provin din scindarea legăturilor peptidice N220-T și N235-S.

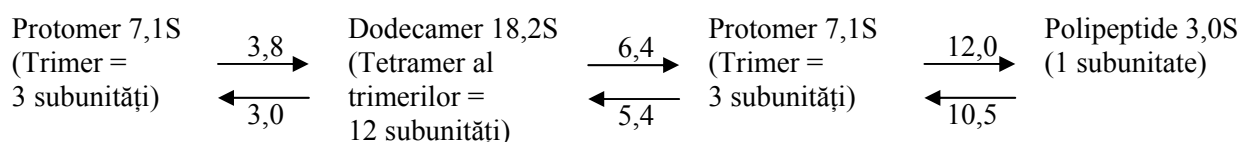


**Fig.1** Electroforeza fazeolinei-in vivo. A – SDS-electroforeza, B – electroforeza nativă, C – electroforeza 2-D: 1 – proteinele standard; 2 – fazeolina-in vivo; 3 – fazeolina-LLP.  $M_r$  a proteinelor standard (în kDa) este arătată la stânga. Grupele de fragmente (electroforeza SDS și electroforeza 2-D) și formele moleculare (electroforeza nativă) ale fazeolinei-in vivo sunt arătate la dreapta cu săgeți numerotate.

Fazeolina este un trimer format din trei tipuri de subunități similare, numite  $\beta$ ,  $\alpha$ , și  $\alpha'$ , care constau din 397, 411 și 412 aminoacizi, respectiv [29]. Fazeolina este un membru al unei familii largi de PR din plantele leguminoase, care au structuri omoloage ale subunităților [29]. În baza structurii tridimensionale a fazeolinei, determinate prin difracția razelor X împreună cu alinierea structurii primare a 15 subunități ale PR 7S, Lawrence și al. [29] au elaborat modelul canonic al structurii PR. Conform acestui model, fiecare subunitate a PR constă din două domene de mărime similară, care au practic aceeași structură și sunt formate din două

elemente: un  $\beta$ -barel compact alcătuit din opt catene  $\beta$  și un laț extins alcătuit din trei helixuri  $\alpha$  scurte. Structura  $\beta$ -bareului are o topologie („folding motif”) de „jelly-roll” [30], care are o capacitate remarcabilă de a exista în diferite stări de oligomerizare [30]. Atât vicilinele, cât și leguminele sunt proteine multimerice și constau din trei și șase subunități similare, respectiv. Pe lângă structurile terțiare similare ale subunităților [29], vicilinele de asemenea au structuri cuaternare similare: subunitățile se asociază și formează o structură în formă de disc [31].

Structurile cuaternare ale diferitelor PR au variate forme geometrice: disc, sferică, toroid [32]. Structura cuaternară a moleculei de fazeolină constituie un disc cu diametrul de 90 Å și grosimea de 35 Å [30,32]. Fazeolina nativă, spre deosebire de alte PR, posedă proprietatea de a asocia (și a disocia) reversibil într-o (dintr-o) structură supramoleculară la diferite valori ale pH-ului [33] (Fig. 2). La pH acid, de la 1,0 la 3,0, ea este reprezentată de forma sa de bază alcătuită din trei subunități (numită protomer [33]), pe când la pH acid cu valori fiziologice (care sunt caracteristice pH-ului vacuolelor [34]), de la 3,8 la 5,4, fazeolina trimerică asociază într-un dodecamer (un tetramer format din trimeri) [33]. La ridicarea valorilor pH-ului fazeolina disociază din nou în trimeri la pH neutru și slab bazic, de la 6,4 până la 10,5 [33]. Dacă pH-ul atinge valori bazice mai mari de 11,5, atunci molecula de fazeolină își pierde structura cuaternară și disociază în subunități individuale [33]. O tranziție foarte clară între tetramer și protomer se observă atunci când pH-ul este ridicat – de la 5,4 la 6,0. Ambele forme – protomerică și tetramerică – sunt prezente în diapazonul de valori ale pH-ului de la 3,8 până la 6,4, ceea ce sugerează că aceste forme sunt în echilibru, care este dependent de pH [33]. Forma tetramerică s-a adeverit a fi forma moleculei în cristalele folosite la determinarea structurii fazeolinei cu razele X [30]. Imaginile acestei forme înregistrate în condiții acide sugerează că patru trimeri asociază și formează un tetraedru regulat aflându-se pe fațetele lui [32], ceea ce o deosebește de forma geometrică a structurilor altor PR [32]. Deși a fost sugerată ideea precum că constrângerile impuse PR de rolul lor în susținerea germinării plantei ar influența acumularea PR în corpurile proteice ale celulelor cotiledonelor seminței în diferite structuri geometrice [32] și că această proprietate a fazeolinei de a asocia/disocia reversibil în dependență de valorile pH-ului poate avea importanță la controlul proteolizei pe parcursul germinării semințelor [33], totuși până în prezent nu a fost stabilită funcția biologică a acestei proprietăți a fazeolinei.



**Fig.2** Schema asocierii/disocierii moleculei de fazeolină la diferite valori ale pH-ului (după [33]).

Conform datelor electroforezei native (Fig.1B), formele moleculare care intră în componența fazeolinei-*in vivo* își rețin structura cuaternară. Mai mult decât atât, electroforeza 2-D a zonei predominante arată că fragmentele majore detectate de SDS-electroforeza (Fig.1B) fac parte din molecula fazeolinei-*in vivo* de 137 kDa (Fig.1C) și, deci, nu destabilizează structura ei cuaternară. Evident, apare întrebarea dacă această modificare *in vivo* a fazeolinei are vreo consecință pentru capacitatea ei de a asocia în structuri supramoleculare la pH-uri acide (Fig.3).

Profilul cromatografic al fazeolinei și al fazeolinei-*in vivo* la gel-filtrarea la pH 4,6 este asemănător (Fig.3). Ele ambele eluează într-un singur pic – cel al tetramerului, și picurile lor coincid (Fig.3). La fazeolina nativă se observă de asemenea unele urme de subunități individuale, care sunt în cantități foarte mici, ceea ce se aseamănă cu rezultatele prezentate în literatură [35]. La pH 8,0 se observă disocierea tetramerului fazeolinei în protomeri, ce rezultă în eluarea a două picuri (Fig.3), aceasta fiind în conformitate cu rezultatele publicate [35]. Fazeolina-*in vivo* de asemenea disociază la pH 8,0 (Fig.3), însă, spre deosebire de fazeolina nativă, aici predomină picul tetramerului (Fig.3). În afară de aceasta, picul protomerului este deplasat cu o fracție față de picul corespunzător al fazeolinei native (Fig.3), ceea ce arată că formele moleculare protomerică modificate ale fazeolinei-*in vivo* au mase moleculare mai mici decât protomerul fazeolinei native. Acest fapt indică, probabil, că formele moleculare ale fazeolinei-*in vivo*, care sunt mai profund modificate, se dovedesc a fi mai sensibile la disocierea tetramerului în trimeri. Deci, rezultatele primite la gel-filtrare au arătat că fazeolina-*in vivo* la pH-urile 4,6 și 8,0 are o structură la fel de stabilă ca și cea a fazeolinei native, care se comportă la fel, având aceeași proprietate de a asocia în structuri supramoleculare (Fig.3). Această stabilitate este, probabil, necesară pentru funcțiile pe care le are fazeolina *in vivo*.

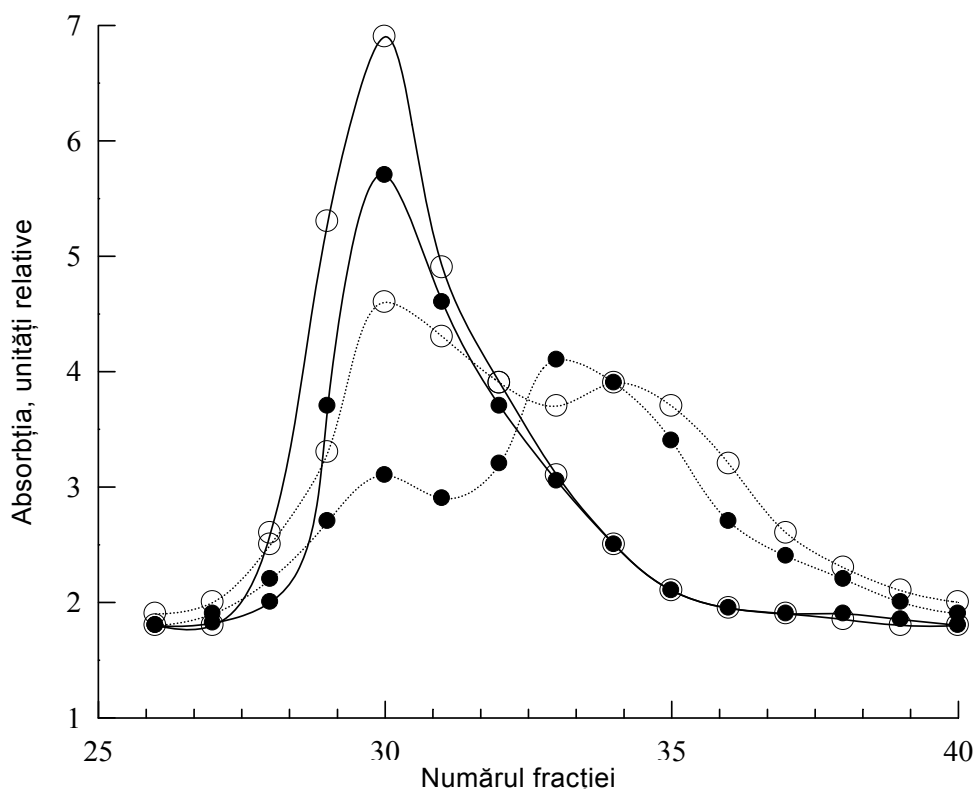


Fig.3. Gel-filtrarea pe Sephacryl S200 a fazeolinei (●) și a fazeolinei-in-vivo (○) la pH-ul 4,6 (—) și 8,0 (····).

Rolul pe care îl au PR *in vivo* necesită ca ele să poseze două proprietăți antagoniste la diferite etape ontologice ale seminței (la maturizare și la germinare). Deși, la inițierea germinării, ele trebuie să devină susceptibile la proteoliza completă, în timpul acumulării lor la maturizarea semințelor ele trebuie să fie protejate de proteoliza nelimitată. Deci, constrângerile impuse PR de acumularea lor la maturizarea semințelor în vacuolele de rezervă ale celulelor cotiledoanelor și mobilizarea lor la germinarea semințelor au impus restricții asupra structurii lor, esențiale în interacția lor cu proteinazele din vacuolă, care participă la aceste două procese [36]. Deși puțin se știe despre felul de aranjare a PR în semință, această organizare se crede a fi importantă nu doar pentru utilizarea eficientă a spațiului, dar și pentru facilitarea mobilizării PR la germinarea semințelor [6]. Depozitarea PR în corpurile proteice este foarte densă, în unele cazuri rezultând chiar în cristalizarea lor *in situ* [37]. A fost sugerată ideea precum că transformarea globulinelor într-o stare cristalină pe parcursul acumulării lor în corpurile proteice la maturizarea semințelor le fac inaccesibile atacului proteolitic al proteinazelor papainice [38]. Este cunoscut faptul că asocierea leguminei într-o structură hexamerică în timpul acumulării ei în semințe protejează subunitățile acesteia de atacul legumainei [7]. De asemenea, este recunoscut faptul că destabilizarea structurii proteinei [39], inclusiv a PR, în general [16], și a fazeolinei, în particular [16], le fac susceptibile la proteoliza completă. Însă, influența asocierii trimerilor fazeolinei în dodecamer asupra proteolizei ei încă nu a fost studiată. Descoperirea faptului că fazeolina-in-vivo își reține proprietatea de a asocia în dodecameri atestă că această proprietate a fazeolinei are un rol fiziologic semnificativ. Aceasta poate explica rezultatele observate că fazeolina este rezistentă la acțiunea individuală a trei proteinaze cisteinice endogene majore: CPPh [18,21], legumaina [20,21] și proteinaza A [28] și că hidroliza ei completă este atinsă numai la acțiunea consecutivă a legumainei și CPPh [21]. Metabolismul PR la maturizarea și germinarea seminței este strâns legat de vacuolele celulelor cotiledoanelor care au un pH slab acid [34,40,41]. Deoarece la acest pH este evidentă predominarea formei tetramerică a fazeolinei (Fig.3 și [33]), fazeolina *in vivo* va fi prezentă predominant în forma dodecamerică și, în consecință, va fi disponibilă numai atacului unei proteinaze specifice – așa-numita „enzimă-declanșatoare” (în acest caz – legumaina), pentru a începe mobilizarea fazeolinei în formă dodecamerică. A fost arătat că legăturile peptidice scindate de către legumaină în fazeolină – Asn103-Pro104, Asn220-Thr221 și Asn235-Ser236 [19] – sunt localizate pe aceeași parte a discului structurii cuaternare a fazeolinei format de asocierea subunităților ei în trimer [22]. Ceea ce sugerează că aranjamentul observat al situsurilor scindate de către legumaină în structura fazeolinei este determinat de accesibilitatea acestor locuri

care, la rândul lor, rezultă din asocierea trimerilor fazeolinei în tetrameri. A fost arătat că situsurile clivate în fazeolină-*in vivo* sunt aceleași ca și în fazeolina-LLP [19], deci ele au aceeași localizare pe suprafața trimerului fazeolinei. CPPh clivează fazeolina la situsul Ser216-Lys217 [18] localizat în sectorul dezordonat al linkerului dintre domene, care este localizat pe aceeași față ca și situsurile scindate de către legumaină. Luând în considerare faptul că hidroliza fazeolinei de către CPPh și legumaină a fost analizată la pH 4,6 și 5,6 [18-22], un pH la care fazeolina este în formă tetramerică [33], este lesne de observat că aceste proteinaze au acces numai la o parte a moleculei de fazeolină. Acest lucru este valid și pentru fazeolina-*in vivo* (Fig.3). Probabil, aceste situsuri scindate sunt localizate pe partea tetramerului care este orientată către solvent (adică, fața trimerului fazeolinei care formează fațetele tetraedrului regular format la asocierea protomerilor fazeolinei în dodecamer).

Proprietatea PR de a se autoasocia în structuri supramoleculare formând agregate cu  $M_r$  înaltă a fost atestată și în alte condiții. Solubilitatea *in vitro* a globulinelor purificate din semințele de lupin (*Lupinus albus* L.), mazăre (*Pisum sativum* L.) și soia (*Glycine max* (L.) Merr.) descrește odată cu ridicarea concentrației cationilor de calciu și/sau magneziu [42], ceea ce rezultă în formarea agregatelor cu  $M_r$  înaltă insolubile dintre aceleași globuline sau globuline diferite. Aceste structuri macromoleculare disociază în condiții de forță ionică ridicată, sugerând implicarea interacțiunilor electrostatice în procesul de agregare [42]. Nivelul asocierii este puternic influențat atât de cantitatea ionilor  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  [42], cât și de forța ionică a mediului [42], indicând că ele se află în echilibru. Se presupune că această proprietate a globulinelor din lupin asigură depozitarea eficientă a PR în vacuole *in vivo* [43]. Anterior am arătat [44] că ionii de  $Ca^{2+}$  inhibă hidroliza fitohemaglutininei, lectina din semințele de fasole. Rămâne de văzut dacă și această asociere  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -dependentă a PR în structuri supramoleculare exercită vreo influență asupra proteolizei lor.

#### Referințe:

- Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people // *Science*, 2010, vol.327, p.812-818.
- 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.
- Brown L.R. The Changing World Food Prospect: The nine Tenth and Beyond. - World watch Paper 85, October, Washington D.C., 1998.
- Graham P.H. and Vance C.P. Legumes: Importance and constraints to greater use // *Plant Physiol.*, 2003, vol.131, p.872-877.
- Baudoin J.P., Maquet A. Improvement of protein and amino acid contents in seeds of food legumes. A case study in *Phaseolus* // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 1999, vol.3, p.220-224.
- Shewry P.R., Napier J.A. and Tatham A.S. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis // *Plant Cell.*, 1995, vol.7, p.945-956.
- Müntz K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds // *J. Exp. Bot.*, 1996, vol.47, p.605-622.
- Romero J., Sun S.M., McLeester R.C., Bliss F.A. and Hall T.C. Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris* L // *Plant Physiol.*, 1975, vol.56, p.776-779.
- Sathe S.K. Dry bean protein functionality // *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, vol.22, p.175-223.
- 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.
- Kimura A., Fukuda T., Zhang M., Motoyama S., Maruyama N. and Utsumi S. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and french bean with those of soybean - french bean 7S globulin exhibits excellent properties // *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol.56, p.10273-10279.
- 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.
- Liener I.E., Thamson 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.
- 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.
- 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.
- Nielsen S.S., Deshpande S.S., Hermodson M.A., Scott M.P. Comparative digestibility of legume storage proteins // *J. Agric. Food Chem.*, 1988, vol.36, p.896-902.
- Jivotovskaya A., Senyuk V., Rotari V., Horstmann C. and Vaintraub I. Proteolysis of phaseolin in relation to its structure // *J. Agric. Food Chem.*, 1996, vol.44, p.3768-3772.

18. 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.
19. 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.
20. Rotari V.I., Dando P.M. and Barrett A.J. Legumain forms from plant and animal differ in specificity // *Biol. Chem.*, 2001, vol.382, p.953-959.
21. 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.
22. Rotari V.I., Morari D., Stepurina T. Characterization of phaseolin modified by legumain // *Studia Universitatis, Seria „Științe ale naturii”*, 2007, vol.7, p.133-138.
23. Schlesier B., Manteuffel R., Armin R., Jüttner G. A simple method for preparation of phaseolin // *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 1984, vol.179, p.665-678.
24. Stepurina T., Morari D., Vaintraub I. Schimbarea activității proteinazelor și degradarea fazeolinei în semințele încolțite de fasole // *Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”*, 2006, p.231-233.
25. Hall T.C., McLeester R.C. & Bliss F.A. Equal expression of the maternal and paternal alleles for polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* // *Plant Physiol.*, 1977, vol.59, p.1122-1124.
26. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685.
27. Senyuk V., Rotari V., Becker C., Zakharov A., Horstmann C., Müntz K., Vaintraub I. Cysteine proteinases from kidney bean seedlings // *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova*, 1998, p.143-147.
28. Rotari V.I. Purificarea și caracterizarea parțială a proteinazei A din semințele germinate de fasole // *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2007, vol.1(7), p.133-138.
29. 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.
30. Lawrence M.C., Suzuki E., Varghese J.N., Davis P.C., Van Donkelaar A., Tulloch P.A., Colman P.M. The three-dimensional structure of the seed storage proteins phaseolin at 3 Å resolution // *EMBO J.*, 1990, vol.9, p.9-15.
31. Dunwell J.M., Culham A., Carter C.E., Sosa-Aguirre C.R. and Goodenough P.W. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily // *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol.26, p.704-746.
32. Tulloch P.A., Blagrove R.J. Electron microscopy of seed-storage globulins // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, vol.241, p.521-532.
33. Sun S.M., Mcleester R.C., Bliss F.A. and Hall T.C. Reversible and irreversible dissociation of globulins from *Phaseolus vulgaris* seed // *J. Biol. Chem.*, 1974, vol.249, no.7, p.2118-2121.
34. Müntz K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles // *J. Exp. Bot.*, 2007, vol.58, p.2391-2407.
35. 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.
36. Shutov A.D., Bäumlein H., Blattner F.R. and Müntz K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution // *J. Exp. Bot.*, 2003, vol.54, p.1645-1654.
37. Colman P., Suyuki E., and Van Donkelaar A. The Structure of Cucurbitin: Subunit symmetry and organization in situ // *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol.103, p.585-588.
38. Weber E., Neumann D. Protein bodies, storage organelles in plant seeds // *Biochemie und Physiologie der Pflanzen.*, 1980, vol.175, p.279-306.
39. Rupley J. A. Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. – În: *Methods in Enzymology*; Hirs, C. H. W., Ed.; Academic Press: New York, 1967, vol.11, p.905-917.
40. Shutov A.D. and Vaintraub I.A. Degradation of storage proteins in germinated seeds // *Phytochemistry*, 1987, vol.26, p.1557-1566.
41. Okamoto T., Yuki A., Mitsuhashi N. and Mimamikawa T. Asparaginyl endopeptidase (VmPE-1) and autocatalytic processing synergistically activate the vacuolar cysteine proteinase (SH-EP) // *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol.264, p.223-232.
42. Ferreira R.B., Franco E., Teixeira A.R. Calcium- and magnesium-dependent aggregation of legume seed storage proteins // *J. Agric. Food Chem.*, 1999, vol.47, p.3009-3015.
43. Ferreira R.B., Freitas R.L., Teixeira A.R. Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated // *FEBS Letters*, 2003, vol.534, p.106-110.
44. Morari D., Stepurina T., and Rotari V.I. Calcium ions make phytohemagglutinin resistant to trypsin proteolysis // *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol.56, p.3764-3771.