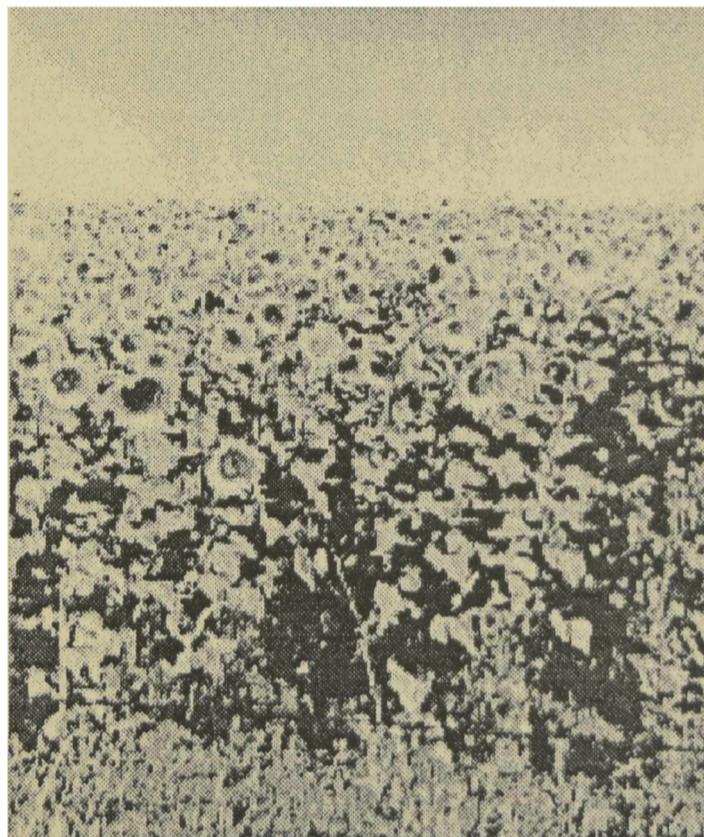




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**“Caracterización del sistema lipolítico
responsable de la movilización de los
triacilglicéridos de reserva durante la
germinación de semillas de girasol
(*Helianthus annuus* L., Compositae)”**



MARIA CECILIA ARRIBERE

TESIS - 1993

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas se realizó en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de los Profesores Doctores Néstor O. Caffini y Nora S. Priolo.

*“porque el trabajo y el esfuerzo no deben considerarse
como el medio para conseguir un objetivo,
sino que constituyen el premio en sí, y su alegría.”*

Bruce Marshall (“A cada uno un denario”)

A mis padres

Son muchas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tarea y a quienes debo todo mi reconocimiento.

Agradezco

muy especialmente al Dr. Néstor O. Caffini, por la constante dedicación, la paciencia y el afecto que me brindó. Sus enseñanzas durante estos años de investigación y discusiones me permitieron llevar a cabo este trabajo y me servirán de experiencia y guía para obrar en lo sucesivo

a la Dra. Nora S. Priolo, maestra y amiga, por la confianza, comprensión y cariño que me demostró durante muchas horas de trabajo

a la Dra. Claudia L. Natalucci de quien recibí apoyo y oportunos consejos y a las Lics. Laura López y Adriana Brullo, compañeras de Laboratorio por todo el aliento y amistad que me brindaron

al Ingeniero Agrónomo José María Bruniard de la Asociación de Cooperativas Argentinas C.L., quien desinteresadamente me envió las semillas de girasol tantas veces como se las requerí

al Ingeniero Agrónomo Roberto Barreyro de la Cátedra de Cultivos Industriales de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, por el asesoramiento brindado al iniciar las técnicas de germinación

a la Dra. Lidia Herrera por su generosa colaboración y asesoramiento en el uso de las técnicas de GLC y HPLC

a las Lics. Claudia Marano y Gabriela Sala por su natural disposición para resolver los problemas que se presentaron en el uso del cromatógrafo durante la realización de los ensayos en HPLC

al Sr. Rolando Natalucci, por el armado de los agitadores y por el diseño y construcción del circuito de mando y control del equipo para la realización de reacciones enzimáticas en sistemas de dos fases

a la Srta. Liliana Aleksí por el diseño de tapa y por su esmero y dedicación en la impresión del trabajo finalmente a mi familia que con su amor alentó este proyecto

Asimismo, vaya mi reconocimiento

a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme brindado el lugar para que desarrollara el presente trabajo, así como a cada uno de los Profesores que contribuyeron a mi formación profesional

al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, por la Beca de Estudio que me otorgara para iniciarme en la investigación, así como por el apoyo económico (Estímulo Científico) adjudicado al LIPROVE para la ejecución de esta tarea

a la Universidad Nacional de La Plata, por las Becas de iniciación y de perfeccionamiento otorgadas

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por la Beca de Estudio que recibo actualmente

al CONICET, por el Subsidio PID-BID 1119 que permitió cubrir gastos parciales de funcionamiento

al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) y al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por facilitarme parte del equipamiento utilizado durante la realización de este trabajo

al Area Producción y Ensayo de Medicamentos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme el empleo del cromatógrafo líquido de alta resolución.

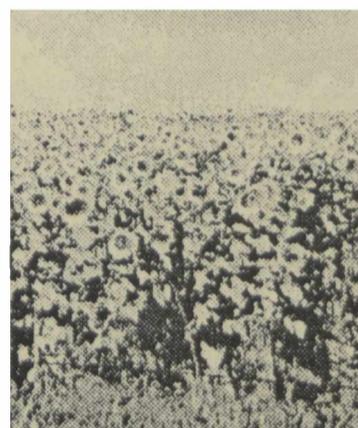
INDICE

	Página
1. Introducción	
1.1. Movilización de reservas durante la germinación	1
1.2. Localización y movilización de las reservas lipídicas.	1
1.3. Enzimas lipolíticas	5
1.3.1. Lipasas y estererasas	5
1.3.2. Cinética de la lipólisis.	6
1.4. Lipasas de semillas	10
1.4.1. Lipasas asociadas a los cuerpos lipídicos	11
1.4.1.1. Lipasas de ricino	11
1.4.1.2. Lipasas de Crucíferas	15
1.4.1.3. Lipasa de maíz.	16
1.4.1.4. Lipasa de <i>Pinus edulis</i>	18
1.4.2. Lipasas asociadas a los glioxisomas	19
1.4.2.1. Lipasa de ricino.	19
1.4.2.2. Lipasa de maní.	20
1.4.2.3. Lipasa de soja.	21
1.4.3. Lipasas presentes en la fracción microsomal.	22
1.4.3.1. Lipasas de Crucíferas	22
1.4.4. Lipasas sin ubicación subcelular conocida.	26
1.4.4.1. Lipasas de granos de cereales	26
1.4.4.1.1. Arroz	27
1.4.4.1.2. Trigo	28
1.4.4.1.3. Avena	29
1.4.4.1.4. Cebada.	30
1.4.4.2. Lipasas de Compuestas	32
1.4.4.2.1. Cártamo	32
1.4.4.2.2. <i>Vernonia anthelmintica</i>	33
1.4.4.3. Lipasas de Cucurbitáceas.	34
1.4.4.3.1. <i>Cucumis melo</i>	34
1.4.4.3.2. <i>Cucumeropsis edulis</i>	34
1.4.4.4. Lipasas de Leguminosas.	35
1.4.4.4.1. Maní.	35
1.4.4.4.2. <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
1.4.4.4.3. <i>Lupinus albus</i>	36
1.4.4.5. Lipasas de Malváceas.	36
1.4.4.5.1. <i>Hibiscus cannabinus</i>	36
1.4.4.6. Lipasas de Juglandaceae	37
1.4.4.6.1. <i>Carya illinoensis</i>	37

1.4.4.7.	Lipasas de Gimnospermas	37
1.4.4.7.1.	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	37
1.5.	Importancia del estudio de lipasas.	38
1.6.	El cultivo de girasol en la Argentina	41
2.	Objetivos	43
3. Materiales y Métodos		
3.1.	Material Vegetal.	45
3.2.	Reactivos	45
3.3.	Pretratamiento y germinación de las semillas	46
3.4.	Determinación del contenido de lípidos totales.	46
3.5.	Determinación de glúcidos solubles.	48
3.6.	Análisis de la composición de triacil- glicéridos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	49
3.7.	Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (GLC)	50
3.8.	Obtención de extractos de cotiledones	52
3.9.	Fraccionamiento de los extractos de cotiledones por centrifugación	52
3.10.	Determinación de la actividad lipolítica.	53
3.10.1.	Elección del medio de reacción	53
3.10.2.	Equipo utilizado	54
3.10.3.	Técnica empleada	59
3.11.	Variación de la actividad lipolítica con el pH.	60
3.12.	Variación de la actividad lipolítica con la temperatura	61
3.13.	Análisis por HPLC de triacilglicéridos residuales en ensayos autolíticos.	61
3.14.	Efecto de iones, inhibidores enzimáticos y detergentes sobre el sistema lipolítico.	61

4. Resultados

4.1.	Optimización del esquema de germinación para la detección temprana de la actividad lipolítica.	63
4.2.	Correlación entre la variación del contenido de lípidos totales y de glúcidos solubles durante la germinación	63
4.3.	Modificación de la composición relativa de triacilglicéridos durante la lipólisis <i>in vivo</i> . .	66
4.4.	Cambios en la composición de ácidos grasos durante la lipólisis <i>in vivo</i>	68
4.5.	Detección preliminar de la actividad lipolítica durante la germinación a pH 5,0, 7,0 y 9,0 . .	71
4.6.	Variación de la actividad lipolítica con el pH en plántulas de 2 días de germinación	73
4.7	Variación de la actividad lipolítica durante la germinación a los valores de pH óptimo. . .	73
4.8.	Determinación de la actividad lipolítica en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación de los extractos de cotiledones	76
4.9.	Actividad lipolítica en relación con la temperatura	78
4.10.	Cambios en la composición de triacilglicéridos durante la lipólisis <i>in vitro</i> a los valores de pH óptimos	79
4.11.	Efecto de iones, inhibidores enzimáticos y detergentes sobre el sistema lipolítico. . . .	80
5.	Discusión.	82
6.	Conclusiones	90
7.	Referencias bibliográficas	93



1. Introducción

1.1. MOVILIZACION DE RESERVAS DURANTE LA GERMINACION

La germinación representa la culminación del período de dormancia de la semilla y, por ende, la reanudación de la actividad en los tejidos embrionarios. Por lo general, el primer signo visible es la aparición de la radícula, pero en realidad la germinación comienza cuando la semilla absorbe agua. En ese momento se inicia la digestión de las sustancias de reserva, la respiración se hace más intensa -aportando la energía necesaria para el crecimiento- y se producen conjuntamente importantes cambios en las organelas subcelulares.

La transformación de las sustancias de reserva es catalizada por enzimas que están presentes en las semillas o que se sintetizan *de novo* durante la germinación. Así, durante la proteólisis intervienen endo- y exopeptidasas, la amilolisis es mediada inicialmente por α - y β -amilasas o por fosforilasas, en la lipólisis intervienen lipasas y enzimas del ciclo del glioxilato y la degradación del fosfato es catalizada por la fitasa (Vijayaraghavan y Seth, 1987).

1.2. LOCALIZACION Y MOVILIZACION DE LAS RESERVAS LIPIDICAS

Las semillas almacenan aceites en pequeñas organelas subcelulares llamadas *cuerpos lipídicos*, *oleosomas* o *esferosomas*, las que proveen una importante área superficial para la rápida movilización de dichas reservas durante la germinación. Cada cuerpo lipídico posee una matriz hidrofóbica de triacilglicéridos rodeados por una monocapa de fosfolípidos con proteínas embebidas. Estas proteínas -llamadas oleosinas- son abundantes y cubren esencialmente toda la superficie de los

cuerpos lipídicos, otorgándole naturaleza hidrofílica a la misma. Son proteínas alcalinas de bajo peso molecular (15-26 kDa) y existen en isoformas.

Las oleosinas de diversas especies tienen los mismos dominios estructurales: un dominio anfipático N-terminal, un dominio central hidrofóbico con estructura de hoja β -plegada antiparalela y un segundo dominio anfipático en el extremo C-terminal, con conformación α -helicoidal. La diferente naturaleza de estos dominios les permite a las oleosinas asociarse en forma estable tanto con los fosfolípidos como con los triacilglicéridos sobre la superficie de la organela. Junto con los fosfolípidos, las oleosinas estabilizan los cuerpos lipídicos y los mantienen como pequeñas entidades, por efecto de carga superficial y por impedimento estérico. Se especula, por otra parte, que pueden proveer una señal de reconocimiento para la unión de las lipasas o actuar como activadores de las mismas durante el crecimiento de la plántula (Huang, 1992).

Un modelo de formación y degradación de cuerpos lipídicos es el que propone Huang (1992) al estudiar la maduración y germinación de embriones de maíz (fig.1), según el cual los tres componentes de los cuerpos lipídicos se originan en el retículo endoplásmico rugoso. Los triacilglicéridos quedan almacenados entre las dos capas de fosfolípidos de la membrana del mismo, formando una protuberancia, hacia la que también difunden los fosfolípidos. Simultáneamente, las oleosinas son sintetizadas en los polirribosomas asociados y migran hacia la matriz de triacilglicéridos, presumiblemente guiadas por el dominio central hidrofóbico. Finalizada su formación, el cuerpo

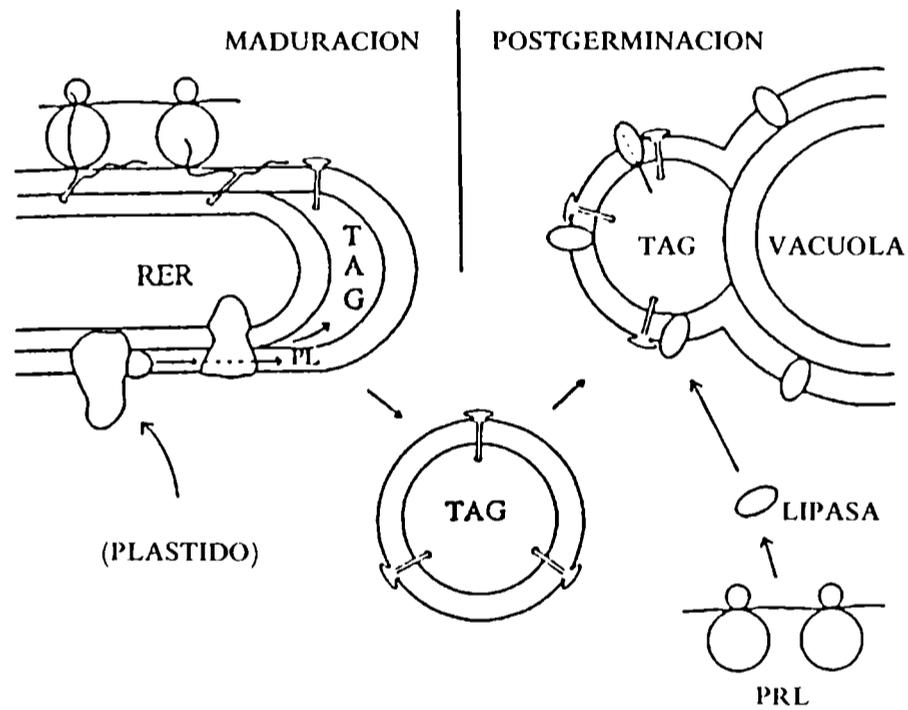


Fig. 1. Modelo de síntesis y degradación de un cuerpo lipídico de embrión de maíz durante la maduración y germinación de la semilla. RER: retículo endoplásmico rugoso; AG: ácidos grasos; TAG: triacilglicéridos; PRL: polirribosomas libres

lipídico maduro es liberado al citosol. La degradación de los cuerpos lipídicos es el resultado de la acción de lipasas. Durante el crecimiento de la plántula, la lipasa -que es sintetizada *de novo* en polirribosomas libres- se une a los cuerpos lipídicos. No se conoce cómo la lipasa reconoce a los cuerpos lipídicos, siendo posiblemente una oleosina el sitio de unión de la misma. Durante o después de la lipólisis las membranas de los cuerpos lipídicos se fusionan con las membranas de las vacuolas. Mientras los fosfolípidos y la lipasa presumiblemente permanecen asociados a la membrana vacuolar, las oleosinas son degradadas.

Durante la germinación, la utilización de las reservas lipídicas se inicia con la hidrólisis gradual de los triacilglicéridos a ácidos grasos y glicerol. Esta primera reacción es catalizada por *lipasas* (EC 3.1.1.3), cuya actividad ha sido demostrada en los tejidos de distintas especies vegetales. A través de la β -oxidación y del ciclo del glioxilato los ácidos grasos liberados son metabolizados a succinato, el que luego es convertido a sacarosa y otros metabolitos (Huang, 1984).

Las enzimas de la β -oxidación y del ciclo del glioxilato se encuentran en los glioxisomas y están relativamente bien estudiadas, pero es poco lo que se conoce acerca de las lipasas y de la localización subcelular de las mismas. Dado que los cuerpos lipídicos y los glioxisomas están habitualmente en estrecho contacto -lo que facilitaría el transporte de los acilglicéridos o de los ácidos grasos- los cuerpos lipídicos constituirían el sitio ideal para la localización de las

lipasas (Lin y Huang, 1983). Sin embargo existe escasa información acerca de la presencia de lipasas en cuerpos lipídicos de semillas: ricino (Ory *et al.*, 1968), nabo (Lin y Huang, 1983; Villalobos *et al.*, 1987), mostaza (Lin y Huang, 1983), maíz (Lin *et al.*, 1983; Huang, 1992) y pino (Hammer y Murphy, 1993) son a la fecha los únicos casos informados. Por otra parte, algunas semillas productoras de aceites utilizados en la industria alimentaria tales como maní (Huang y Moreau, 1978) y soja (Lin *et al.*, 1982) carecen de actividad lipásica comprobable en los cuerpos lipídicos, por lo que se ha recomendado examinar otros compartimientos subcelulares en busca de detectar actividad lipásica (Huang, 1984).

1.3. ENZIMAS LIPOLITICAS

1.3.1. Lipasas y esterases

Las enzimas lipolíticas han sido definidas como "hidrolasas de ésteres de ácidos grasos de cadena larga" o como "cualquier esterasa capaz de hidrolizar ésteres del ácido oleico". Ambas definiciones han resultado de utilidad, pero sólo indirectamente aclaran la diferencia fundamental entre *esterasas* y *lipasas*: en tanto que las primeras pueden actuar en sistemas homogéneos, las lipasas necesitan la existencia de una interfase lípido-agua para que el proceso catalizado por ellas pueda tener lugar (Brockman, 1984). Así, por ejemplo, la tripropionina en solución acuosa es pobremente hidrolizada por la lipasa pancreática, pero si se añaden perlas de vidrio recubiertas por una película hidrofóbica la velocidad de hidrólisis se incrementa notoriamente (Brockman *et al.*, 1973).

Por otra parte, este estímulo de la lipólisis puede conseguirse aún sin agregado de agentes exógenos, ya que el mero aumento de la concentración de sustrato hasta un valor que supere la concentración micelar crítica permite obtener similares resultados (Entressangles y Desnuelle, 1968).

1.3.2. Cinética de la lipólisis

Una de las consecuencias de la naturaleza interfásica de la lipólisis es que la velocidad de una reacción lipolítica está más directamente relacionada con la cantidad de enzima y sustrato en la superficie que con su concentración total en el volumen de reacción. En la figura 2 se presenta un esquema de reacción que muestra la partición de los reactantes y de los productos hacia y desde la superficie. Una distinción primaria entre este mecanismo y la simple cinética de Michaelis-Menten es la independencia que existe entre la adsorción de la enzima en la interfase y la hidrólisis catalizada por la enzima en el plano interfásico.

Existen varias ventajas de tener un paso de adsorción distinto al catalítico. En una reacción enzimática en solución, la velocidad máxima de reacción está limitada por la velocidad con que colisionan la enzima y el sustrato en la orientación apropiada. En razón de que el sustrato es mucho más pequeño que la enzima, la difusión de éste es el factor limitante.

En el caso de una enzima lipolítica hidrosoluble, el sustrato forma parte generalmente de una emulsión, micela o membrana. Estas estructuras pueden alcanzar magnitudes mayores que la enzima y de esta forma la velocidad máxima obtenible por

el mecanismo propuesto por Michaelis-Menten queda, por el contrario, condicionada a la velocidad de difusión de la enzima hacia el sustrato, un proceso considerablemente menor que la difusión de un sustrato monomérico en solución. Pero, sin embargo, si el catalizador está fuertemente adsorbido a la interfase o está unido a la membrana, la máxima velocidad potencial de reacción excede a la que puede alcanzarse en un sistema tridimensional, porque la difusión del sustrato queda limitada a dos dimensiones. Aún cuando la reacción no dependiera de la difusión, la unión enzima-sustrato en el plano de la interfase está más acrecentada que en solución, hecho que obedece a que los reactantes están altamente orientados en relación al plano interfásico.

Así, las adsorciones aparentemente obligatorias de las enzimas lipolíticas y de los sustratos en la interfase lípido-agua pueden reflejar una adaptación para disponer de la enzima y del sustrato en altas concentraciones y en las orientaciones apropiadas para una catálisis más eficiente, así como las clásicas interacciones enzima-sustrato sirven al mismo propósito para la catálisis en solución (Brockman, 1984).

Han sido propuestas numerosas modificaciones del esquema básico indicado en la figura 2. Entre ellas debe consignarse la posibilidad de que las enzimas lipolíticas se desnaturalicen rápidamente en la interfase (fig. 3a). Esto ocurre en condiciones de baja densidad de grupos polares en la interfase, hecho que puede ser prevenido o minimizado si están presentes detergentes no desnaturalizantes como las sales biliares (Momsen y Brockman, 1976). Estas observaciones son coincidentes

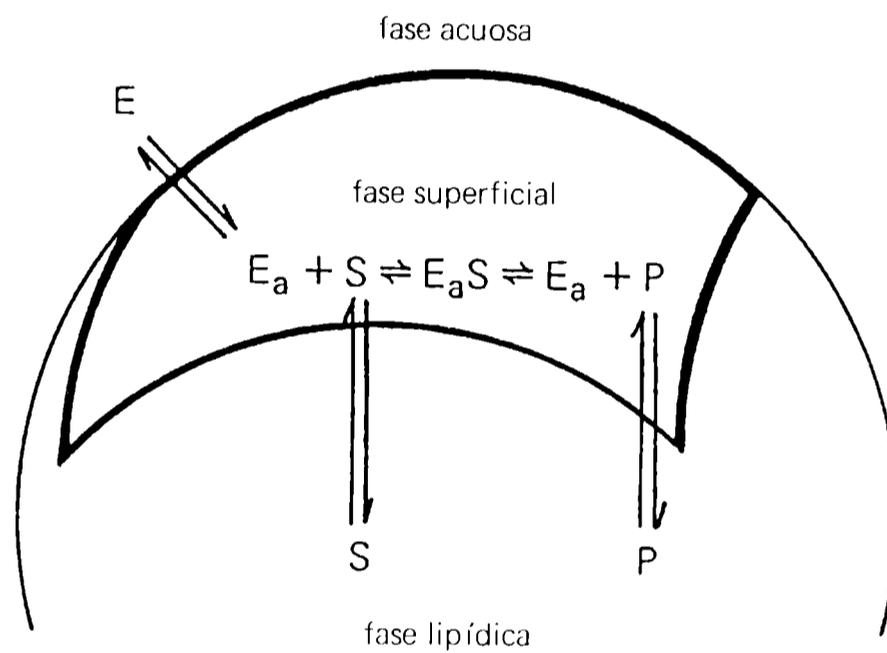


Fig. 2. Representación esquemática de una reacción lipolítica.
E: enzima en solución, **E_a:** enzima adsorbida, **P:** productos, **S:** sustrato, (adaptado de Brockman, 1984)

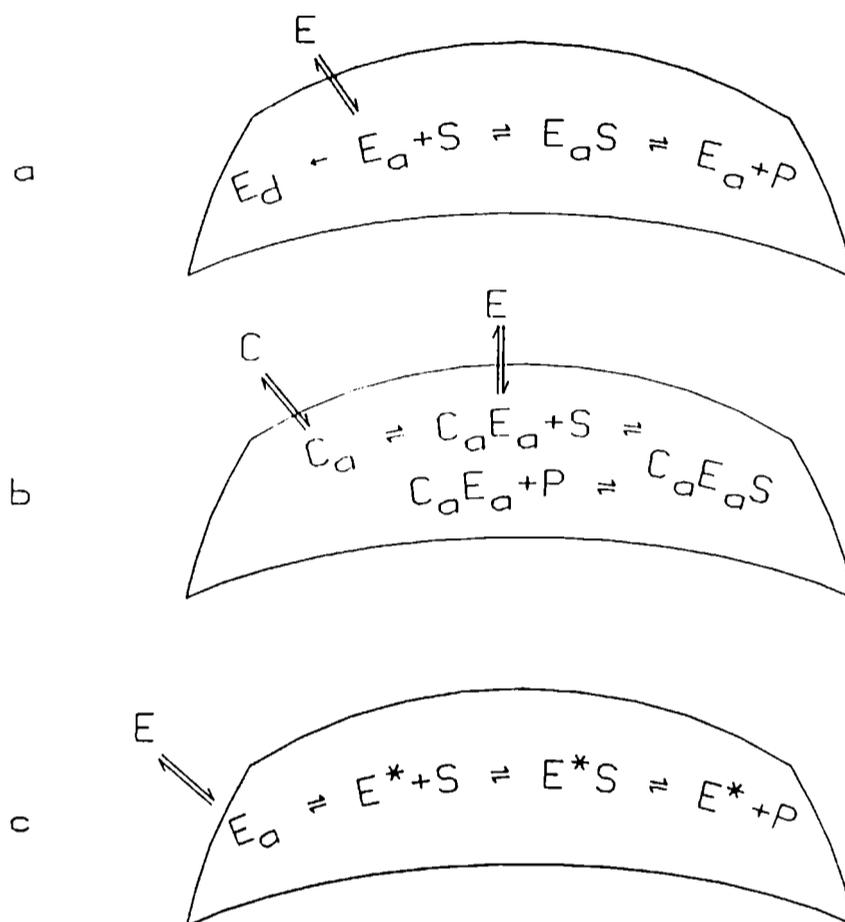


Fig. 3. Variación del esquema básico de la lipólisis. **E:** enzima en solución, **E_a:** enzima adsorbida, **E_d:** enzima desnaturalizada, **E*:** enzima activada, **C:** cofactor proteico, **C_a:** cofactor proteico adsorbido, **P:** productos, **S:** sustrato (adaptado de Brockman, 1984)

con los estudios sobre desnaturalización superficial de otras proteínas, en las que se ha comprobado que la velocidad de desnaturalización es una función directa de la cantidad de "espacio libre" disponible.

En el modelo de la figura 2, la adsorción enzimática está basada en la interacción lípido-proteína. Sin embargo la adsorción de ciertas lipasas a las interfases sólo tiene lugar en presencia de cofactores proteicos o ligandos solubles (fig. 3b) y en caso de ocurrir resulta muy acrecentada luego de la interacción con ellos.

Una tercera modificación del modelo es la activación de la enzima en la interfase (fig. 3c). La simple participación de una lipasa y de su sustrato en una interfase lípido-agua puede facilitar o estimular la lipólisis tan sólo por poder contar con ambas en alta concentración, pero también se ha sugerido (Verger, 1980) que la adsorción puede cambiar la actividad catalítica intrínseca de una proteína, ya sea como consecuencia inmediata de la adsorción o a raíz de un cambio conformacional lento post-adsortivo.

1.4. LIPASAS DE SEMILLAS

Salvo algunas excepciones, la actividad lipásica no se detecta en semillas en dormancia, incrementándose rápidamente durante la germinación.

Las lipasas de semillas hasta ahora estudiadas difieren ampliamente en características tales como pH óptimo, peso molecular, especificidad de sustrato y localización subcelular. Como ya se ha mencionado, las lipasas pueden estar asociadas a

la membrana de los cuerpos lipídicos o encontrarse en otros compartimientos subcelulares. Dado que la ubicación subcelular ha recibido especial atención, este parece ser un criterio adecuado para la clasificación de las distintas lipasas de semillas (Huang, 1984).

1.4.1. Lipasas asociadas a los cuerpos lipídicos

1.4.1.1. Lipasas de ricino

El conocimiento que hasta hace poco se poseía sobre el sistema lipolítico de semillas de ricino implicaba la existencia de dos enzimas: una "lipasa ácida" que ya está presente en las semillas en reposo, asociada a la membrana de los cuerpos lipídicos, y una "lipasa alcalina" de origen glioxisomal cuya actividad se evidencia al comienzo de la germinación (Chabane-Ben Hamida y Mazliak, 1985). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que en los cuerpos lipídicos existe una segunda lipasa que también manifiesta su actividad a los pocos días de iniciada la germinación, pero que es activa a valores de pH cercanos a la neutralidad (Hills y Beevers, 1987).

La "lipasa ácida" de semillas de ricino es sin duda la más estudiada. Si bien una de las primeras referencias acerca de la presencia de una lipasa en semillas en reposo data de fines del siglo pasado (Green, 1890), más allá de la existencia de otros trabajos preliminares (Taylor, 1908; Haley y Lyman, 1921; Nevgi y Ramakrishnan, 1950), Ory y colaboradores fueron los primeros en caracterizar acabadamente la "lipasa ácida" de ricino (Ory *et al.*, 1960, 1962, 1968 y Ory, 1969).

Los primeros estudios se realizaron sobre sustrato endógeno. Cuando un homogenato de endosperma es fraccionado, mediante centrifugación, en capa grasa superior, sobrenadante y fracción particulada, la "lipasa ácida" se recupera en la capa grasa (Ory, 1960). La enzima está presente en semillas sin germinar, pero su actividad cae bruscamente luego del segundo día de la germinación (Mutto y Beevers, 1974). La lipasa muestra actividad autolítica (capacidad de hidrolizar el sustrato endógeno *in vitro*) a pH ácido, con un máximo a pH 4,0-4,2 y es inactiva a valores de pH superiores a 6,0; es fuertemente inhibida por ión Hg^{2+} y PCMB (ácido p-cloro-mercuribenzoico), efecto que es revertido por el agregado de cisteína, sugiriendo la existencia de al menos un grupo sulfhidrilo en el sitio activo de la lipasa (Ory *et al.*, 1960).

La lipasa puede ser separada de los triacilglicéridos endógenos tratando la capa lipídica con éter etílico y solución saturada de cloruro de sodio. La preparación cruda así obtenida es capaz de emulsionar triacilglicéridos e hidrolizarlos completamente, registrando máxima actividad a pH 4,3 frente a triacilglicéridos de ácidos grasos de 4 a 8 carbonos (Ory *et al.*, 1962).

La "lipasa ácida" se halla asociada a la membrana de los cuerpos lipídicos, esto se comprobó mediante el empleo de técnicas bioquímicas e histoquímicas. Para ello se incubaron preparaciones de esferosomas incluídos en agar en presencia de sales de plomo a pH 4,5: al cabo de unos minutos los ácidos grasos liberados por la acción de la enzima forman jabones de

plomo (detectados por microscopía electrónica), cuya presencia indica el sitio de acción de la lipasa (Ory *et al.*, 1968).

La enzima requiere la presencia de un cofactor lipídico y de un activador proteico para poner de manifiesto su actividad (Ory, 1969). El cofactor lipídico es un tetrámero cíclico del ácido ricinoleico producido como resultado de la esterificación intermolecular de cuatro moléculas de dicho ácido (Ory *et al.*, 1964). Si bien no se conoce la forma en que este cofactor está unido a la apoenzima, la no remoción del mismo durante el tratamiento con éter etílico en el proceso de obtención de la preparación de la lipasa cruda haría presumir la existencia de algún tipo de unión estable (Ory, 1969). Aunque su rol es desconocido, se le han atribuido funciones de emulgente endógeno, ya que para obtener la máxima actividad lipolítica no es necesario el agregado de emulgentes externos (Ory, 1962).

Mediante la utilización de sustratos marcados, Noma y Borgström (1971) demostraron que la "lipasa ácida" puede hidrolizar las tres moléculas de ácidos grasos de un triacilglicérido. El primer paso de la hidrólisis conduce a la formación de 1,2-diacilglicéridos, por lo que puede decirse que en esta etapa la enzima posee especificidad para la unión éster primaria; luego los ácidos grasos de las posiciones 1 y 2 del diacilglicérido resultante son liberados a velocidades similares con producción de 1- y 2-monoacilglicéridos, que son finalmente hidrolizados a igual velocidad y de manera irreversible a ácidos grasos y glicerol. La aparición de 1,3-diacilglicéridos durante la reacción proviene en realidad de la reesterificación del 1-monoacilglicérido con ácidos grasos que

están presentes en el medio de reacción, por lo que la lipasa funcionaría en este caso como una transferasa de grupos acilo hidrofóbicos (Diez y Mata-Segreda, 1985).

No se ha establecido aún cual es el rol fisiológico de la "lipasa ácida", ya que si bien es una enzima altamente activa y está en estrecho contacto con los lípidos de reserva del endosperma, su actividad es despreciable antes de comenzar la degradación de los triacilglicéridos durante la germinación, por lo que su participación en este proceso es altamente improbable. Por otra parte, su actividad a pH neutro es prácticamente nula, por lo que para actuar en el medio citoplasmático requeriría la existencia de un microambiente ácido en la vecindad de la misma (Huang, 1984).

Al ensayar la actividad lipolítica de cuerpos lipídicos de semillas germinadas a pH 7,0, Hills y Beevers (1987) comprueban la aparición de una "lipasa neutra" al tercer día de la germinación, que incrementa su actividad rápidamente hasta el quinto día y es capaz de hidrolizar triacilglicéridos a ácidos grasos y glicerol. Aunque la velocidad de hidrólisis de los triacilglicéridos dentro de los cuerpos lipídicos a pH 7,0 es menos del 10 % que la registrada a pH 4,5, es de todos modos lo suficientemente alta como para explicar la hidrólisis de los cuerpos lipídicos *in vivo*.

La adición de calcio en concentraciones micromolares aumenta de 40 a 60 veces la velocidad de la lipólisis a pH 7,0. No se conoce el mecanismo por el cual el Ca^{2+} estimula la reacción, pero se descarta que dicha estimulación obedezca a que el ion calcio actúe como aceptor de los ácidos grasos

liberados, impidiendo una "inhibición por producto", ya que las concentraciones de calcio requeridas son mínimas frente a la cantidad de ácidos grasos que aparecen en el medio de reacción.

1.4.1.2. Lipasas de Crucíferas

Las semillas pertenecientes a la familia *Cruciferae* se caracterizan por contener ácido erúxico (22:1) en el material lipídico de reserva.

Utilizando diferentes variedades de cultivo de *Brassica napus* L. (cv. *Dwarf Essex* y cv. *Tower*) y *Brassica juncea* (L.) Czern. et Cosson, Lin y Huang (1983) comprobaron que no hay actividad lipásica en semillas en reposo, sino que la misma se incrementa durante la germinación, conjuntamente con el decrecimiento de los lípidos totales. Las lipasas presentes en ambas especies poseen características muy similares en cuanto a la especificidad de sustrato, pH óptimo y localización subcelular.

Trabajando con los extractos crudos de cotiledones o con la membrana de los cuerpos lipídicos a la cual está asociada la lipasa (que se obtiene por extracción con éter etílico de los cuerpos lipídicos separados por centrifugación), estos autores encuentran que la actividad es máxima a pH 5,5-6,5 sobre trierucina y trilinoleína, siendo capaz de hidrolizar di- y monoacilglicéridos a velocidades menores. Asimismo, los cuerpos lipídicos de semillas germinadas sufren máxima autólisis a pH 6,5. La actividad sobre trierucina se incrementa sólo en un 10-20% por el agregado de cloruro de sodio y cloruro de calcio,

pero se reduce notablemente al adicionar EDTA 10 mM, desoxicolato de sodio 2 mM y Tritón X-100 al 1%.

La actividad sobre N-metilindoxilmiristato, que puede ser hidrolizado tanto por lipasas como por monoacilglicerolhidrolasas, es máxima a pH 8,5 y se recupera sólo un 22% de la actividad total en los cuerpos lipídicos.

En semillas de *Brassica campestris* cv. *esculenta* se comunicó la presencia de una "lipasa alcalina" (pH óptimo 8,6) que está asociada principalmente a los esferosomas. La misma se pone en evidencia al tercer día de la germinación, siendo máxima la actividad entre los días 5 y 8, coincidiendo con el período de mayor movilización de los triacilglicéridos de reserva (Villalobos *et al.* 1987).

1.4.1.3. Lipasa de maíz

La lipasa está localizada en los cuerpos lipídicos del escutelo (único cotiledón) del grano de maíz y su actividad se manifiesta durante la germinación, concomitantemente con el decrecimiento de los triacilglicéridos almacenados.

Los cuerpos lipídicos aislados sufren máxima autólisis a pH 7,5, valor que corresponde también al pH óptimo de la enzima sobre trilinoleína y N-metilindoxilmiristato. Separando la membrana de los esferosomas por tratamiento con éter se recupera un 50% de la actividad lipásica. La enzima es activa sobre acilglicéridos de los ácidos linoleico y oleico, que son los constituyentes principales del aceite de maíz. Su actividad no es mayormente afectada por la adición de cloruro de sodio, cloruro de calcio o por pretratamiento con p-cloro-

mercuribenzoato (PCMB), mientras que detergentes como Tritón X-100 y dodecilsulfato de sodio (SDS) la anulan (Lin *et al.*, 1983).

Los cuerpos lipídicos aislados y resuspendidos en un medio adecuado se desengrasan con éter etílico; al centrifugar la suspensión resultante a 100.000 g durante 90 minutos se obtiene un sobrenadante en el que se recupera un 50-80% de la actividad lipásica y un pellet que es descartado. La lipasa solubilizada en el sobrenadante se purifica (272 veces, rendimiento 4%) por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y centrifugación en gradiente de sacarosa. El peso molecular en gradiente de sacarosa es de 270 kDa y por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es de 65 kDa, no modificándose por el agregado de β -mercaptoetanol, lo que sugeriría que la lipasa está formada por cuatro subunidades. La composición aminoacídica muestra que la enzima purificada no posee cisteína y contiene alta proporción de aminoácidos neutros. El índice de hidrofobicidad es del 41%, lo que la coloca en la categoría de proteínas moderadamente hidrofóbicas, comportamiento que era esperado dada su asociación a la membrana de los cuerpos lipídicos. Esto fue también revelado en la partición de la enzima en un medio bifásico conteniendo Tritón X-114, ya que la misma se recupera en la fracción hidrofóbica (Lin y Huang, 1984).

En un trabajo posterior se estudió la biosíntesis de la lipasa de maíz (Wang y Huang, 1987), demostrándose que la aparición de actividad lipásica en el escutelo de maíz durante la germinación se debe a la síntesis *de novo* de la lipasa. La

proteína -sintetizada en polirribosomas libres- migra y se acopla a la membrana de los cuerpos lipídicos, pero no a la de otras organelas. Una vez que los lípidos han sido degradados, la síntesis de la lipasa se detiene; las membranas de los cuerpos lipídicos (con la lipasa todavía activa) se fusionan entre sí o con las membranas de las vacuolas, por lo que al aplicar en esta etapa centrifugación diferencial la actividad lipásica se traslada a otras fracciones subcelulares.

1.4.1.4. Lipasa de *Pinus edulis*

Es escasa la información sobre la presencia de lipasas en Gimnospermas. Un estudio realizado sobre semillas de pino indica que tanto en semillas secas como germinadas los cuerpos lipídicos son incapaces de sufrir autólisis (Huang, 1984).

Muy recientemente (Hammer y Murphy, 1993) se ha comunicado la presencia de una "lipasa ácida" asociada a cuerpos lipídicos en semillas de *Pinus edulis* Engelm, cuya actividad aumenta durante la germinación.

Los autores obtienen una preparación pura de cuerpos lipídicos mediante centrifugación repetida (10.000g, 15 minutos) de un homogenato crudo de megagametofitos de 14 días de germinación, preparado en un medio buffer de pH 7,5 conteniendo sacarosa.

Los cuerpos lipídicos aislados y resuspendidos en un medio buffer de pH 7,5 conteniendo sacarosa 0,2 M se tratan con dietiléter para remover los triacilglicéridos, la fracción acuosa obtenida es centrifugada a 100.000g durante 90 minutos y el sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas se

purifica mediante gel permeación sobre Sephacryl S-300, recuperándose la actividad lipásica en la fracción correspondiente a 260 kDa.

Las proteínas asociadas a las membranas de los cuerpos lipídicos se solubilizan por tratamiento de éstos con Tritón X-100 al 1% y se analizan por SDS-PAGE, observándose la presencia de una proteína de 64 kDa cuya concentración crece en forma paralela con la actividad lipásica durante la germinación. Esta proteína fue electroeluida y con la misma se obtuvieron anticuerpos capaces de precipitar la lipasa nativa, por lo que los autores suponen que esta fracción proteica de 64 kDa corresponde a una subunidad de la "lipasa ácida".

La lipasa muestra máxima actividad a pH 4,5, es inhibida por elevadas concentraciones de detergentes no iónicos y no evidencia una especificidad diferencial frente a los triacilglicéridos ensayados (C₁₀-C₂₂), aunque la mayor actividad se logra cuando la cadena lateral es de 18 carbonos. La lipasa manifiesta mayor especificidad cuando se ensaya frente a sustratos fluorométricos, con preferencia por el laurato de metilumbeliferilo.

1.4.2. Lipasas asociadas a glioxisomas

1.4.2.1. Lipasa de ricino

La fracción particulada obtenida al someter homogenatos de endosperma a centrifugación diferencial manifiesta actividad lipolítica a pH 9,0, siendo máxima entre los días 3 y 5 de iniciada la germinación. Mediante centrifugación de los homogenatos en gradiente de sacarosa pudo determinarse que la

"lipasa alcalina" se recupera en la fracción correspondiente a los glioxisomas (Muto y Beevers, 1974).

La lipasa está fuertemente asociada a la membrana de los glioxisomas y se solubiliza por tratamiento de la fracción glioxisomal con cloruro de potasio y desoxicolato de sodio, resultando ser una glicoproteína de peso molecular 62 kDa. Es inhibida por los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} , pero este fenómeno es revertido por el agregado de EDTA. Las sales de Na^{+} y K^{+} aumentan notablemente su actividad. El PCMB también tiene efecto inhibitorio, pero la actividad se recupera por el agregado de ditiotreitól. Algunos detergentes como el Tritón X-100 y el desoxicolato inhiben reversiblemente a la enzima (Maeshima y Beevers, 1985).

En cuanto a la especificidad de sustrato, si bien en un primer momento se la consideró una monoacilglicéridohidrolasa (Muto y Beevers, 1974), más tarde se comprobó que era capaz de catalizar la hidrólisis de triirricinoleína y otros triacilglicéridos, con lo que se demostró que es una verdadera lipasa (Maeshima y Beevers, 1985).

1.4.2.2. Lipasa de maní

Huang y Moreau (1978) ensayaron la actividad lipásica de homogenatos de cotiledones de maní a pH 5,0, 7,0 y 9,0 utilizando N-metilindoxilmiristato como sustrato. No hay actividad en semillas sin germinar, pero la misma se incrementa durante la germinación, siendo máxima a pH alcalino y entre los días 3 y 4 de la germinación. Fraccionando luego un homogenato de cotiledones de plántulas de 3 días en gradiente de sacarosa

determinaron que el 60% de la actividad de la enzima está asociada a los glioxisomas, un 15% a las mitocondrias y un 25% a una fracción de membrana de densidad $1,12 \text{ g cm}^{-3}$. La enzima glioxisomal es activa frente a monopalmitina pero no actúa sobre di- o tripalmitina, por lo que no se la considera una verdadera lipasa, si bien no se ha analizado su comportamiento frente a otros triacilglicéridos (Huang, 1984).

1.4.2.3. Lipasa de soja

La actividad lipolítica en soja se determinó inicialmente sobre sustrato endógeno: extractos de cotiledones de semillas germinadas sufren lipólisis liberando ácidos grasos. La actividad no se manifiesta en semillas sin germinar y se incrementa durante la germinación concomitantemente con el decrecimiento de los lípidos totales, siendo máxima a pH 9,0. El fraccionamiento del extracto por centrifugación en gradiente de sacarosa muestra que un 40% de la actividad lipásica se recupera en los glioxisomas; el resto está distribuido en otras fracciones subcelulares pero no en la fracción esferosomal.

La lipasa asociada a la fracción glioxisomal también exhibe máxima actividad a pH 9,0, cataliza la hidrólisis de tri-, di- y monoacilglicéridos del ácido linoleico, que representa el 50% de los ácidos grasos del aceite de soja, pero es inactiva frente a di- o tripalmitina, triestearina y trioleína. Puesta en contacto con cuerpos lipídicos aislados de semillas germinadas hidroliza el aceite en ellos contenidos, pero no es capaz de actuar sobre cuerpos lipídicos aislados de semillas no germinadas, lo que sugeriría que durante la

germinación se produce algún tipo de modificación en los esferosomas que permite la acción de la lipasa glioxisomal sobre los aceites de reserva (Lin *et al.* 1982).

1.4.3. Lipasas presentes en la fracción microsomal

1.4.3.1. Lipasas de Crucíferas

Trabajando con plántulas de *Brassica napus* L. ("nabo") de cuatro días de desarrollo, Theimer y Rosnitschek (1978) detectan la presencia de una lipasa asociada a una fracción discreta de membrana. Cuando someten un homogenato a una centrifugación diferencial (23.000 g) separan una capa grasa superior con sólo un 5% de actividad, un particulado crudo carente de actividad y un sobrenadante. La ulterior centrifugación de este sobrenadante a 150.000 g produce un pellet (fracción microsomal) en el que se recupera el 90% de la actividad lipásica. Dicha actividad es máxima a pH 9,0 sobre aceite de girasol o a pH 8,5 sobre N-metilindoxilmiristato, incrementándose 4 veces en cloruro de sodio 0,15 M y 0,5 veces en desoxicolato al 0,04%, pero se reduce notablemente al adicionar EDTA 10 mM y Tritón X-100 al 1%. Utilizando sustratos radioactivos y analizando los productos de la reacción Rosnitschek y Theimer (1980) comprueban que la enzima presenta especificidad posicional, hidrolizando preferentemente los ácidos grasos de posición 1 (3).

La enzima es activa sobre algunos aceites comerciales (especialmente girasol y ricino), pero es inactiva sobre trioleína y otros aceites, incluyendo el propio aceite de nabo. Si bien la actividad enzimática sobre trierucina no fue

determinada, el ácido erúxico (que representa el 40% de los ácidos grasos presentes en el aceite de semillas de nabo) ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima diez veces superior a la de los ácidos oleico y linoleico. Si la enzima es capaz de hidrolizar a su sustrato nativo, como debe esperarse del rol fisiológico que le cabe desempeñar, la baja actividad observada *in vitro* únicamente puede explicarse si el ácido erúxico estuviera presente como contaminante en el aceite de nabo (Huang, 1984).

La observación al microscopio electrónico de la fracción que exhibe actividad lipásica (Wanner y Theimer, 1978) revela la presencia de fragmentos con estructuras del tipo "unidad de membrana" (bicapa lipoproteica), en la que la capa intermedia se encuentra visiblemente engrosada. Por otra parte, cortes de cotiledones observados al microscopio electrónico mostraron la presencia de esferosomas con un apéndice en forma de asa, cuya estructura de membrana es similar a las de los fragmentos microsomales con actividad lipásica. En el estado previo a la degradación de las reservas lipídicas la micrografía electrónica denota la existencia de ribosomas asociados a dichos apéndices.

Sobre la base de los datos obtenidos, Wanner y Theimer (1978) proponen un modelo para explicar el origen de los esferosomas, la síntesis de la lipasa y la degradación del aceite (fig. 4). Los esferosomas se formarían por acumulación de triacilglicéridos dentro de la capa lipídica de las porciones terminales de los sacos membranosos del retículo endoplásmico, hecho que forzaría gradualmente la separación de

las dos capas lipoproteicas que forman la unidad de membrana (fig. 4a). Una vez que el esferosoma adquiere el tamaño definitivo, las dos unidades de membrana del retículo endoplásmico se fusionan, con lo que se detiene la acumulación de las grasas y el cuerpo lipídico se separa del retículo endoplásmico, reteniendo una fracción intacta del mismo con ribosomas asociados; los "apéndices tipo asa" observados por microscopía electrónica estarían representados por estos restos de retículo endoplásmico (fig. 4b). Estos ribosomas permitirían llevar a cabo la síntesis *de novo* de la lipasa o de un activador proteico de una lipasa inactiva preexistente. Como consecuencia, dichos apéndices podrían ser el sitio de degradación de los triacilglicéridos, los cuales migrarían desde el cuerpo del esferosoma para ser degradados. Los ácidos grasos liberados, que constituyen el sustrato inicial de la gluconeogénesis, podrían atravesar la capa de fosfolípidos de la media unidad de membrana o romper el apéndice (fig. 4d) y llegar a los glioxisomas, que están en estrecho contacto con los cuerpos lipídicos (fig. 4c). Finalmente, la pérdida del contenido de lípidos hace que las paredes opuestas se aproximen, transformándolo en una estructura del tipo de una unidad de membrana (fig. 4e).

Theimer y Rosnitschek (1978) afirman que la actividad lipásica se manifiesta en el citado "apéndice" de la fracción esferosomal y no en los esferosomas aislados (desprovistos del "apéndice" por ruptura mecánica), conclusión que se contradice con lo expuesto acerca de la detección de actividad lipásica en cuerpos lipídicos aislados (Lin y Huang, 1983). En un trabajo

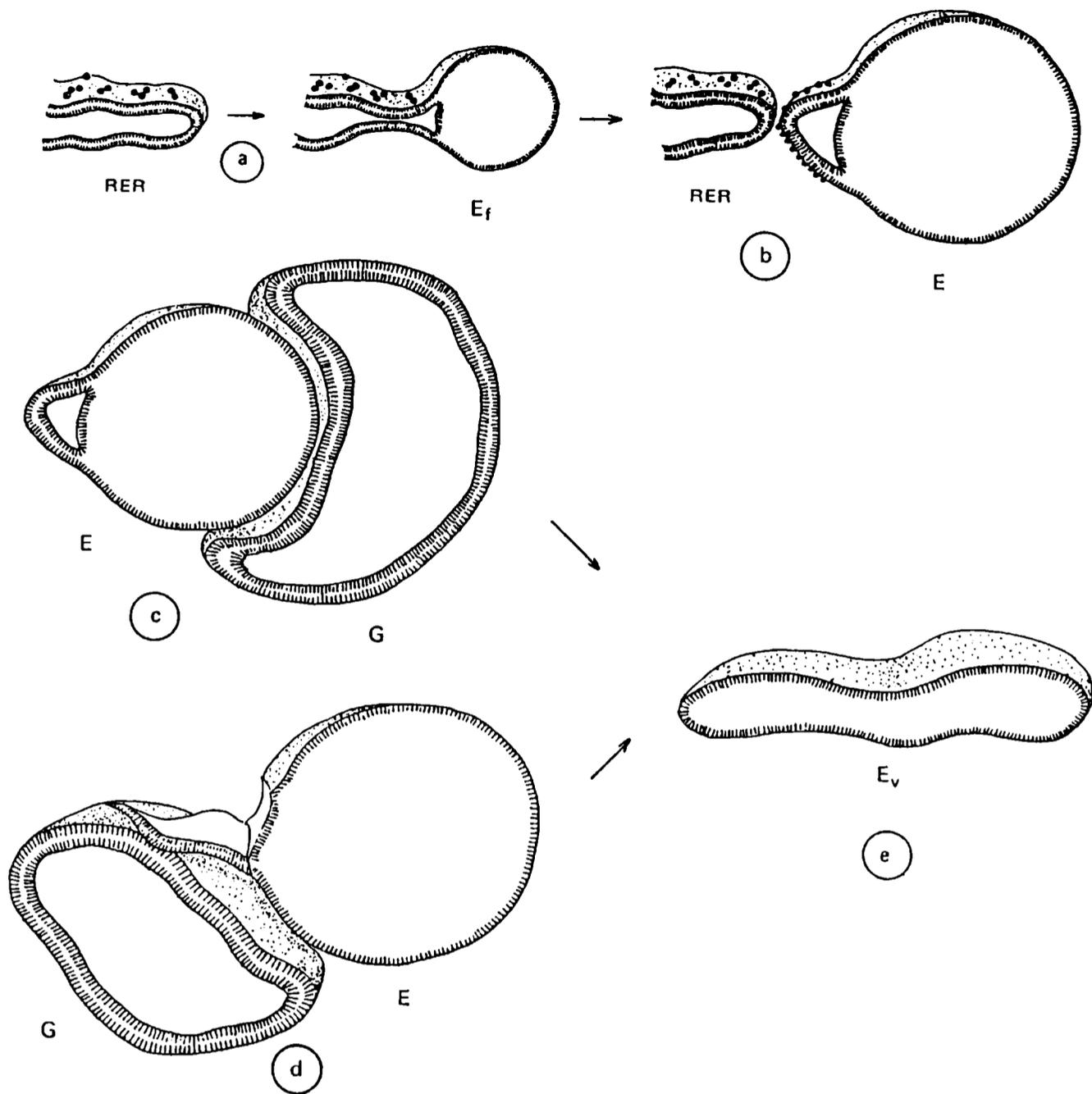


Fig. 4. Representación esquemática de la formación y degradación de los esferosomas. a) Formación del esferosoma; b) separación del cuerpo lipídico; c) esferosoma asociado a un glioxisoma; d) ruptura del "apéndice tipo asa" de un esferosoma asociado a un glioxisoma; e) esferosoma vacío ("fantasma"). RER: retículo endoplasmático rugoso; E_f: esferosoma en formación; E_v: esferosoma vacío; G: glioxisoma. (adaptado de Wanner y Theimer, 1978). cuerpos lipídicos aislados (Lin y Huang, 1983).

posterior (Hills y Murphy, 1988) parecería demostrarse la existencia de dos lipasas distintas, asociadas a diferentes fracciones de membrana: la microsomal es activa a valores de pH menores que la esferosomal y aparenta poseer una mayor especificidad de sustrato. Estos resultados no coinciden con los señalados anteriormente (Theimer y Rosnitschek, 1978; Rosnitschek y Theimer, 1980; Lin y Huang, 1983) por lo que tanto la ubicación subcelular como la identidad de la o las lipasas de nabo es un tema todavía no resuelto.

En un trabajo realizado con el objeto de explorar la posible aplicación de lipasas de semillas en procesos biotecnológicos, Hassanien y Mukherjee (1986) consiguen aislar una lipasa de plántulas de mostaza (*Sinapis alba* L.) de 4 días de germinación. La mayor actividad lipásica se detecta en la fracción sobrenadante obtenida al centrifugar homogenatos de plántulas de 4 días a 23.000 g durante 30 minutos. Su actividad óptima sobre aceite de girasol se logra a pH 9,0, declinando bruscamente por encima de pH 10,0 y haciéndose nula por debajo de pH 6,0. El análisis de los productos de hidrólisis por cromatografía en capa fina a los 5 y 15 minutos de iniciada la misma muestra que la enzima es altamente específica para las posiciones *sn*-1,3 de los triacilglicéridos.

1.4.4. Lipasas sin ubicación subcelular conocida

1.4.4.1. Lipasas de granos de cereales

Con excepción del maíz, los cereales no son considerados como oleaginosas, a causa de su bajo contenido en lípidos (2-10%, dependiendo de las especies y variedades). La mayoría de

los lípidos son triacilglicéridos, en los cuales el 80-90% de los ácidos grasos están representados por los ácidos oleico y linoleico. Los lípidos están habitualmente ubicados en el embrión (germen) y en la capa aleuronífera, que junto con el pericarpio, la testa y algo de endosperma constituyen el salvado.

La actividad lipolítica está presente en diferentes partes de los granos de cereales. En razón de la posibilidad de que se produzca el enranciamiento de los aceites durante el almacenaje de los granos o del salvado, algunos estudios han sido llevados a cabo sobre las enzimas responsables del mismo, pero de todos modos, el rol fisiológico de estas enzimas es poco claro y también es desconocida su ubicación subcelular (Huang, 1984).

1.4.4.1.1. Arroz

La mayor parte de la actividad lipásica en arroz está presente en las capas externas del grano (salvado). Tres lipasas han sido separadas por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular (Funatsu *et al.*, 1971; Aizono *et al.*, 1971; Aizono *et al.*, 1976), habiéndose purificado dos de ellas.

La lipasa I es activada por Ca^{2+} a bajas concentraciones, tiene un peso molecular de 40 kDa (Fujiki *et al.*, 1978 a), el extremo N-terminal está representado por ácido glutámico y los extremos C-terminales por glicina y serina. Sin embargo estos resultados no coinciden con los obtenidos por Shastry *et al.* (1976), quienes aislan una lipasa de peso molecular 40 kDa pero en la que el extremo

N-terminal está bloqueado por un resto acetilo y el C-terminal es fenilalanina.

La lipasa II tiene un peso molecular de 33 kDa y estaría compuesta por un número desconocido de unidades de peso molecular de 14 y 3,9 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro (Fujiki *et al.*, 1978 b). Tanto la lipasa I como la lipasa II manifiestan máxima actividad a pH 7,5-8,0; ambas hidrolizan triacilglicéridos de cadena corta y larga, incluyendo trioleína y aceites de arroz, oliva y coco, aunque la actividad es mucho mayor sobre los triacilglicéridos de cadena corta (C₂-C₈).

1.4.4.1.2. Trigo

La conocida "lipasa de germen de trigo" que se produce comercialmente, fue ensayada inicialmente por Singer y Hofstee (1948) sobre triacetina y tributirina, pero su actividad no se determinó frente a triacilglicéridos integrados por ácidos grasos de cadena larga; obtenida en forma soluble a partir de germen desengrasado, es inhibida por reactivos sulfhidrúlicos y no es afectada por el ion Ca²⁺.

Utilizando aceite de oliva como sustrato, Drapron *et al.* (1969) determinan verdadera actividad lipásica: la actividad en semillas en dormancia es muy baja y se incrementa rápidamente con la germinación, localizándose principalmente en el coleóptile (vainas que cubren la plúmula en el embrión de gramíneas).

En un ensayo fluorométrico usando butirato de 4-metilumbiliferona como sustrato, la lipasa muestra máxima

actividad a pH 7,5, que se incrementa por el agregado de calcio y magnesio, especialmente en combinación con potasio (Pancholy y Lynd, 1972).

1.4.4.1.3. Avena

A partir de harina de avena (*Avena sativa* L.) desengrasada fue parcialmente purificada una lipasa, que manifiesta máxima actividad a pH 7,4 (37-38°C) sobre tributirina y aceite de oliva. Al actuar sobre tributirina libera una molécula de ácido butírico, pero no tiene acción sobre 1,2- o 1,3-dibutirina, ni tampoco sobre 1- o 2-monobutirina (Martin y Peers, 1953).

Utilizando avena germinada durante 24 horas, Urquhart *et al.* (1983) ensayan la presencia de actividad lipásica en distintas fracciones de avena molida y desengrasada, determinando que el 85% de la misma se recupera en el salvado y que muy poca actividad está asociada al embrión.

Los trabajos más recientes sobre lipasas de avena tienen un enfoque biotecnológico: los cariopses de avena humedecidos e inmersos en un aceite constituyen un bioreactor lipásico natural que permite la hidrólisis de aceites vegetales y es capaz de catalizar tanto la síntesis de ciertos ésteres como reacciones de transesterificación (Lee y Hammond, 1990). Por otra parte, los granos de avena molidos y desengrasados con éter dietílico se utilizan directamente como fuente de enzima en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados a partir de diferentes aceites vegetales (Piazza, 1991 a, b).

1.4.4.1.4. Cebada

Baxter (1984) estudió la actividad lipolítica en granos de cebada germinados (malta verde) y sin germinar, éstos últimos previamente descascarados y separados en dos fracciones: endosperma y embrión. Todas las muestras fueron molidas y desengrasadas mediante tratamiento sucesivo con acetona, éter etílico y éter de petróleo. La extracción de la lipasa se llevó a cabo por tratamiento de la harina desengrasada con buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,0 y con el mismo buffer conteniendo cloruro de sodio 0,1 M y 0,2% de Tritón X-100.

La actividad lipásica se ensayó frente a trioleína marcada con C^{14} emulsionada con Tween 20. La actividad es muy escasa en harinas de cebada sin germinar y se incrementa con la germinación. Comparando la actividad lipolítica de las suspensiones de harina con la de los extractos enzimáticos se observa que la lipasa es prácticamente insoluble en buffer sólo, tanto en cebada como en malta verde, pero que puede ser parcialmente extraída con Tritón X-100, recuperándose un 50% de la actividad.

La purificación de la enzima se logra por precipitación de los extractos crudos con sulfato de amonio, obteniéndose una verdadera lipasa asociada a la fracción correspondiente entre 0 y 50% de saturación. Los extractos concentrados de este modo y redisueltos en buffer fosfatos de pH 6,8 son fraccionados sobre una columna de Biogel A-0,5. En malta, la fracción proteica que contiene

la mayoría de la actividad lipásica eluye inmediatamente luego del volumen muerto (fracción A) en la región correspondiente a un peso molecular del orden de 400-500 kDa. Una fracción B de menor peso molecular presenta actividad esterásica. En una etapa posterior de la purificación, la fracción A proveniente de semillas germinadas fue resuelta sobre DE-celulosa en dos componentes lipolíticamente activos: una lipasa I localizada en endosperma y una lipasa II, más abundante, en el embrión.

Existen estudios posteriores (Fernández y Staehelin, 1987) que hacen referencia al efecto del ácido giberélico sobre la distribución de la enzima responsable de la movilización de los triacilglicéridos almacenados en la capa de aleurona del grano de cebada. En las células que no son expuestas a la acción de la hormona la actividad lipásica neutra está asociada a la membrana de los cuerpos proteicos. Sin embargo, si estas células se exponen una hora a la acción del ácido giberélico, la mayoría de la actividad lipásica está presente en la fracción de los cuerpos lipídicos.

Mediante congelamiento ultrarrápido y microscopía electrónica los autores mencionados examinan la naturaleza de la asociación *in vivo* de los cuerpos lipídicos y de los cuerpos proteicos, comprobando que la monocapa de fosfolípidos que rodea a los primeros presenta una continuidad con la hoja externa de la bicapa que rodea a los segundos. Basados en estas observaciones proponen que

la lipasa puede ser transferida desde los cuerpos proteicos (donde se almacena) a los cuerpos lipídicos (donde actúa) y que dicha transferencia podría ser controlada por el ácido giberélico mediante un mecanismo desconocido.

1.4.4.2. Lipasas de Compuestas

1.4.4.2.1. Cártamo

Las semillas de cártamo (*Carthamus tinctorius*) contienen cerca de un 38% de lípidos. Daood y Al-Ani (1986) estudiaron la variación en la composición de ácidos grasos durante la germinación por cromatografía gaseosa (GLC). Los porcentajes de ácido palmítico, esteárico y oleico decrecen en su porcentaje relativo un 14%, un 35% y un 3,61%, respectivamente, durante los tres primeros días de la germinación, mientras que el ácido linoleico parece no consumirse. Por otra parte, el análisis de los ácidos grasos libres presentes en los aceites extraídos muestran un aumento en los ácidos grasos saturados, indicando la preferencia de la enzima por dichos ácidos.

La lipasa se extrajo por tratamiento de las semillas con solución de sacarosa 0,2 M: la enzima se recupera en la fracción soluble cuando el extracto se centrifuga a 10.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante (enzima cruda) se purifica por precipitación con sulfato de amonio y posterior pasaje por una columna de Sephadex G-150 utilizando solución de sacarosa como eluente. La velocidad de la reacción lipolítica es lineal durante las primeras 20 horas y proporcional a la concentración de enzima y sigue

la cinética de Michaelis-Menten ($K_m = 3,3 \times 10^{-2} \text{ M}$ y $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ utilizando Tween 80 y tributirina como sustrato, respectivamente). La enzima muestra máxima actividad a 30°C en un rango de pH 8,5-9,0. Es muy estable en medio alcalino (pH 8,0-10,0) y sensible al calor: no es activa después de un tratamiento de 70°C por 1 minuto y pierde un 25% de actividad por exposición a 45°C durante el mismo tiempo. La enzima es capaz de hidrolizar trioleína, trilinoleína y aceite de maíz; sin embargo la velocidad de hidrólisis es mucho mayor sobre tributirina y Tween 80 (Daood y Al-Ani, 1988).

1.4.4.2.2. *Vernonia anthelmintica*

De semillas de *Vernonia anthelmintica*, cuyo principal lípido de reserva es la trivernolina (el ácido vernólico es el *cis*-12,13-epoxi-*cis*-9-octadecenoico) se ha purificado parcialmente una lipasa de peso molecular superior a 200 kD y con una actividad óptima a pH 7,5-8,0 (Onley, *et al.*, 1968). Los autores detectan muy poca actividad cuando se agitan extractos acuosos o suspensiones de polvo acetónico con aceite de oliva pre-emulsionado como sustrato, pero la actividad se incrementa cuando el polvo se trata directamente con aceite de oliva y agua destilada o buffer fosfatos de pH 7,0. La enzima es capaz de hidrolizar tanto ésteres de alcoholes primarios como secundarios y es igualmente activa sobre triacilglicéridos saturados y no saturados.

1.4.4.3. Lipasas de Cucurbitáceas

1.4.4.3.1. *Cucumis melo*

Tanto las semillas en reposo como germinadas de *Cucumis melo* ("melón") contienen dos lipasas, con un pH óptimo de 4,0 y 6,0, respectivamente, sobre aceite de oliva emulsificado como sustrato. Las semillas decorticadas o las raíces primarias de semillas germinadas se homogenizan en medio buffer citrato 0,05 M de pH 7,0 y se centrifugan a 12.000 g durante 15 minutos. Las enzimas se obtienen en el sobrenadante y se separan por Sephadex G-75. La actividad se determina en distintos estadios de la germinación y en distintos fragmentos de la raíz, demostrándose que la misma se incrementa al aumentar la longitud y hacia la zona apical de la misma (Akhtar *et al.* 1981).

1.4.4.3.2. *Cucumeropsis edulis*

Del polvo acetónico preparado a partir de semillas en dormancia y germinadas de *Cucumeropsis edulis* se ha logrado aislar una lipasa cuya actividad es máxima a pH 5,0 y que se incrementa durante la germinación (Opute, 1975). Dado que la enzima libera indiscriminadamente ácidos grasos del gliceril-1-palmitato-2-oleato-3-estearato como del gliceril-1-estearato-2-palmitato-3-oleato, su actividad es inespecífica respecto a la longitud de cadena, el grado de saturación y posición de los ácidos grasos en el triacilglicérido.

1.4.4.4. Lipasas de Leguminosas

1.4.4.4.1. Maní

A partir de polvo acetónico de semillas germinadas de maní (*Arachis hypogaea* L.) ha sido aislada y parcialmente purificada una "lipasa alcalina" (pH óptimo 8,5). Su actividad es mayor sobre tributirina que sobre aceite de maíz. La enzima se extrae con solución de cloruro de sodio al 0,9% y posteriormente se purifica por tratamiento con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular (Sanders y Pattee, 1975). Su peso molecular estimado por SDS-PAGE es de 55 kDa. No se ha determinado si esta lipasa de maní parcialmente purificada es la misma lipasa glioxisomal antes mencionada (Huang y Moreau, 1978), ya que en ambos casos el pH óptimo es el mismo y su actividad se incrementa durante la germinación. De todos modos su participación en la hidrólisis de los lípidos de reserva es aún incierta, sobre todo si se tiene en cuenta que la máxima actividad lipolítica (autolítica) en extractos crudos de semillas germinadas de maní tiene lugar a pH 4,0-5,0 (St. Angelo y Altschul, 1984).

1.4.4.4.2. *Phaseolus vulgaris*

De semillas molidas y desengrasadas de *Phaseolus vulgaris* ("poroto") se extrae una lipasa empleando una solución de CaCl_2 10^{-3}M y ultrasonido. La enzima se purifica por precipitación con sulfato de amonio al 60%. La actividad lipolítica es máxima a pH 7,0 y se incrementa cuatro veces en presencia de Tween 20. La especificidad de

sustrato fue ensayada frente a triacetina, aceite de oliva y el aceite de *Phaseolus vulgaris*, mostrando mayor actividad frente a triacetina, lo que pone en evidencia que posee mayor actividad carboxilesterásica que lipásica (Kermasha et al., 1986).

1.4.4.4.3. *Lupinus albus*

Las semillas de *Lupinus albus* ("lupino") contienen una lipasa que se extrae homogeneizando los cotiledones en un medio buffer fosfatos de pH 6,8 conteniendo EDTA y ditiotreitól. La enzima se recupera en el sobrenadante obtenido al centrifugar el homogenato filtrado a 30.000 g durante 30 minutos. La actividad enzimática, determinada sobre triacilglicéridos purificados de aceite de lupino, es máxima a pH 5,0 (25°C) y es estimulada por la presencia de iones como K⁺ (10mM), Ca²⁺ (1mM) y Mg²⁺ (1mM). La enzima exhibe cierta especificidad para liberar ácidos grasos de la posición 1 (3) y es más activa sobre ácidos grasos saturados que sobre los no saturados (Sanz y Olías, 1990).

1.4.4.5. Lipasas de Malváceas

1.4.4.5.1. *Hibiscus cannabinus*

Las semillas de *Hibiscus cannabinus* poseen actividad lipolítica. La lipasa se extrae con buffer citrato 0,1 M de pH 7,0 en presencia de NaCl 0,5 M a partir de semillas desengrasadas. La actividad ensayada sobre aceite de oliva emulsionado es máxima a pH 5,0 (37°C). La enzima se inactiva a temperaturas mayores de 40°C y a valores de pH

inferiores a 4,0 y superiores a 6,0. La actividad lipolítica se ve estimulada por la presencia de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , mientras que los iones Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} la deprimen, al igual que el EDTA, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ (Kausar y Akhtar, 1979).

1.4.4.6. Lipasas de Juglandaceae

1.4.4.6.1. *Carya illinoensis*

Las semillas no germinadas de *Carya illinoensis* contienen una "lipasa alcalina" o un grupo de lipasas que se encuentran fuertemente unidas a la fracción particulada de homogenatos. Los estudios cinéticos indican que la actividad es máxima a pH 9,0 y a 30°C. La lipasa es activada o estabilizada por iones calcio y protectores de grupos sulfhidrúlicos (Whitenberg y Pao, 1980).

1.4.4.7. Lipasas de Gimnospermas

1.4.4.7.1. *Pseudotsuga menziesii*

Por centrifugación diferencial de un homogenato obtenido a partir del gametofito femenino de semillas de *Pseudotsuga menziesii* Franco ("abeto Douglas") se obtienen diferentes fracciones con actividad lipásica. Utilizando los lípidos nativos como sustrato, cerca del 80% de la actividad se recupera en la fracción soluble y el resto está distribuido entre cuerpos lipídicos, mitocondrias y cuerpos proteicos. La actividad en semillas secas es máxima a pH 5,2 y 7,1, pero durante la germinación se incrementa

siete veces a pH ácido y cuatro veces a pH neutro (Ching, 1968).

1.5. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LIPASAS

El conocimiento que pueda lograrse sobre las enzimas lipolíticas de plantas superiores resulta de fundamental importancia, tanto para comprender su rol fisiológico como por su capacidad de producir modificaciones en los productos agrícolas almacenados. Por otra parte, estos vegetales pueden constituir una valiosa fuente de productos enzimáticos de variada aplicación industrial.

Las enzimas lipolíticas catalizan los pasos iniciales en el proceso de movilización (degradación) de los lípidos de reserva de las semillas, por lo que de hecho pueden controlar las velocidades de germinación y de crecimiento de la plántula. El recambio de los lípidos de membrana depende también de la actividad de estas hidrolasas, de donde la información que se obtenga acerca de sus formas de acción es esencial para comprender los fenómenos de desarrollo y diferenciación celular, así como los cambios operados en los productos agrícolas almacenados y su efecto sobre la conservación de los mismos. Tanto el almacenaje de granos como la compresión a la que se someten ciertos productos agrícolas pueden estimular la actividad lipolítica, hecho que conduce a un incremento de la cantidad de ácidos grasos libres, cuya remoción de los aceites destinados a consumo alimentario genera costos adicionales en el proceso de industrialización. En el caso de las semillas, la intensificación de la lipólisis puede provocar pérdida de vigor

seminal, reduciendo la viabilidad de las mismas y favoreciendo en otros casos el enranciamiento de los lípidos de reserva (Huang, 1984).

Las lipasas son utilizadas en distintos procesos industriales, siendo los de mayor importancia la hidrólisis de triacilglicéridos para obtener ácidos grasos y glicerol y la esterificación o interesterificación de grasas y otros lípidos. El uso de lipasas en la industria parece ser económicamente factible, en especial para la preparación de productos de alto valor comercial que no pueden ser obtenidos convenientemente por síntesis química (Mukherjee, 1990).

En el campo de la alimentación su aplicación es múltiple. La capacidad de hidrolizar componentes lipídicos contribuye a mejorar los caracteres organolépticos de algunos derivados lácteos (Sicard, 1982; Fox, 1982; Lamberet y Menassa, 1982) y lo propio ocurre en la panificación, en cuyo caso se favorece además la conservación de los productos elaborados. En la fabricación de bebidas alcohólicas la remoción de los lípidos presentes acelera la fermentación y mejora el aroma de éstas; la acción sobre los lípidos contenidos en huevos se aprovecha para mejorar la calidad de la mayonesa, salsas y aderezos. En productos elaborados con carnes y pescados, a la par que remueven el exceso de grasas mejoran su sabor (Whitaker, 1982). Pueden obtenerse asimismo productos de alto valor comercial como ácidos grasos poliinsaturados, utilizados en productos dietéticos, por hidrólisis de aceites de pescado o de semillas, así como monoacilglicéridos que se emplean como emulsificantes (Mukherjee, 1990).

En la industria química estas hidrolasas son utilizadas tanto para la obtención de ácidos grasos, glicerina, mono- y diacilglicéridos de elevada pureza como para la síntesis de ésteres y en la elaboración de reactivos para el análisis de lípidos; una aplicación reciente pero en expansión es su inclusión en polvos detergentes.

Las lipasas han sido tradicionalmente incorporadas a preparaciones farmacéuticas polienzimáticas destinadas a ser usadas como coadyuvantes digestivos (Sicard, 1982), pero recientemente se ha aprovechado la enantioselectividad de las mismas para la obtención de drogas como agentes bloqueantes β -adrenérgicos (Mukherjee, 1990). En bioquímica clínica son empleados como reactivos de diagnóstico de triacilglicéridos en sangre (Sugiura, 1984).

Finalmente puede consignarse el uso de enzimas lipolíticas en procesos diversos, tales como la remoción de grasas de la piel animal en la fabricación de productos de cuero, la desobstrucción de desagües y el tratamiento de aguas de desecho, en combinación con otras enzimas (Iwai y Tsujisaka, 1984).

Las lipasas representan un 3% del total de enzimas usadas en la industria (Huang *et al.*, 1988). En la casi totalidad de las aplicaciones antes señaladas las enzimas lipolíticas utilizadas son de origen fúngico (Iwai y Tsujisaka, 1984), incluidas las que se emplean en procesos biotecnológicos de reciente data, como la interesterificación de aceites y grasas (Macrae, 1983). Sin embargo, trabajos recientes han enfatizado la necesidad de dirigir la atención de los investigadores hacia

la obtención de lipasas provenientes de plantas superiores, ya que se encuentran presentes en todas las semillas y en muchas de ellas en cantidades que justifican su explotación comercial. El contenido de lipasas, salvo excepciones, se incrementa durante los primeros días de la germinación, las plántulas son fáciles de cultivar, las técnicas de extracción son simples y es más que satisfactoria la estabilidad y actividad de las preparaciones hasta ahora conocidas (Hassanien y Mukherjee, 1986). Por otra parte cabe destacar que la alta especificidad de sustrato de las lipasas vegetales no ha sido encontrada en lipasas microbianas o de mamíferos (Huang *et al.*, 1988). No obstante -como puede comprobarse a través de la revisión realizada- es aún escaso el número de especies en cuyas semillas se ha determinado la presencia de lipasas y muy reducidos los casos en los que dichas enzimas han sido purificadas y caracterizadas.

1.6. EL CULTIVO DE GIRASOL EN LA ARGENTINA

El girasol se cultiva en nuestro país desde hace unos ciento cincuenta años. Esta oleaginosa fue traída a la Argentina por los inmigrantes de Europa oriental, quienes la sembraron para el consumo directo y para la alimentación de las aves, pero es recién a partir de 1930 que este cultivo adquiere verdadera importancia. A pesar de las considerables oscilaciones anuales, tanto en superficie como en rendimiento o producción total, la Argentina figura siempre en los primeros puestos entre los países productores de todo el mundo.

Desde hace alrededor de cuarenta años constituye la fuente básica para la producción de aceite comestible en nuestro país, representando más de la mitad del aceite total que se consume. Por otra parte, el girasol se cuenta entre los cinco cultivos más utilizados en el mundo para la obtención de aceites comestibles, junto con la soja, el maní, la colza y la palma aceitera (INTA, 1985).

La Argentina es el segundo productor y a la vez el primer exportador de aceite a nivel mundial. La importancia de este cultivo en nuestro país, donde ocupa el segundo lugar después de la soja, está reflejada en los siguientes valores de la campaña 1990/91 dados por la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, donde la cantidad de aceite representa el 18% de la producción mundial.

Area sembrada:	2.372.400 ha
Superficie cosechada:	2.301.200 ha
Producción de granos:	4.033.800 ton
Producción de aceite:	1.428.000 ton



2. Objetivos

La actividad desarrollada en el campo de las lipasas vegetales es considerablemente menor que la que se lleva a cabo en el de las lipasas de mamíferos y de microorganismos, a pesar de la importancia que tiene el conocimiento de aquéllas, tanto para comprender su rol fisiológico como para analizar su posible aplicación en procesos biotecnológicos.

En razón de ello, las semillas de oleaginosas deberían constituir la fuente de elección de lipasas vegetales, dado que los aceites representan su mayor sustrato energético. Por otra parte, su condición de cultivo intensivo asegura una fácil disponibilidad de material de bajo costo y elevada homogeneidad.

Como ya ha sido mencionado, el girasol es la principal oleaginosa cultivada en nuestro país, correspondiendo a la Provincia de Buenos Aires más de la mitad de su producción. Sin embargo, más allá de algunos intentos aislados, la información de la que se dispone sobre el sistema lipolítico responsable de la movilización de los lípidos de reserva de esta especie es prácticamente nula, motivos que decidieron la elección del material utilizado en el presente estudio y que persigue los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer cómo progresa la degradación de los lípidos de reserva de las semillas de girasol durante la germinación de las mismas y establecer la correlación existente con la gluconeogénesis.

2. Comprobar la existencia de actividad lipolítica en semillas en dormancia y analizar la manifestación de la misma en el curso de la germinación.
3. Determinar la localización subcelular del sistema lipolítico y establecer sus condiciones óptimas de acción *in vitro*.
4. Estudiar el efecto de iones, detergentes e inhibidores enzimáticos sobre el comportamiento del sistema lipolítico.
5. Establecer si el sistema lipolítico manifiesta alguna especificidad por los triacilglicéridos que componen el aceite y por los ácidos grasos que forman parte de aquéllos.



3. Materiales y métodos

3.1. MATERIAL VEGETAL

Durante la realización del presente trabajo se utilizaron diferentes partidas de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871), provistas por la Asociación de Cooperativas Argentinas C.L. (Pergamino, Argentina).

3.2. REACTIVOS

A menos que se indique expresamente, todos los reactivos utilizados fueron de calidad p.a.: ácido cítrico, ácido bórico, borato de sodio, cloruro mercúrico (Anedra), hidróxido de sodio (Carlo Erba), cloruro de calcio, fenol y fosfato disódico (Fluka), cloruro de magnesio, cloruro de sodio, EDTA, fosfato monosódico, glicina y glucosa (Mallinckrodt), acetonitrilo HPLC, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, cloroformo HPLC, cloruro de potasio, etanol y metanol (Merck), aceite de girasol (Molinos Río de la Plata), sulfato de sodio anhidro (Rhodia), acetato de cobre, ácido oleico, dodecilsulfato de sodio, fenilmetilsulfonilfluoruro, Tris y Tritón X-100 (Sigma), cloroformo, isooctano y piridina (Sintorgan).

Como patrones para GLC de ácidos grasos se utilizaron ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), araquídico (20:0) y behénico (22:0), en tanto que para HPLC de triacilglicéridos se usaron trilinoleína, trioleína, dilinoleiloleína, dioleilpalmitina y dioleilestearina (Sigma, pureza 99,99%).

3.3. PRETRATAMIENTO Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS

Las semillas de muchas especies contienen inhibidores de la germinación localizados en los tegumentos (Ginzo, 1980). Con el objeto de eliminar posibles inhibidores de cubierta y al mismo tiempo favorecer la imbibición, las semillas se lavaron con agua corriente durante 24 horas a temperatura ambiente (20°C). A continuación se pusieron a germinar en bandejas parcialmente cubiertas con polietileno sobre toallas de papel húmedo, en la oscuridad, para facilitar la movilización de los lípidos.

A excepción del ensayo preliminar, en el cual la temperatura fue fijada en 25°C, todas las experiencias de germinación se llevaron a cabo a 30°C. El fin del período de imbibición fue considerado día cero de la germinación. Las plántulas fueron seleccionadas tanto por edad como por longitud del hipocótilo (fig. 5).

3.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE LIPIDOS TOTALES

Como paso previo al estudio del sistema lipolítico responsable de la movilización de los lípidos de reserva resulta necesario conocer cómo progresa la degradación de los mismos, lo que puede lograrse a través del conocimiento del contenido de lípidos residuales en los cotiledones durante la germinación.

Para ello los cotiledones, seleccionados como se indicó en el punto anterior, fueron triturados en un Omni-Mixer Sorval con una mezcla cloroformo-metanol (2:1), utilizando 17 ml de mezcla por gramo de cotiledones frescos. La suspensión

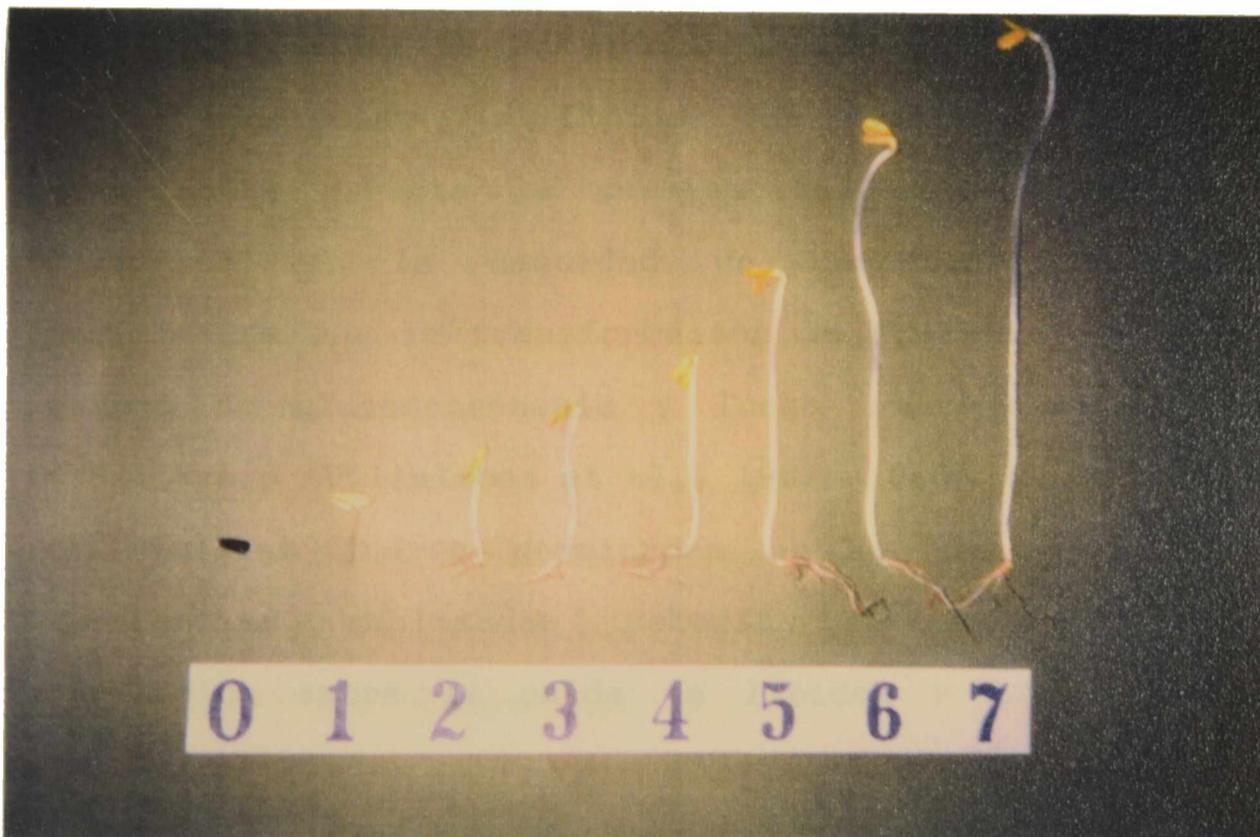


Fig. 5. Semillas de girasol en distintos estadios de desarrollo. La germinación se llevó a cabo en la oscuridad, a 30°C

fue filtrada a través de papel de filtro y el residuo lavado dos veces con 2 ml de mezcla extractante por gramo de cotiledones (Radin, 1969). Los filtrados fueron mezclados y evaporados con corriente de aire caliente hasta peso constante.

3.5. DETERMINACION DE GLUCIDOS SOLUBLES

El contenido de lípidos de las semillas decrece gradualmente durante la germinación, coincidiendo con el incremento en la cantidad de carbohidratos solubles, inicialmente por la transformación de aquéllos a través del proceso de gluconeogénesis y luego como resultado de la fotosíntesis (Villalobos et al., 1987). Dado que en este caso las semillas fueron germinadas en la oscuridad, en las experiencias realizadas debería esperarse una buena correlación entre la caída de lípidos y la aparición de glúcidos simples.

Con el objeto de determinar el contenido de glúcidos solubles, los cotiledones fueron desengrasados previamente con cloroformo y el residuo fue extraído con etanol de 80° en un erlenmeyer con tapa durante 10 minutos, con agitación permanente (Villalobos et al, 1987). Para la estimación de los glúcidos presentes en los extractivos etanólicos se utilizó el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), expresando los resultados en mg de glucosa por par de cotiledones.

3.6. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE TRIACILGLICERIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La etapa inicial de degradación de los lípidos de reserva seminales es mediada por lipasas, pero en las distintas especies estudiadas ha quedado demostrado que estas enzimas manifiestan diferente especificidad por los triacilglicéridos presentes en los aceites (Huang, 1984).

Para poder estudiar el comportamiento del sistema lipolítico de girasol resulta necesario conocer la composición inicial del aceite en semillas en dormancia y comprobar luego si sufre alguna variación en el transcurso de la germinación de las mismas.

Para la obtención de los aceites se extrajeron los lípidos totales de semillas no germinadas y de plántulas de distintos días de germinación con cloroformo-metanol (2:1), utilizando 17 ml de mezcla extractiva por gramo de muestra. La suspensión resultante se filtró por papel de filtro (S & S, tipo 0859) y el residuo se lavó dos veces con 2 ml de la mezcla extractante. Luego se le agregó al filtrado 0,2 volúmenes de solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%, se agitó y se dejó decantar a baja temperatura para permitir la separación de dos fases: una superior acuosa y una inferior clorofórmica. La fase inferior que contiene el aceite se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno (González Baró, 1991).

El análisis de triacilglicéridos por HPLC se llevó a cabo en un equipo Konik KNK-500-A utilizando una columna Bio-Sil C-18 HL 90-5 S (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5µm,

Bio-Rad) y un detector ultravioleta UVIS 204 (Linear instruments). Los cromatogramas fueron registrados e integrados con un integrador Spectra Physics 4600. Los aceites extraídos de semillas de distintos días de germinación se redisolviéron en cloroformo (5 mg por ml) y se filtraron a través de filtros NitroPlus de 0,45 μm (MicronSep, Mei). Las muestras así tratadas se inyectaron y fueron eluidas con una mezcla de acetonitrilo-etanol (3:7) y una velocidad de flujo de 1,3 ml/min. La detección de los triacilglicéridos se llevó a cabo a 210 nm. La identificación tentativa de los mismos se realizó por comparación con los tiempos de retención de los siguientes triacilglicéridos patrones: trilinoleína (LLL), trioleína (OOO), dilinoleiloleína (LLO), dioleilestearina (OOS) y dioleilpalmitina (OOP) y de acuerdo al orden de elución de triacilglicéridos de aceite de girasol obtenidos por otros autores (Dong y Di Cesare 1983, Barron y Santa-María 1991).

3.7. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA (GLC)

Mediante el estudio de la variación en la composición de ácidos grasos durante la germinación puede lograrse un aporte adicional al conocimiento del modo de acción del sistema lipolítico presente en semillas de girasol, ya que ello permitiría conocer la preferencia del sistema enzimático por el grado de saturación y la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos presentes en el aceite.

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa (GLC) de los ésteres metílicos de los mismos, obtenidos a partir de los aceites extraídos de cotiledones de distintos estadios de desarrollo por el procedimiento indicado anteriormente. Los ácidos grasos se esterificaron calentando a reflujo durante 30 minutos 0,5 g de aceite con 30 ml de una mezcla de metanol-benceno (3:1) y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se dejó enfriar y luego se extrajo con 50 ml de hexano, agitando durante 1 minuto. El extracto hexánico se lavó hasta neutralidad con cloruro de sodio al 10%, utilizando naranja de metilo como indicador, y se secó con sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo se retomó con hexano (dilución 1:10). Un microlitro de esta dilución se inyectó en el cromatógrafo gaseoso.

Las corridas cromatográficas se realizaron en un equipo Hewlett Packard modelo 5890 A, utilizando una columna SP 2330 de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno. La mejor resolución se obtuvo con las siguientes condiciones de corrida: un caudal de N₂ de 20 ml/min, una temperatura del inyector de 250°C y una temperatura de columna de 188°C.

Las áreas correspondientes a cada pico se determinaron en forma relativa con un integrador Hewlett Packard 3392. Como patrones se utilizaron los siguientes ácidos grasos: ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), araquídico (20:0) y behénico (22:0).

3.8. OBTENCION DE EXTRACTOS DE COTILEDONES

Salvo algunas excepciones, las lipasas de semillas hasta ahora estudiadas aparecen durante la germinación. Por lo tanto los ensayos para determinar la presencia de actividad lipolítica en girasol se llevaron a cabo tanto sobre extractos de cotiledones de semillas en dormancia como de plántulas en distintos estadios de desarrollo. Los cotiledones, seleccionados como se indicó antes, fueron separados manualmente, lavados con agua destilada y homogeneizados (Omni-Mixer, Sorval) en un medio Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 (2 ml de buffer por gramo de cotiledones frescos) en baño de hielo, durante un minuto. Cada homogenato fue filtrado a través de una tela de nylon (20 mallas/cm) y el extracto crudo así obtenido fue congelado y conservado a -20°C hasta el momento de ser usado.

3.9. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE COTILEDONES POR CENTRIFUGACION

Una vez detectada la actividad lipolítica en extractos crudos de cotiledones, los mismos fueron centrifugados a 11.000 g durante 30 minutos a 4°C, obteniéndose una capa grasa superior, un sobrenadante y una fracción particulada ("pellet"). La capa grasa fue cuidadosamente removida con una espátula y resuspendida en agua destilada (100 mg/ml); el sobrenadante fue separado y el pellet resuspendido en solución 0,1 M de buffer fosfatos de pH 7,0.

La capa grasa está constituida esencialmente por cuerpos lipídicos, que contienen 92-98% (p/p) de lípidos neutros

(fundamentalmente triacilglicéridos, pero también diacilglicéridos y ácidos grasos libres), 1-4% de fosfolípidos y 1-4% de proteínas. La detección de actividad lipolítica en la capa grasa ("autolisis") estaría evidenciando la presencia de una lipasa asociada a la fracción proteica (oleosinas) de la membrana de los cuerpos lipídicos (Huang, 1992).

De existir actividad lipolítica en el sobrenadante no se obtendría información con respecto a su ubicación subcelular, pero se dispondría de la lipasa en forma soluble, lo que facilitaría su purificación.

Finalmente, la presencia de actividad lipolítica en el pellet indicaría la asociación de la lipasa con los glioxisomas u otras estructuras subcelulares.

3.10. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA

3.10.1. Elección del medio de reacción

La determinación de la actividad de enzimas cuyos sustratos habitualmente no son solubles en agua, como ocurre en el caso de las lipasas, plantea problemas metodológicos que pueden resolverse a través de dos mecanismos alternativos: a) la suspensión del sustrato (corrientemente triacilglicéridos puros o aceites naturales) en una solución de goma arábiga u otro agente viscosante y/o emulgente y b) la formación de un sistema de dos fases, en el que la fase acuosa contiene la lipasa y la fase solvente orgánico el sustrato disuelto. En este último caso la fase orgánica cumple con la doble función de disolver el sustrato y también

los ácidos grasos que constituyen uno de los productos de la lipólisis, por lo que debe asegurarse que ambas fases (acuosa y orgánica) estén en estrecho contacto.

En el primer caso es necesario dispersar el sustrato, lo que generalmente se logra a través de emulsiones de goma arábica al 5%. En consecuencia se ensayó tanto la capacidad emulgente de soluciones de goma arábica como la posibilidad de extraer de la emulsión con isooctano los ácidos grasos liberados en la hidrólisis. Se pudo comprobar que la emulsión es estable durante varias horas en reposo, pero que la extracción con isooctano de los ácidos grasos era de bajo rendimiento y requería un tiempo excesivo (luego de agitar durante 3 minutos en vortex una emulsión de ácido oleico en goma arábica sólo se recupera el 25% de ácido oleico).

La retención de los ácidos grasos por la goma arábica se atribuyó al contenido de iones calcio de la misma, que podrían actuar reteniendo a los grasos liberados en forma de sales de calcio, por lo que se procedió a dializar una solución de goma arábica frente a ácido clorhídrico 10 mM durante 24 horas (Brown *et al.*, 1977) y repetir el ensayo: los resultados no mejoraron, por lo que en el presente trabajo se decidió emplear el sistema de dos fases.

3.10.2. Equipo utilizado

La elección del sistema de dos fases exige un estrecho contacto entre la fase acuosa y la fase orgánica, lo que se logra usualmente con un agitador magnético y una cuba de doble camisa que permita la circulación de agua para

termostatar el sistema; sin embargo este equipo sólo permite la realización de una experiencia por vez, la que debe ser reproducida en tantas oportunidades como sea necesario para obtener valores confiables.

El número de determinaciones simultáneas depende esencialmente de la cantidad de agitadores magnéticos disponibles, pero ello no asegura que todos los ensayos sean estrictamente equivalentes entre sí, porque resulta prácticamente imposible obtener en todas las experiencias la misma velocidad de agitación, de lo cual depende el grado de contacto entre ambas fases.

En consecuencia fue necesario diseñar un equipo (figs. 6-8) que permite la realización de diez determinaciones simultáneas con una velocidad de agitación regulable, reproducible, constante e igual en todas las cubas de reacción. La unión de todas las cubas entre sí por medio de tubos de goma asegura la termostatación de las mismas.

El gabinete (fig. 6) está realizado totalmente en acrílico de 3,2 mm de espesor y consta básicamente de dos piezas ensamblables. La inferior (a) es una caja de 20 x 50 cm de base y 10 cm de alto y está destinada a albergar los diez agitadores y el sistema electrónico de mando y control. En la superior (b) la base está desplazada hacia arriba para que obre al mismo tiempo de tapa de aquélla y de soporte de las cubas de reacción. Dos planchas perforadas de acrílico completan el gabinete: una de ellas (c) cubre el dispositivo electrónico-mecánico y en su cara inferior se fijan las planchuelas (d) que actúen como sostén de los agitadores, en

tanto que la otra (a) está destinada a mantener la posición de las cubas de reacción.

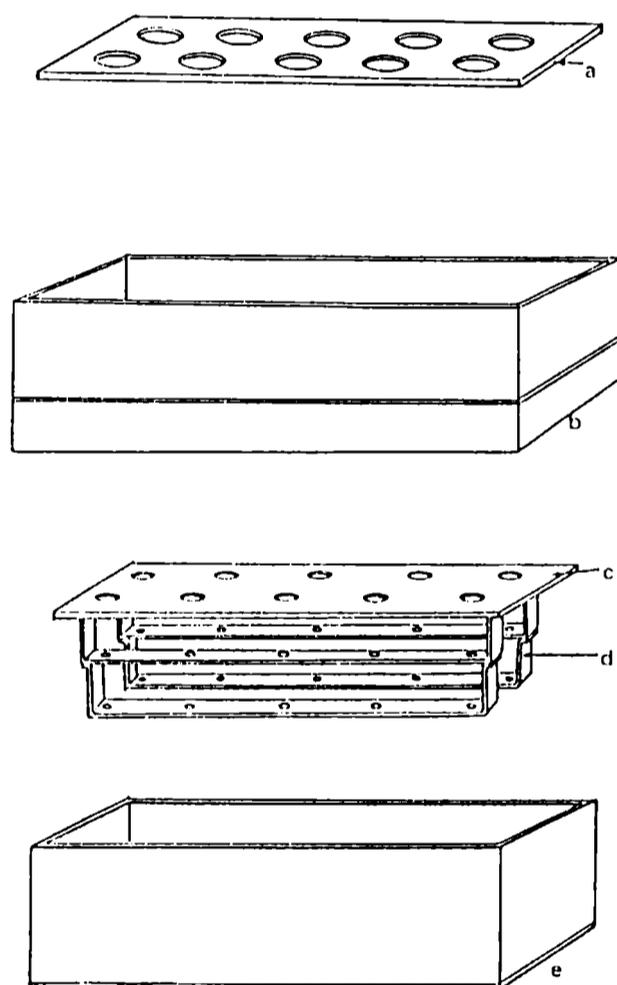


Fig. 6. Detalle de las partes que componen el gabinete (ver explicación en el texto)

La figura 7 representa un corte del equipo, donde se puede apreciar la manera en que se disponen las piezas que integran el gabinete, las cubas de reacción y los agitadores. Cada agitador está constituido por un eje de acero de 2,2 mm de diámetro y 50 mm de longitud, con los primeros 20 mm roscados, un imán de 32 x 10 x 3 mm y una polea de duraluminio de 41 mm de diámetro. El imán está soldado a una arandela plana y ésta a su vez a una tuerca que permite su unión al extremo superior del eje. Un par de tuercas con arandelas planas facilitan la fijación de la polea sobre el eje en la posición deseada. Los agitadores se mantienen en posición de funcionamiento gracias a la existencia de dos planchuelas de bronce fosforoso que actúan como bujes y sostén de los ejes.

El conjunto de agitadores se acciona a través de un único motor universal (del tipo de los que poseen los grabadores de cinta abierta), controlado por un sistema de regulación electrónica. El movimiento se desmultiplica en una primera polea doble (fig. 8), desde donde se distribuye a las nueve poleas restantes mediante una correa de 2 mm de espesor y 117 cm de largo.

Sobre una de las poleas está fijado un generador de pulsos conectado a un frecuencímetro compuesto por un sensor y un display digital que indica el número de revoluciones por minuto. Un regulador a transistores permite seleccionar la velocidad de agitación y una llave interruptora general desconecta el sistema para facilitar la toma de muestras.

Fig. 7. Corte del equipo. a: pieza superior; b: pieza inferior; c: placa perforada para mantener las cubas en posición; d: cuba de reacción; e: placa perforada donde se fija el soporte de los agitadores; f: eje del agitador; g: imán; h: polea; i: planchuelas que funcionan como bujes y soporte de los agitadores.

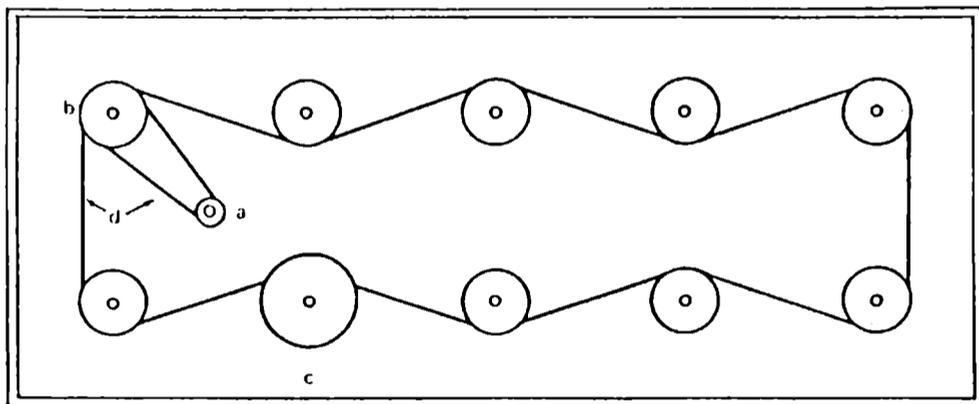
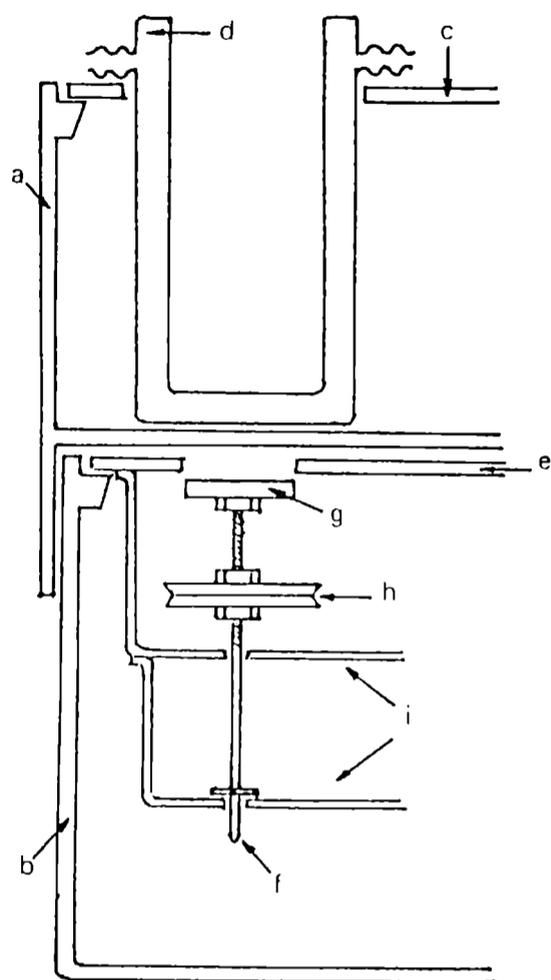


Fig. 8. Vista superior de la distribución de los agitadores. a: eje y polea del motor; b: polea doble; c: generador de pulsos; d: correas.

3.10.3. Técnica empleada

La actividad lipolítica se medía tradicionalmente titulando los ácidos grasos liberados con soluciones de hidróxido de sodio, hecho que condicionaba seriamente la realización simultánea de varias determinaciones. De allí la aparición de métodos colorimétricos, fluorométricos y con materiales radioactivos, entre otros (Jensen, 1983).

El método adoptado en este caso (Kwon y Rhee, 1986) está basado en la determinación colorimétrica de las sales de cobre de los ácidos grasos liberados, que se solubilizan en isooctano y cuya absorbancia se determina a 715 nm. El método es rápido, sensible y preciso, con excelente reproducibilidad de los resultados obtenidos. El reactivo consiste en una solución de acetato de cobre al 5%, llevada a pH 6,0-6,2 con piridina.

Cuando la determinación se llevó a cabo sobre los extractos y la capa grasa, el medio de reacción contuvo 2 ml de solución buffer, 5 ml de isooctano y 2 ml de muestra (en la que están presentes tanto la enzima como el sustrato), agregados en ese orden. Para estimar la actividad lipolítica del sobrenadante y del pellet se utilizaron como sustrato 0,5 ml de aceite de girasol disueltos en 4,5 ml de isooctano.

La mezcla de reacción fue agitada durante 2 minutos a 37°C; la actividad enzimática se detuvo por el agregado de 2 ml de HCl 6N, continuando la agitación durante un minuto. Finalmente se separaron 3 ml de la capa superior de isooctano, que contienen los ácidos grasos liberados, y se hicieron reaccionar con 0,6 ml de solución de acetato de

cobre al 5% (pH 6,1). Luego de agitar cada tubo en un vórtex durante 90 segundos, se midió la absorbancia de la solución a 715 nm. Los resultados obtenidos en las determinaciones se expresaron como nanomoles de ácido oleico liberados por minuto por par de cotiledones, por lo que previamente fue necesario hacer una curva patrón con concentraciones variables de ácido oleico ($2 \cdot 10^3$ a 10^4 nanomoles/ml).

Los ácidos grasos libres eventualmente presentes en la muestra fueron descontados mediante la realización de ensayos en blanco, en los que 2 ml de muestra se agitaron con 2 ml de HCl 6N durante un minuto, previamente a la adición de buffer e isooctano.

3.11. VARIACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA CON EL pH

Para comprobar si la máxima velocidad de lipólisis *in vivo* se correlaciona con la aparición de actividad lipolítica *in vitro*, se diseñaron ensayos preliminares de determinación de actividad incubando extractos de cotiledones de distintos estadios de desarrollo (semillas secas, días 0 a 7), a 37°C y a pH 5,0, 7,0 y 9,0.

Una vez que se dispuso de esta información preliminar se confeccionó un perfil de actividad enzimática en función del pH para determinar la o las zonas de máxima actividad lipolítica.

En las experiencias se utilizaron los siguientes sistemas buffer (Stoll y Blanchard, 1990): citrato-fosfato (pH 2,8-7,0), ácido bórico-borato de sodio (pH 7,5-9,2) y glicina-hidróxido de sodio (8,6-10,6).

3.12. VARIACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA CON LA TEMPERATURA

El comportamiento del sistema lipolítico con la temperatura se estableció determinando la actividad en muestras de capa grasa resuspendidas en agua destilada y sometidas a incubación durante 2 minutos a pH 3,2 y 8,6 entre 35°C y 90°C.

3.13. ANALISIS POR HPLC DE TRIACILGLICERIDOS RESIDUALES EN ENSAYOS AUTOLITICOS.

A efectos de conocer si el comportamiento del sistema lipolítico en los ensayos *in vitro* seguía pautas de especificidad similares a las que se observan *in vivo*, se tomaron muestras de la fase isooctano de la mezcla de reacción de los ensayos de autólisis y se sometieron a análisis por HPLC. El equipo utilizado y las condiciones de corrida fueron las mismas que se describieron para el análisis de los aceites. Para la preparación de la muestra a analizar, 3 ml de la fase isooctano correspondientes a la mezcla de reacción fueron evaporados bajo corriente de nitrógeno y el residuo retomado con cloroformo de modo de lograr una concentración de 5 mg/ml.

3.14. EFECTO DE IONES, INHIBIDORES ENZIMATICOS Y DETERGENTES SOBRE EL SISTEMA LIPOLITICO

Se ha sugerido que los ácidos grasos de cadena larga liberados en la lipólisis reducen, tanto por efecto de carga como por impedimento estérico, el acceso de la lipasa a las moléculas de triacilglicéridos situadas en la interfase

aceite-agua y que los cationes divalentes, como aceptores de ácidos grasos, previenen este tipo de inhibición. Por otra parte, se atribuye a algunos cationes monovalentes la estimulación de la actividad lipolítica por su capacidad de suprimir la inhibición enzimática por efecto de carga interfacial (Benzonana y Desnuelle, 1968). Con el objeto de estudiar el efecto de iones mono- y divalentes en la autólisis de los cuerpos lipídicos de girasol, una alícuota (1,8 ml) de capa grasa resuspendida fue incubada durante 10 min a 37°C con 0,2 ml de las siguientes soluciones: CaCl₂, Cu(CH₃COO)₂, KCl, MgCl₂ y NaCl (1 mM y 10 mM) y la actividad lipolítica residual a los pH óptimos fue medida como se indicó anteriormente.

Existen presunciones de que el mecanismo de acción hidrolítico de las lipasas podría seguir pautas similares a las halladas en proteasas (Brady *et al.* 1990). Para comprobarlo se ensayaron inhibidores de hidrolasas serínicas (PMSF), cisteínicas (Hg²⁺) y metalo-enzimas (EDTA), empleando soluciones de HgCl₂ (0,1 mM), PMSF (1 mM) y EDTA (1 mM y 10 mM) en las condiciones indicadas en el párrafo anterior.

Dado que la reacción lipolítica requiere de la existencia de una interfase, en el estudio del comportamiento de estos sistemas enzimáticos es corriente ensayar el efecto que ejercen los detergentes sobre la actividad lipolítica. Por ello se determinó qué consecuencia tenía el agregado de los detergentes Tritón X-100 y SDS en una concentración del 1% en la mezcla de reacción.



4. Resultados

4.1. OPTIMIZACION DEL ESQUEMA DE GERMINACION PARA LA DETECCION TEMPRANA DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA

Cuando las semillas de girasol se hacen germinar en la oscuridad a 25°C se requieren 15 días para que el contenido inicial de lípidos disminuya al 30%, en tanto que si la germinación se lleva cabo a 30°C, en sólo 7 días el contenido de lípidos decrece al 20% (fig. 9).

Dado que la caída de lípidos guarda estrecha relación con la aparición de la actividad lipolítica, este comportamiento germinativo reduce significativamente el tiempo necesario para la obtención del material destinado al estudio del sistema lipolítico, por lo que todas las experiencias posteriores fueron realizadas a esta última temperatura.

4.2. CORRELACION ENTRE LA VARIACION DEL CONTENIDO DE LIPIDOS TOTALES Y DE GLUCIDOS SOLUBLES DURANTE LA GERMINACION

Como muestra la figura 10, el contenido de lípidos sólo decrece un 9% durante los dos primeros días de la germinación y a partir de entonces sufre una brusca caída (30% del valor inicial al quinto día), reduciéndose a un 20% al cabo de siete días. Por su parte, el contenido de glúcidos solubles disminuye durante las primeras 24 horas y luego se incrementa, manteniendo un nivel más o menos constante entre los días 3 y 6, momento a partir del cual comienza a disminuir.

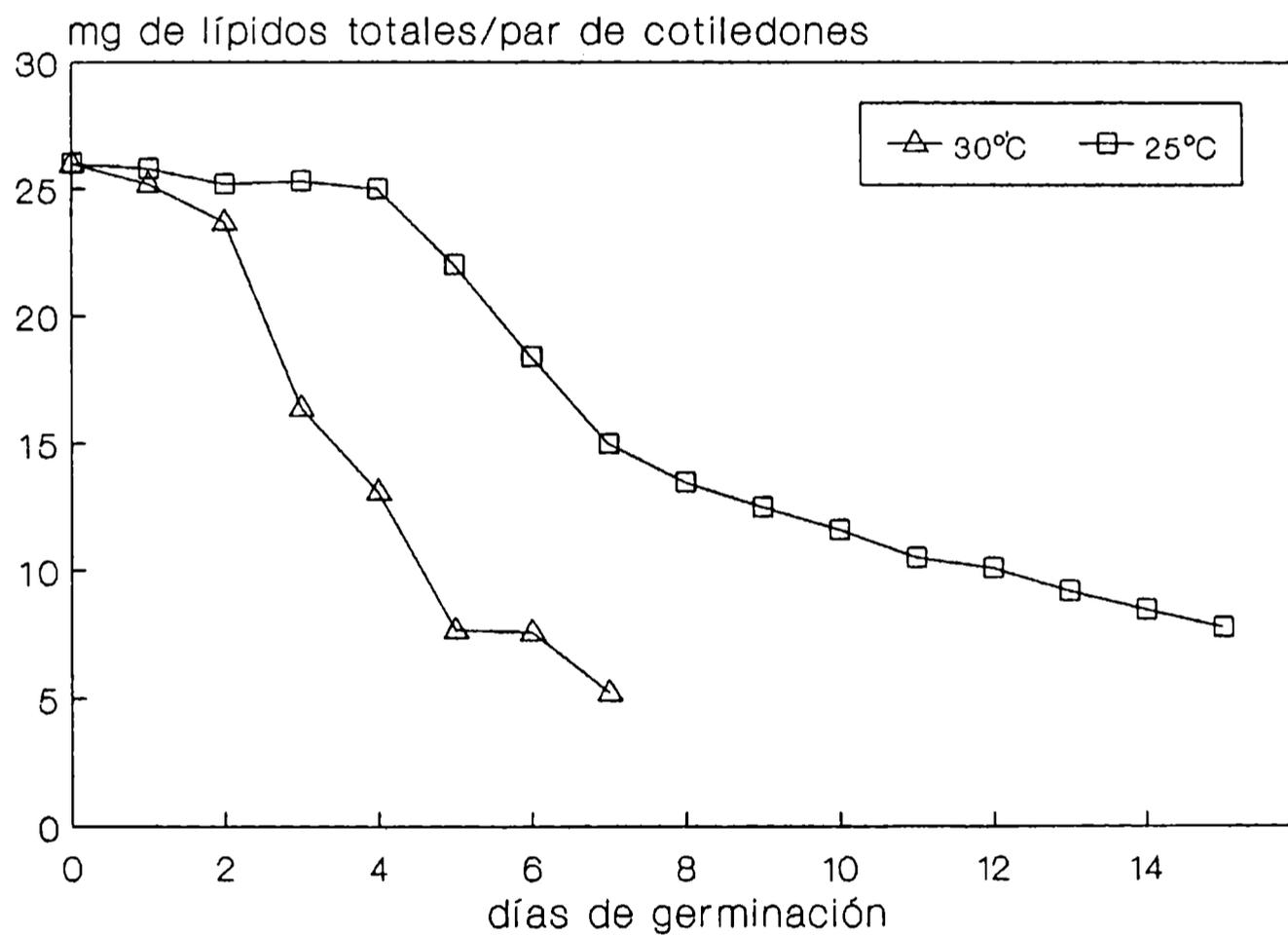


Fig. 9. Disminución del contenido de lípidos durante la germinación de semillas de girasol a 25°C y 30°C en la oscuridad

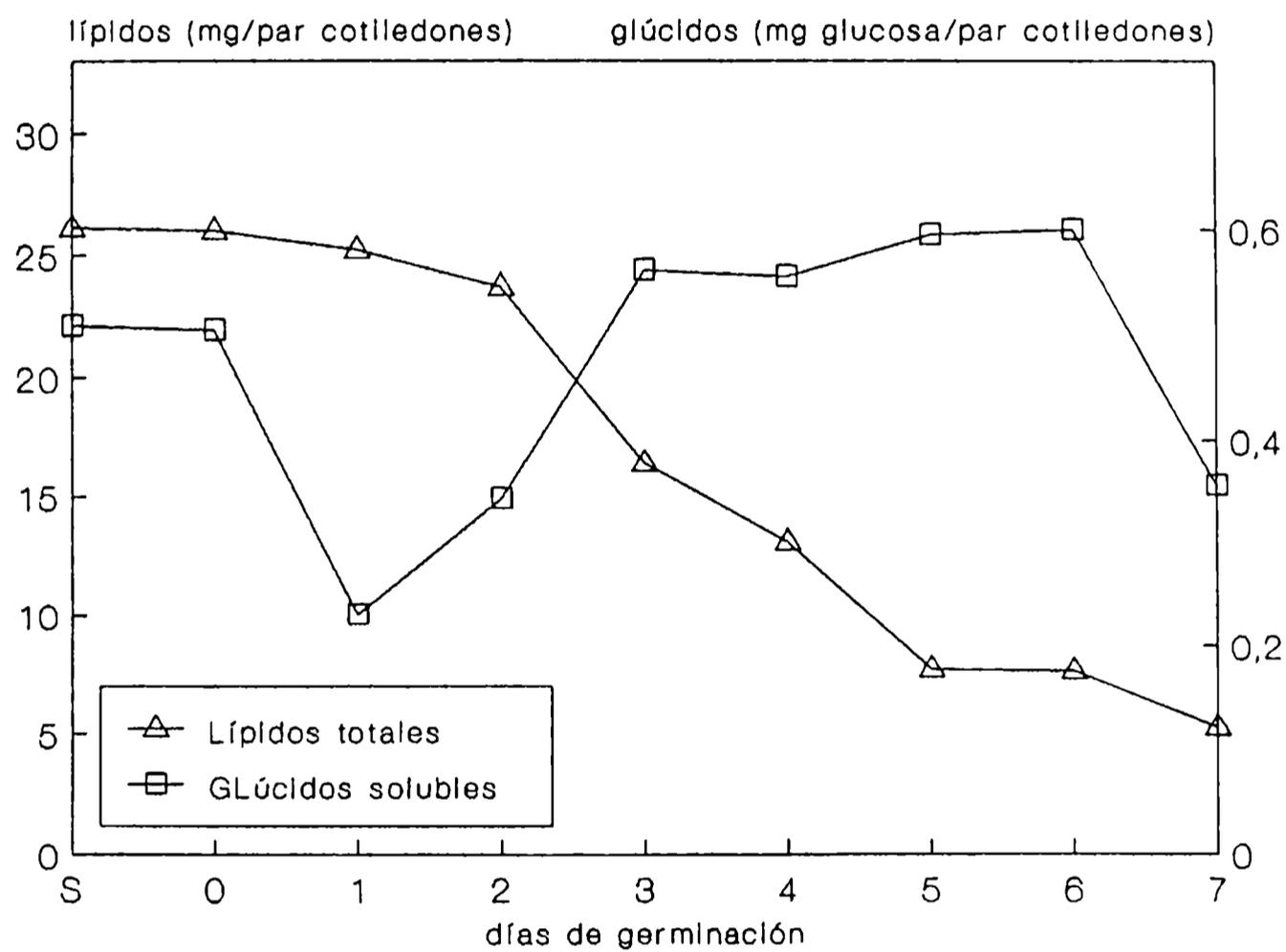


Fig. 10. Variación en el contenido de lípidos totales y de glúcidos solubles durante la germinación de semillas de girasol a 30°C en la oscuridad. (S: semillas secas)

4.3. MODIFICACION DE LA COMPOSICION RELATIVA DE TRIACILGLICERIDOS DURANTE LA LIPOLISIS *IN VIVO*

La figura 11 (a) muestra el cromatograma obtenido con una muestra de aceite de semillas sin germinar, en el que puede verse que la trilinoleína (LLL) es el componente mayoritario, seguido de la dilinoleiloleína (LLO), la dilinoleilpalmitina (LLP), la linoleiloleilpalmitina (LOP) y la linoleildiroleína (LOO).

Los perfiles cromatográficos correspondientes a la composición de triacilglicéridos de los días cero, dos y tres de la germinación (figs. 11 b, c y d) no parecen revelar cambios significativos con respecto al cromatograma obtenido con semillas sin germinar. No obstante, el análisis de las áreas relativas de los cromatogramas (Tabla 1) pone en evidencia un comportamiento diferencial del sistema lipolítico frente a los distintos triacilglicéridos. El triacilglicérido mayoritario (LLL), muestra una disminución relativa del 6% al cabo de tres días de germinación (velocidad máxima de lipólisis), en tanto que LOP y LLP descienden un 8% y un 20%, respectivamente; por el contrario, las áreas relativas de LLO y LOO se incrementan en un 13% y un 73%, respectivamente.

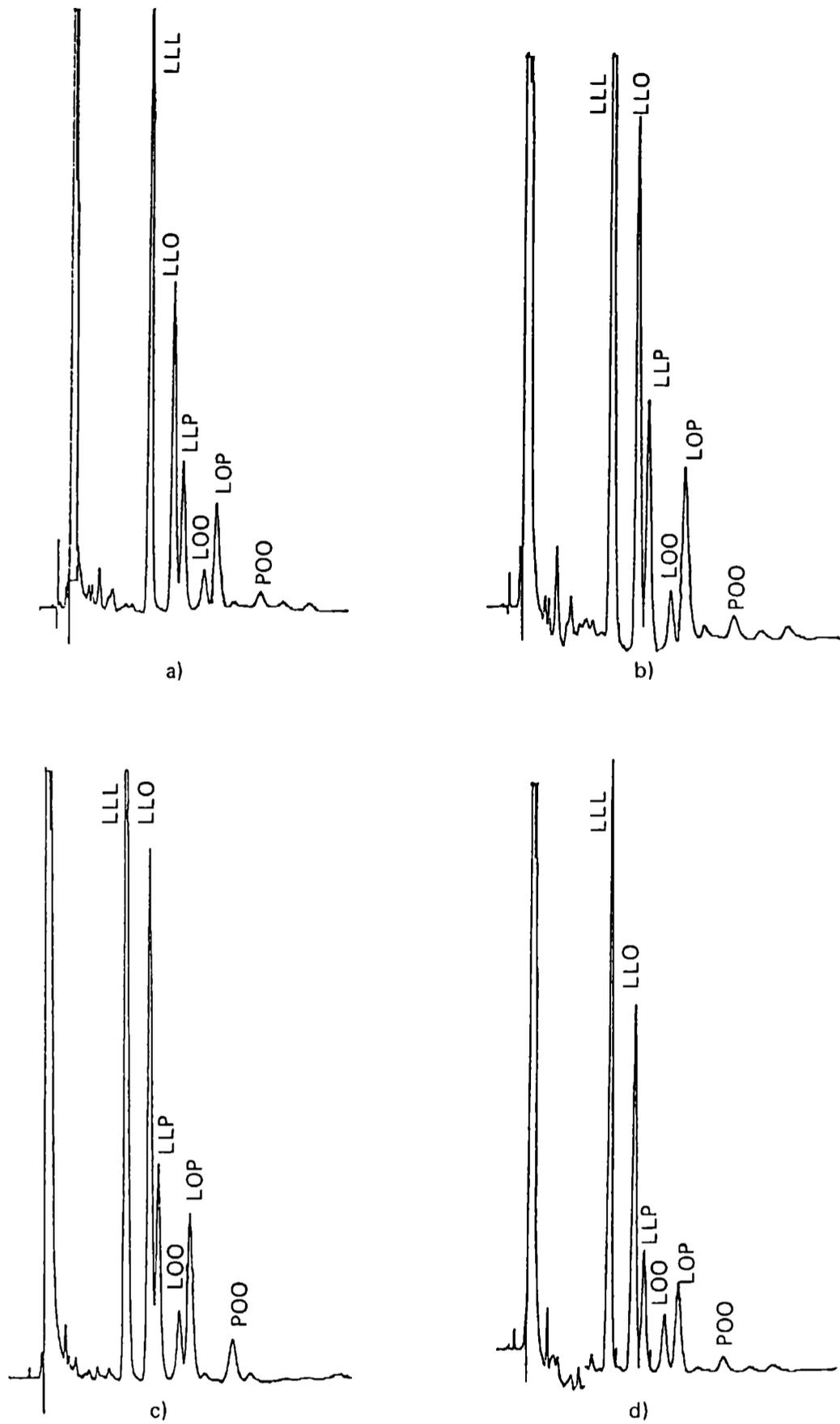


Fig. 11. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los principales triacilglicéridos presentes en el aceite de girasol. a) semillas sin germinar, b) día 0 (24 horas de imbibición), c) plántulas de 2 días de germinación y d) plántulas de 3 días de germinación.

Tabla 1. Cambios en la composición de triacilglicéridos durante la lipólisis *in vivo*. Los valores consignados corresponden a las áreas relativas de triacilglicéridos separados por HPLC. LLL: trilinoleína, LLO: dilinoleiloleína, LLP, dilinoleilpalmitina, LOO: linoleildiroleína, LOP: linoleiloleilpalmitina

TAG	LLL	LLO	LLP	LOO	LOP
semillas secas	46,1	26,8	13,2	3,3	10,6
día 0	46,1	26,2	13,1	3,7	10,9
día 2	44,7	28,2	12,0	4,2	10,6
día 3	43,3	30,3	11,0	5,7	9,7
% variación	-8	+13	-20	+73	-8

4.4. CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DURANTE LA LIPOLISIS *IN VIVO*

En la figura 12 se muestran los perfiles de ácidos grasos obtenidos por cromatografía gas-líquido (GLC) de los aceites de semillas sin germinar (a) y de los días cero (b), dos (c) y tres (d) de la germinación.

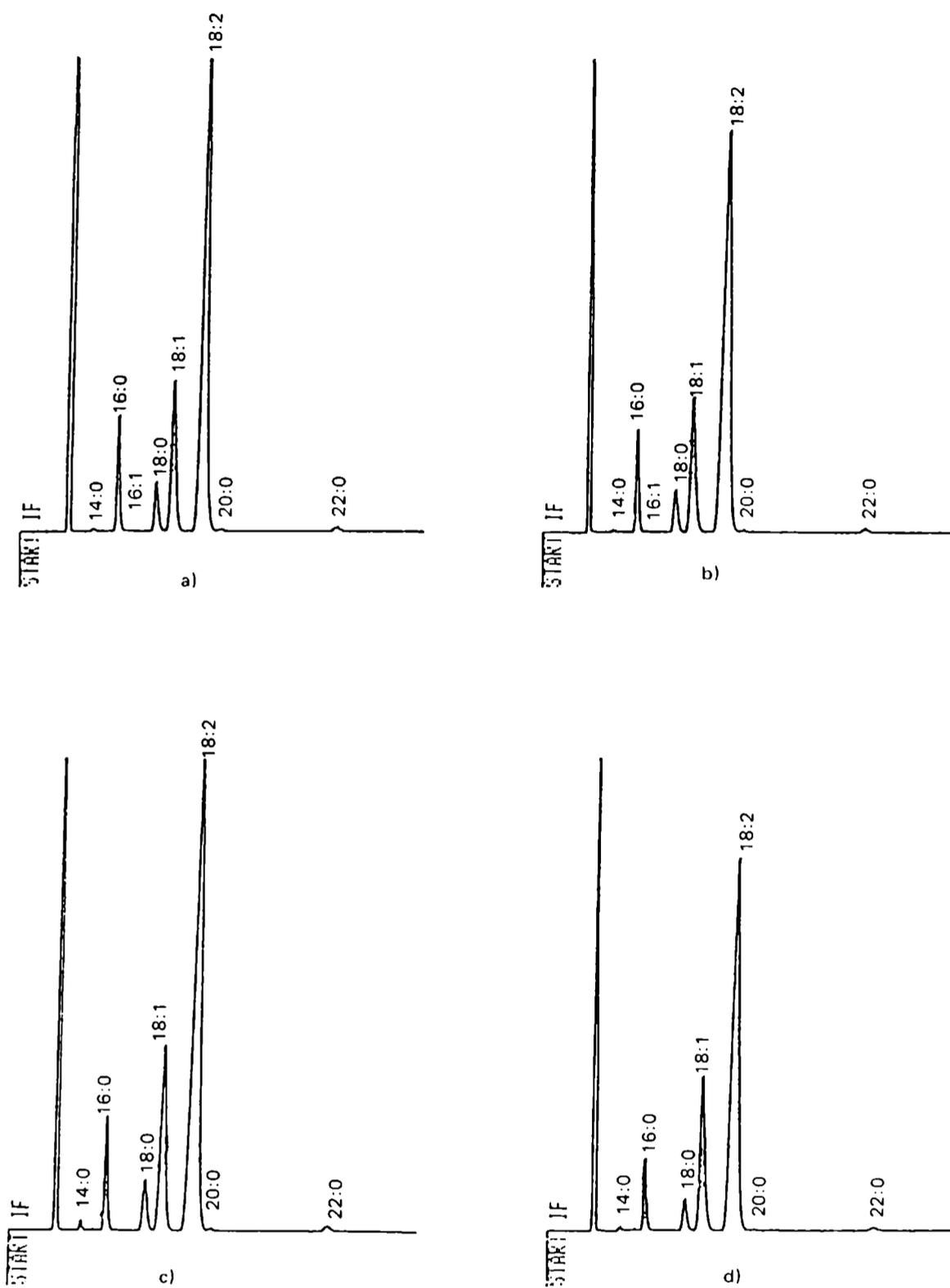


Fig. 12. Acidos grasos presentes en el aceite de girasol, analizados por cromatografía gas-líquido (GLC). a) semillas sin germinar, b) día cero (24 horas de imbibición), c) plántulas de dos días de germinación y d) plántulas de tres días de germinación.

La composición relativa de los ácidos grasos que componen los aceites separados por GLC se consignan en la Tabla 2.

TABLA 2. Variación en el contenido de ácidos grasos durante la lipólisis *in vivo*, analizados por cromatografía gas-líquido (GLC) de sus ésteres metílicos

semillas	ácidos grasos (áreas relativas)							
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:0	22:0
no ger-								
minadas	0,357	7,832	0,190	4,817	17,513	67,603	0,605	1,081
día 0	0,135	7,582	0,108	4,761	17,680	68,168	0,389	0,970
día 2	0,175	6,531	< 0,1	4,804	19,543	66,463	0,402	1,034
día 3	0,390	6,204	0,266	4,038	21,821	65,009	0,369	0,985
variación								
porcentual	+9	-21	+44	-16	+24	-4	-39	-9

Durante los primeros días de la germinación, las variaciones más significativas se registraron en los ácidos grasos saturados. Luego de 24 horas de imbibición (día 0) el porcentaje relativo del ácido mirístico disminuye en un 62%, el del araquídico en un 35,7%, el del behénico en un 10,26%, el del palmítico en un 3,2% y el del esteárico en un 1,16%. Al día 2 se advirtieron las siguientes disminuciones: mirístico (51%), araquídico (33,5%), palmítico (16,6%), behénico (4,34%) y esteárico (0,26%). Al tercer día de la germinación se observó la siguiente reducción relativa: araquídico (39%), palmítico (21%), esteárico (16%) y behénico (9%).

Por el contrario, los ácidos grasos no saturados -que constituyen el 85,3% del total- incrementan notoriamente su porcentaje relativo, a excepción del ácido linoleico (18:2). Este último disminuye sólo un 4% al tercer día de germinación, en tanto que los ácidos oleico (18:1) y palmitoleico (16:1) crecen en un 24% y 44% en el mismo período, respectivamente.

4.5. DETECCION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA DURANTE LA GERMINACION A pH 5,0, 7,0 Y 9,0.

Las experiencias realizadas para determinar actividad lipolítica en función del pH en semillas secas y en los distintos estadios de la germinación revelan que a los valores de pH ensayados no se manifiesta actividad lipolítica en semillas sin germinar, pero que la misma es detectable ya al primer día de la germinación, alcanzando sus valores

máximos entre los días dos y tres, para decrecer a partir del día cuatro y hacerse prácticamente nula al día siete (fig. 13).

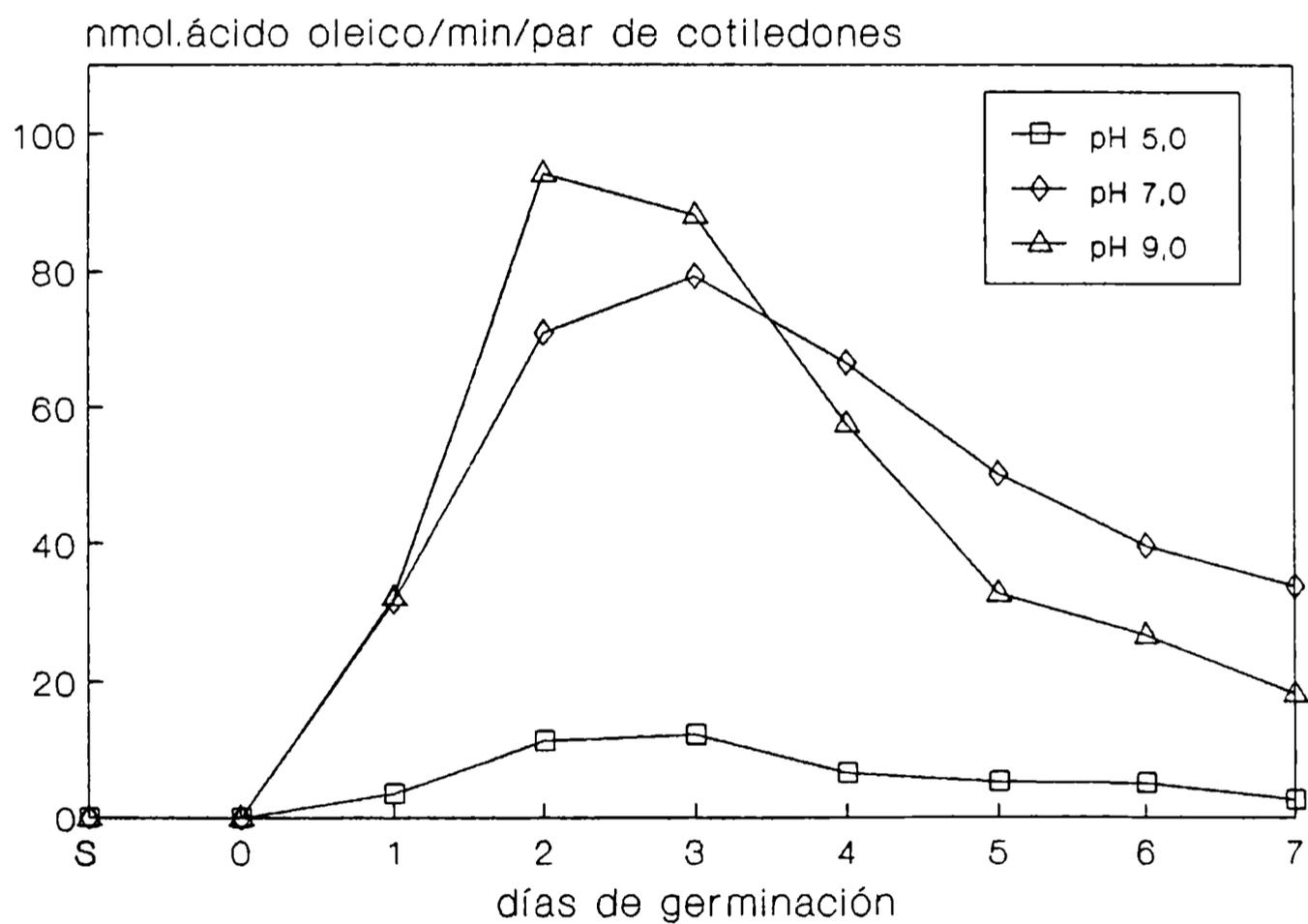


Fig. 13. Variación de la actividad lipolítica durante la germinación de semillas de girasol (30°C, en la oscuridad) a pH 5,0, 7,0 y 9,0 (S: semillas secas).

4.6. VARIACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA CON EL pH EN PLANTULAS DE 2 DIAS DE GERMINACION

La actividad lipolítica detectada a pH 7,0 y 9,0 es considerablemente mayor que a pH 5,0, lo que podía hacer suponer que el sistema era escasamente activo a pH ácido. Para comprobarlo se hicieron determinaciones de actividad con extractos de cotiledones de dos días de crecimiento (en los que se comprobó máxima velocidad de lipólisis), pero ampliando el rango de pH entre 2,9 y 9,9 (fig. 14), observándose la presencia de dos picos de máxima actividad a pH 3,7 y 8,5.

4.7. VARIACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA DURANTE LA GERMINACION A LOS VALORES DE pH OPTIMO

La figura 15 muestra los resultados obtenidos al determinar la actividad lipolítica a pH 3,7 y 8,5 durante la germinación, pudiendo comprobarse que ambos perfiles están prácticamente superpuestos.

De acuerdo a los resultados hasta aquí obtenidos, en las experiencias posteriores se utilizaron cotiledones de plántulas de día 2 y se trabajó a los dos rangos de pH de máxima actividad.

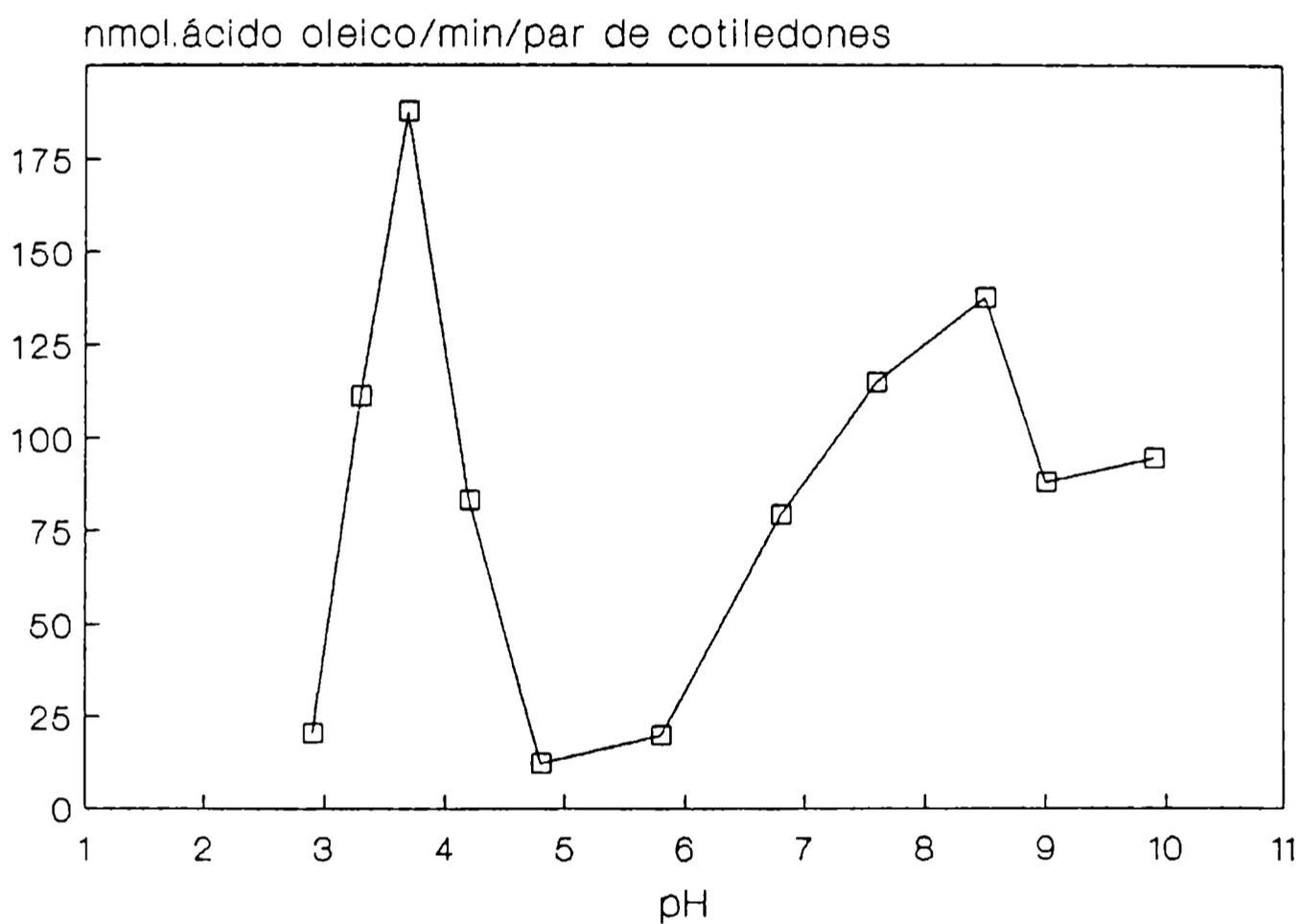


Fig. 14. Variación de la actividad lipolítica en función del pH de un extracto de cotiledones de plántulas de girasol de 2 días de crecimiento (30°C, en la oscuridad)

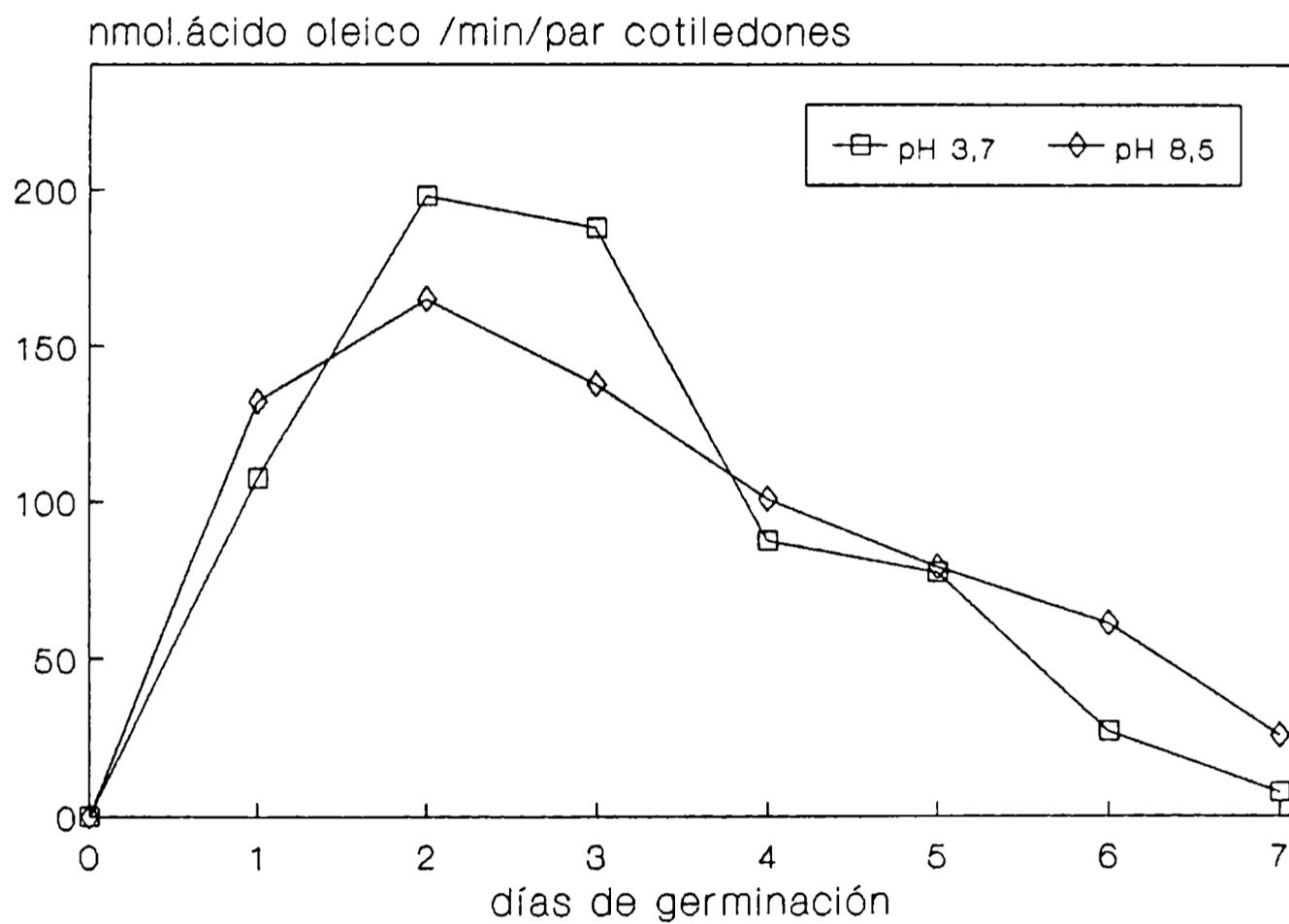


Fig. 15. Variación de la actividad lipolítica durante la germinación de semillas de girasol (30°C, en la oscuridad) a los valores de pH de máxima actividad

4.8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA EN LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CENTRIFUGACION DE LOS EXTRACTOS DE COTILEDONES.

Los resultados obtenidos al determinar actividad lipolítica en cada una de las tres fracciones separadas por centrifugación de los extractos de cotiledones de plántulas de dos días de crecimiento, muestran que tanto el sobrenadante como la fracción particulada resuspendida no revelan actividad lipolítica a ningún valor de pH, utilizando aceite de girasol como sustrato. Por otra parte, la capa grasa, que contiene los cuerpos lipídicos, manifiesta actividad lipolítica (fig. 16) con dos máximos a valores de pH comprendidos entre 3,0-3,7 (pH óptimo 3,2) y 8,3-9,0 (pH óptimo 8,6).

Las fracciones provenientes de semillas sin germinar no evidencian actividad lipolítica a ningún valor de pH.

4.9. ACTIVIDAD LIPOLITICA EN RELACION CON LA TEMPERATURA

El comportamiento térmico del sistema lipolítico se muestra en la figura 17. A pH 8,6 la actividad lipolítica se incrementa hasta alcanzar un máximo entre 65°C y 75°C (3,4 veces el valor registrado a 37°C) y luego decae, obteniéndose a 90°C valores similares a los observados a 37°C. En cambio, a pH 3,2 la actividad lipolítica alcanza su valor máximo a 85°C (3,8 veces la actividad registrada a 37°C), reteniendo aún un 63% de la actividad máxima a los 90°C.

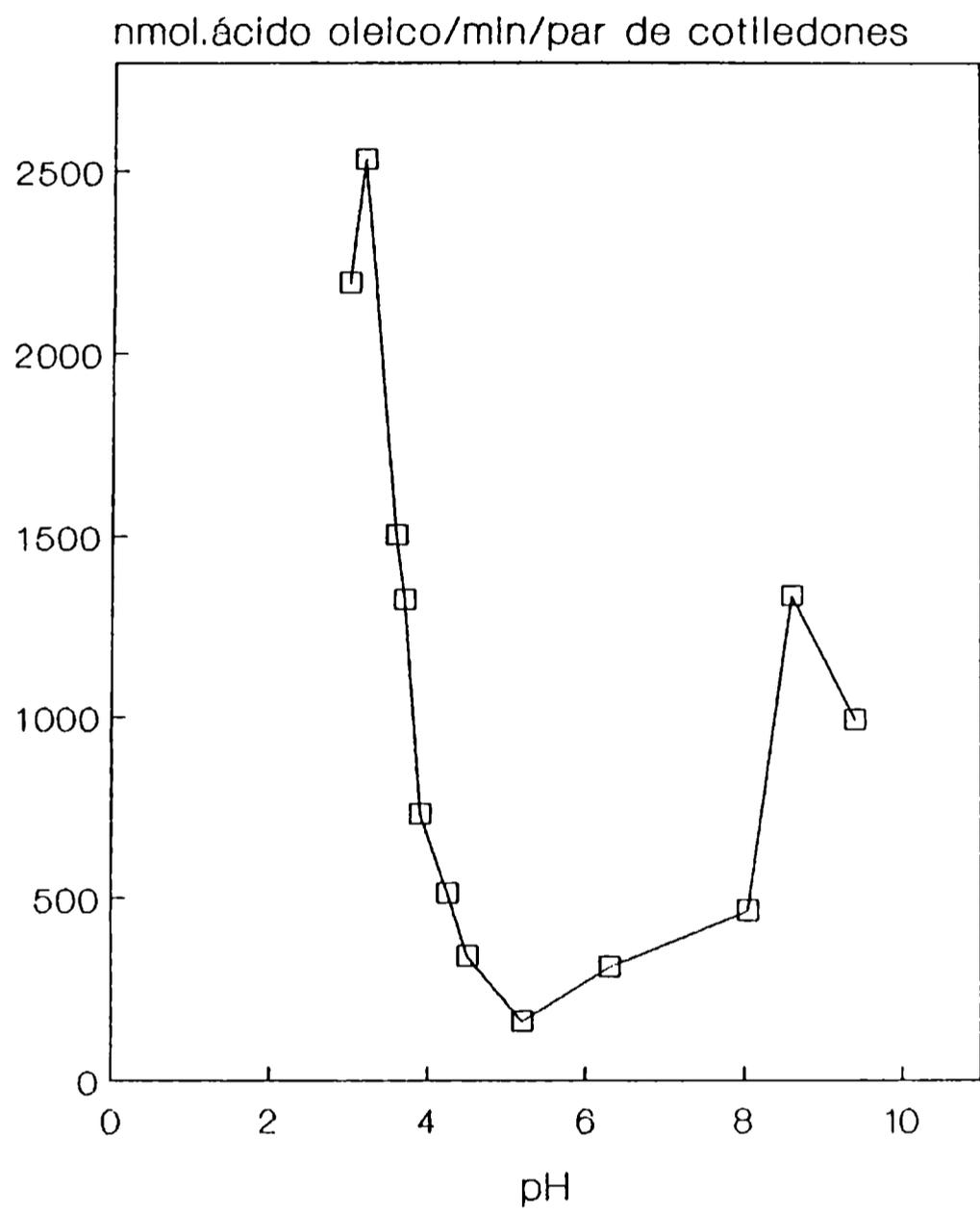


Fig. 16. Variación de la actividad lipolítica en función del pH (37°C) en cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol de dos días de germinación

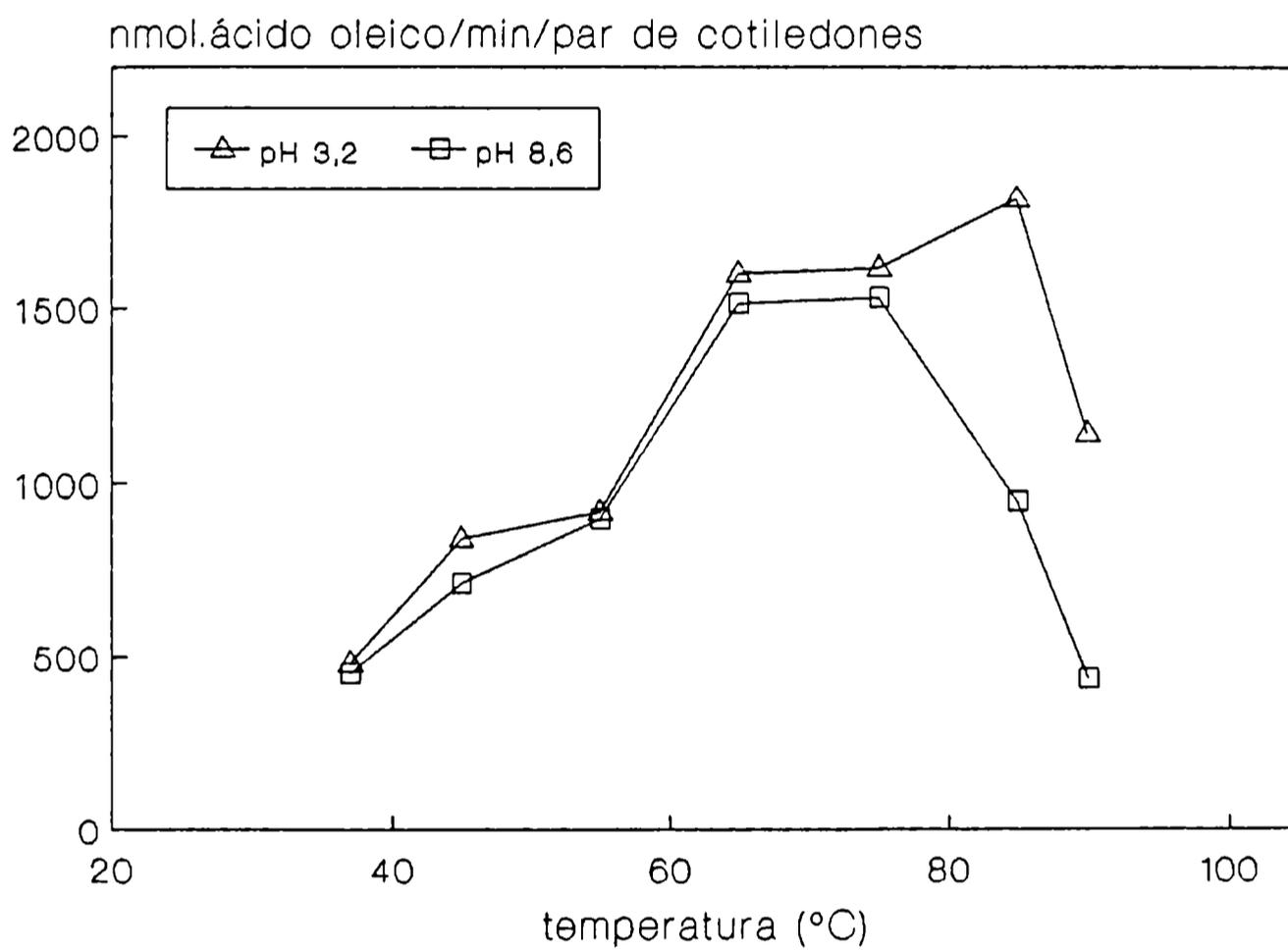


Fig. 17. Variación de la actividad lipolítica en función de la temperatura en cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol de dos días de germinación

4.10. CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE TRIACILGLICERIDOS DURANTE LA LIPOLISIS *IN VITRO* A LOS VALORES DE pH OPTIMO

Los resultados obtenidos al analizar por HPLC la composición de los triacilglicéridos residuales mayoritarios luego de 20 minutos de reacción autolítica se muestran en la tabla 3. Las áreas relativas obtenidas no manifiestan diferencias significativas en el comportamiento del sistema lipolítico a ambos valores de pH luego de 20 minutos de reacción.

Tabla 3. Composición de triacilglicéridos luego de 20 minutos de reacción autolítica en plántulas de dos días de germinación a ambos valores de pH óptimo. LLL: trilinoleína, LLO: dilinoleiloleína, LLP, dilinoleilpalmitina, LOO: linoleildioleína, LOP: linoleiloleilpalmitina

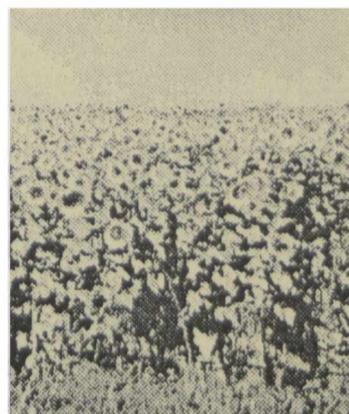
TAG	LLL	LLO	LLP	LOO	LOP
pH 3,2	38,9	33,5	8,7	8,1	10,8
pH 8,6	37,5	35,3	8,8	7,9	10,4

4.11. EFECTO DE IONES, INHIBIDORES ENZIMATICOS Y DETERGENTES SOBRE EL SISTEMA LIPOLITICO

Los resultados de la acción de iones mono y divalentes, detergentes e inhibidores enzimáticos sobre la actividad lipolítica (pH 3,2 y 8,6; 37°C) se consignan en la Tabla 4. En las concentraciones ensayadas (1-10 mM) la mayoría de los iones deprimen la actividad lipolítica, así como también lo hacen el EDTA, el PMSF y el ion Hg^{2+} . Los dos detergentes ensayados exhiben marcadas diferencias: el SDS provoca una fuerte caída de la actividad lipolítica (mayor a pH alcalino), en tanto que el Tritón X-100 incrementa notoriamente la actividad a ambos valores de pH.

TABLA 4. Efecto de iones, detergentes e inhibidores enzimáticos sobre la actividad lipolítica.

Agente químico	Concentración	Actividad lipolítica relativa	
		pH 3,2	pH 8,6
Nada		100%	100%
EDTA	1 mM	53	27
	10 mM	27	27
CaCl ₂	1 mM	93	83
	10 mM	40	55
(CH ₃ COO) ₂ Cu	1 mM	32	68
	10 mM	94	40
MgCl ₂	1 mM	74	63
	10 mM	59	48
NaCl	1 mM	91	53
	10 mM	104	54
KCl	1 mM	34	73
	10 mM	18	84
HgCl ₂	0,1 mM	58	65
	1 mM	44	59
PMSF	1 mM	37	62
Tritón X-100	1 %	155	140
SDS	1 %	55	19



5. Discusión

Durante la germinación, la primera etapa de degradación de los triacilglicéridos de reserva almacenados en las semillas es mediada por lipasas (EC 3.1.1.3), pero hasta el presente es muy reducido el número de lipasas vegetales que han sido aisladas y purificadas; por otra parte, en la mayoría de las especies estudiadas tampoco se conoce si la lipólisis obedece a la acción de una o más enzimas.

A pesar de que las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) poseen un elevado contenido en aceites de reserva (a tal punto que representan una de las fuentes más importantes de aceite comestible en todo el mundo), llama la atención la casi inexistente información disponible sobre la presencia de lipasas en esta especie.

Huang y Moreau (1978) son los primeros en señalar la existencia de actividad lipolítica en plántulas de girasol de cuatro días, pero sobre N-metilindoxilmiristato, un sustrato inespecífico para lipasas, ya que también puede ser hidrolizado por monoacilglicerolhidrolasas. Efectivamente, poco tiempo después Fusseder y Theimer (1984) comprueban la existencia de una monoacilglicerolhidrolasa con máxima actividad a pH 8,5 sobre el mismo sustrato, que está presente en glioxisomas aislados de semillas en maduración, y simultáneamente Huang (1984) afirma que los cuerpos lipídicos aislados tanto de semillas en dormancia como germinadas son incapaces de sufrir autólisis. Más recientemente, Chapman (1987) fracasa en su intento de aislar una lipasa de girasol, limitándose al hallazgo de un inhibidor de lipasas

inespecífico, una proteína de peso molecular cercano a los 70 kDa.

Ante esta carencia de información, la discusión de los resultados obtenidos durante la ejecución del presente trabajo, expuesta a continuación, pretende realizar un primer aporte al conocimiento del sistema lipolítico responsable de la movilización de los triacilglicéridos de reserva de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.).

1. La movilización de las reservas lipídicas durante la germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871) en la oscuridad resulta ser un proceso extremadamente sensible a las condiciones térmicas utilizadas: a 25°C se requieren 15 días para que el contenido de lípidos de reserva disminuya a un 30% del valor inicial, en tanto que a 30°C ese valor se alcanza a los 5 días de comenzada la germinación (fig. 9).
2. La variación del contenido de glúcidos solubles de las plántulas de girasol se correlaciona bien con la degradación de los lípidos de reserva en las condiciones en que fueron germinadas las semillas (fig. 10), ya que aquél desciende significativamente al cabo del primer día de germinación (período en el que los aceites -principal reserva energética- aún no han comenzado a ser movilizados), pero rápidamente recupera los valores iniciales a favor de la degradación de los lípidos, que proveen los ácidos grasos necesarios para la etapa inicial de la gluconeogénesis. Cuando la mayor parte de los triacilglicéridos de reserva han sido hidrolizados

(día 7), el aporte de ácidos grasos a la gluconeogénesis glioxisomal es insuficiente para cubrir los requerimientos glucídicos cada vez mayores de la plántula y, como consecuencia de ello, el contenido de glúcidos solubles vuelve a caer, al no existir aporte de origen fotosintético.

3. La actividad lipolítica se detecta únicamente durante la germinación y no se evidencia en semillas en dormancia (figs. 13 y 15). Este comportamiento es similar al observado en maní (Huang y Moreau, 1978), nabo (Theimer y Rosnitschek, 1978; Lin y Huang, 1983), maíz (Lin et al., 1983) y mostaza (Lin y Huang, 1983) pero es diferente a los resultados obtenidos con semillas de ricino (Muto y Beevers, 1974) o de *Brassica campestris* (Villalobos et al. 1987); en estos dos casos una "lipasa ácida" ya está presente en semillas sin germinar y su actividad decae antes que los lípidos almacenados comiencen a ser degradados, en tanto que una segunda lipasa ("lipasa alcalina") aparece durante la germinación.
4. Aún cuando la detección de actividad lipolítica *in vitro* (extractos de cotiledones) no necesariamente refleja lo que ocurre en el sistema celular intacto, se comprueba una aceptable correlación entre la caída de los lípidos -con una fuerte pendiente a partir del segundo día- (fig. 10) y la actividad lipolítica *in vitro*, que es máxima entre los días 2 y 3 de la germinación (fig. 13). No obstante, los elevados valores de actividad hallados luego del primer día de germinación no guardan relación

con la pequeña disminución manifestada en el contenido de lípidos de reserva. Este hecho podría tener su explicación en la desorganización que provoca en el sistema lipolítico la obtención del homogenato, lo que permitiría la interacción de la enzima con un eventual cofactor o la anulación del efecto de algún inhibidor.

5. La velocidad de hidrólisis en las reacciones *in vitro* se ve incrementada por la presencia de un solvente orgánico, con agitación continua del medio de reacción. Este último hecho ya había sido observado por Lee y Hammond (1990), quienes señalan que la hidrólisis de diversos aceites vegetales utilizando cariopses de avena descascarados se ve acelerada en las condiciones mencionadas.
6. La actividad del sistema lipolítico en los extractos crudos de cotiledones de plántulas de girasol exhibe dos valores máximos: uno a pH 3,7 y otro a pH 8,5 (fig. 14), comportamiento que resulta diferente al de la mayoría de las lipasas de semillas hasta ahora estudiadas. Con algunas excepciones como *Ricinus communis* (Ory, 1980), *Brassica campestris* (Villalobos, 1987) y *Lupinus alba* (Sanz y Olias, 1990), que contienen una "lipasa ácida" en semillas sin germinar, la mayoría de las lipasas conocidas, tanto de semillas en dormancia como germinadas, muestran máxima actividad a pH alcalino (Whitenberg y Pao, 1980; Huang y Moreau, 1978).
7. A pesar de que la actividad lipolítica *in vitro* es máxima a valores de pH no fisiológicos, la actividad a pH neutro en extractos de cotiledones (aproximadamente 70 nmoles de

ácido oleico por minuto por par de cotiledones a pH 7,0 en plántulas de dos días de crecimiento, fig. 13) es lo suficientemente alta como para explicar la lipólisis *in vivo*, dado que este valor excede al de la máxima velocidad de hidrólisis de los triacilglicéridos (alrededor de 17 nmoles de ácido oleico por minuto por par de cotiledones entre los días 2 y 3 de la germinación, fig. 10).

8. De las tres fracciones obtenidas por centrifugación del extracto crudo de cotiledones de plántulas de girasol, la única que manifiesta actividad lipolítica es la capa grasa, con un perfil de pH (fig. 16) equivalente al obtenido con el extracto crudo, lo que demuestra que en la capa grasa (que contiene los cuerpos lipídicos) se recupera el sistema lipolítico completo.
9. Los cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol son capaces de hidrolizar los triacilglicéridos endógenos ("autólisis"), hecho que es interpretado como indicador de la presencia de una lipasa asociada a la membrana de aquellos. En algunas especies, como ocurre en ricino (Ory, 1960), los cuerpos lipídicos aislados exhiben autólisis sin necesidad de aditivos ni de agitación; sin embargo en girasol se requiere el agregado de un solvente orgánico (isooctano) y agitación continua para que la reacción tenga lugar, lo que podría explicar los resultados negativos obtenidos por Huang (1984) en ese sentido.

10. La autólisis de los triacilglicéridos de los cuerpos lipídicos se ve estimulada con el aumento de la temperatura, siendo máxima a 85°C a pH ácido y a 75°C a pH alcalino (fig. 17). Si bien no existe información acerca de la temperatura óptima registrada en casos de autólisis, los sistemas lipolíticos de otras semillas (Daood y Al-Any, 1988; Lee y Hammond, 1990; Sanz y Olias, 1990) muestran temperaturas óptimas considerablemente menores.
11. La presencia de iones calcio y magnesio deprimen la actividad autolítica, al igual de lo que ocurre con las lipasas de maíz (Lin *et al.*, 1983), nabo (Theimer y Roenitschek, 1978) y con la "lipasa alcalina" de ricino (Maeshima y Beevers, 1985). Sin embargo, estas lipasas resultan estimuladas por el agregado de iones monovalentes, lo que no sucede en el caso de los cuerpos lipídicos de girasol (Tabla 4).
12. La actividad autolítica se ve incrementada por la presencia de Tritón X-100 al 1% en el medio de reacción, tanto a pH ácido como alcalino (Tabla 4), lo que podría indicar que en estas condiciones se favorece la solubilización de la o las enzimas o bien se logra un mejor contacto entre ellas y el sustrato. Este efecto contrasta con el observado en lipasas aisladas de maíz (Lin *et al.* 1983), nabo (Lin y Huang, 1983), ricino (Maeshima y Beevers, 1985) y pino (Hammer y Murphy, 1993), cuya acción es fuertemente inhibida en presencia de detergentes.

13. Los resultados obtenidos luego de la adición de inhibidores enzimáticos a la suspensión de cuerpos lipídicos (Tabla 4) no permiten emitir una opinión válida acerca del mecanismo hidrolítico de las enzimas responsables de la degradación de los triacilglicéridos internos, ya que la actividad es deprimida tanto por los inhibidores de hidrolasas cisteínicas (Hg^{2+}), como serínicas (PMSF) o de metalohidrolasas (EDTA).
14. El 85,3% de los ácidos grasos que componen los triacilglicéridos presentes en semillas sin germinar son insaturados, representados principalmente por los ácidos linoleico y oleico. Después de tres días de germinación, el análisis de ácidos grasos por GLC muestra que la composición relativa de ácido linoleico decrece sólo un 4% y que la del ácido oleico se incrementa notablemente (Tabla 2). Esta información es compatible con los resultados obtenidos por HPLC de triacilglicéridos (Tabla 1), ya que LLL decrece después de tres días de germinación (6%), mientras LLO y LOO se incrementan en el mismo período (13% y 73%, respectivamente), revelando que el sistema lipolítico demuestra menor afinidad por los triacilglicéridos con alto contenido de ácido oleico. Por otra parte, la composición relativa de ácidos grasos saturados, aunque representa la fracción minoritaria, decrece notablemente en el mismo período (Tabla 2), sugiriendo que el sistema lipolítico de girasol muestra mayor afinidad hacia este tipo de ácidos grasos, como

ocurre en otras lipasas de plantas superiores (Daood y Al-Ani, 1986).

15. La existencia de dos zonas de pH de máxima actividad en el sistema lipolítico de girasol podría hacer suponer la presencia de al menos dos lipasas, como se ha comprobado en ricino (Hills y Beevers 1987). Sin embargo, los resultados obtenidos al ensayar el sistema lipolítico a ambos valores de pH óptimo parecen descartar esta posibilidad: a) la actividad lipolítica durante la germinación de semillas de girasol muestra perfiles similares (fig. 15), b) el efecto de iones, inhibidores enzimáticos y detergentes sobre la actividad autolítica no revela diferencias notorias (Tabla 4), c) el comportamiento térmico es básicamente similar (fig. 17) y d) la variación de la composición relativa de los triacilglicéridos durante la lipólisis es totalmente coincidente (Tabla 3).



6. Conclusiones

En el presente trabajo se han estudiado las propiedades del sistema enzimático responsable de la movilización de los lípidos de reserva en semillas de una variedad cultivada de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. ACA 871).

Los resultados obtenidos constituyen así un aporte efectivo al muy limitado conocimiento que se posee acerca de las lipasas de plantas superiores, dado que el número de especies estudiadas hasta la fecha con tal propósito apenas supera la veintena. En particular, la información que se suministra sobre el sistema lipolítico presente en semillas de girasol representa el primer estudio consistente que en tal sentido se ha realizado sobre esta especie.

Con las limitaciones que impone a esta afirmación la escasa actividad registrada en este campo de la bioquímica vegetal, el sistema lipolítico del girasol muestra características distintivas con respecto a las demás lipasas de semillas conocidas. La actividad lipolítica no se detecta en semillas en dormancia, pero se manifiesta tempranamente en el curso de la germinación, con máximos a valores de pH francamente ácido (pH 3,2) y ligeramente alcalino (pH 8,6), aunque a pH neutro la enzima es lo suficientemente activa como para atribuirle la responsabilidad de la degradación de los lípidos de reserva durante la germinación, en base a la capacidad demostrada para degradar los triacilglicéridos endógenos a través de las experiencias de autólisis.

El comportamiento del sistema lipolítico del girasol frente al agregado de iones, inhibidores de hidrolasas y detergentes tampoco es comparable al del resto de las lipasas

estudiadas: los iones monovalentes y divalentes más comunes no afectan o deprimen la actividad lipolítica, la que es anulada por la presencia de inhibidores de hidrolasas cisteínicas, serínicas y de metaloenzimas; con respecto a los detergentes, mientras el SDS provoca una franca inhibición, el Tritón X-100 estimula notoriamente la actividad.

El análisis de los triacilglicéridos residuales por HPLC y el de los ácidos grasos liberados en la lipólisis por GLC han permitido conocer la especificidad que manifiesta el sistema lipolítico de girasol frente a su sustrato endógeno, con marcada preferencia hacia los ácidos grasos saturados y hacia triacilglicéridos con bajo contenido en ácido oleico.

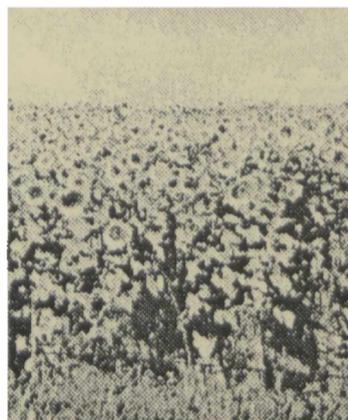
Por otra parte, resulta realmente atípica la elevada resistencia térmica que manifiesta el sistema a ambos valores de pH de máxima actividad: a pH ácido la mayor actividad lipolítica se alcanza a 85°C y a pH alcalino a 75°C.

Finalmente, en base al comportamiento equivalente observado a ambos valores de pH óptimo durante la germinación (donde los perfiles son superponibles), así como frente al agregado de iones, detergentes e inhibidores, al comparativamente igual nivel de termoestimulación y al exacto patrón de especificidad en cuanto a los triacilglicéridos residuales, no resulta aventurado suponer que se pueda estar en presencia de una única lipasa con dos máximos de actividad en diferentes zonas de pH. Su confirmación requeriría el aislamiento de la enzima, empresa que ya ha sido intentada sin éxito por otros investigadores (Chapman, 1987).

Por estar vinculada a los cuerpos lipídicos, el aislamiento de la lipasa ofrece los inconvenientes típicos de las enzimas asociadas a membranas. Teniendo en cuenta el efecto estimulante que sobre la actividad ejerce el Tritón X-100, detergente de elección para la extracción de proteínas de membranas, la estrategia experimental para un intento de aislamiento y purificación de la lipasa de girasol seguirá probablemente ese camino.

Por último, correspondería efectuar un breve comentario sobre las eventuales ventajas que podría ofrecer el uso de la lipasa de girasol en procesos tecnológicos. Por una parte, la existencia de dos zonas de actividad máxima, una a pH ácido y otra a pH alcalino (sin descartar la actividad que, aunque menor, manifiesta a pH neutro) la transforma en un reactivo muy versátil en procesos de lipólisis en los que el pH del medio de reacción sea una condición restrictiva. Por otra parte, la elevada resistencia térmica que manifiesta el sistema lipolítico de girasol lo convierte en un promisorio biorreactor lipásico natural, en especial para la degradación de triacilglicéridos con elevado contenido en ácidos grasos saturados, que requieren de altas temperaturas para poder obtenerlos en estado líquido. Finalmente, dada la especificidad que demuestra hacia determinados triacilglicéridos y ácidos grasos puede constituir una herramienta útil en procesos de interesterificación de grasas y aceites.





**7. Referencias
bibliográficas**

- Aizono, Y, M. Funatsu, K. Hanashi, M. Inamasu y M. Yamaguchi (1971) "Biochemical studies on rice bran lipase: chemical properties", *Agric. Biol. Chem.* 35: 1973-9.
- Aizono, Y, M. Funatsu, M. Fujiki, y M. Watanabe (1976) "Purification and characterization of rice bran lipase II", *Agric. Biol. Chem.* 40: 317-24
- Akhtar, M.W., N. Kausar y M.N. Nawazish (1981) "Phosphatide acyl-hydrolase and triglyceride acyl-hydrolase activities in the primary roots of *Cucumis melo* seeds", *Pak. J. Scientific Research* 33: 102-9
- Barron, L.J.R. y G. Santa-María (1991) "Aplicación de la cromatografía de alta eficacia al análisis de grasas y aceites de origen animal y vegetal", *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 31: 66-79
- Baxter, E.D. (1984) "Recognition of two lipases from barley and green malt", *J. Inst. Brew.* 90: 277-81
- Benzonana, G. y P. Desnuelle (1968) "Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase", *Biochim. Biophys. Acta* 164: 47-58
- Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim y U. Menge (1990) "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase", *Nature* 343: 767-70
- Brockman, H.L. (1984) "General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches", en "*Lipases*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 3-46

- Brockman, H.L., J.H. Law y F.J. Kézdy (1973) "Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads", *J. Biol. Chem.* 248: 4965-70
- Brown, W.J., A.A. Belmonte y P. Melius (1977) "Effects of divalent cations and sodium taurocholate on pancreatic lipase activity with gum arabic-emulsified tributyrilglycerol substrates", *Biochim. Biophys. Acta* 486: 313-21
- Chabane-Ben Hamida, J. y P. Mazliak (1985) "Les lipase des graines oléagineuses", *Ann. Biol.* 24: 201-32
- Chapman, G.W. (1987) "A proteinaceous competitive inhibitor of lipase isolated from *Helianthus annuus* seeds", *Phytochemistry* 26: 3127-31
- Ching, T.M. (1968) "Intracellular distribution of lipolytic activity in the female gametophyte of germinating Douglas fir seeds", *Lipids* 3: 482-8
- Daood, H. y H. Al-Ani (1986) "Detection of fatty acid and free fatty acid composition of safflower seeds during germination by gas-liquid chromatography (GLC)", *Acta Alimentaria* 15: 319-28
- Daood, H. y H. Al-Ani (1988) "Biochemical properties of safflower lipase", *Acta Alimentaria* 17: 127-39
- Diez, T.A. y J.F. Mata-Segreda (1985) "Castor bean acid lipase catalysed hydrolysis of tryacylglycerols does not involve C-2 C-1,3 trans-acylation", *Phytochemistry* 24: 3047-8

- Dong, M.W. y J.L. Di Cesare (1983) "Improved separation of natural oil triglycerides by liquid chromatography using columns packed with 3- μ m particles", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 60: 788-91
- Drapron, R., N.X. Anh, B. Launay y A. Guilbot (1969) "Development and distribution of wheat lipase activity during the course of germination", *Cereal Chem.* 46: 647-55.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956) "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.* 28: 350-6
- Entressangles, B. y P. Desnuelle (1968) "Action of pancreatic lipase on glyceride molecules on an isotropic system", *Biochim. Biophys. Acta* 159: 285-95
- Fernandez, D.E. y L.A. Staehelin (1987) "Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells?", *Plant Physiol.* 85: 487-96
- Fox, P.P. (1982) "Exogenous enzymes in dairy technology", en "Use of enzymes in food technology" (P. Dupuy, ed.), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 135-57
- Fujiki, Y., Y. Aizono y M. Funatsu (1978 a) "Chemical properties of major subunit of rice bran lipase", *Agric. Biol. Chem.* 42: 599-606
- Fujiki, Y., Y. Aizono y M. Funatsu (1978 b) "Characterization of minor subunit of rice bran lipase", *Agric. Biol. Chem.* 42: 2401-2

- Funatsu, M., Y. Aizono, K. Hayashi, M. Watanabe y M. Eto (1971) "Biochemical studies on rice bran lipase: purification and physical properties", *Agric. Biol. Chem.* 35: 734-42.
- Fusseder A. y R.R. Theimer (1984) "Lipolytic and glyoxysomal enzyme activities in cotyledons of ripening and germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds", *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 403-11
- Ginzo, H.D. (1980) "Fisiología de la germinación", en "*Fisiología Vegetal*" (E.M Sívori, E.R. Montaldi y O. H. Caso, dirs.), Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pág. 623
- González Baró, M. del R. (1991) "Composición y metabolismo de lípidos en *Macrobrachium borellii* (Crustacea-Decapoda)", Tesis, Facultad de Ciencias Naturales, Univ. Nac. de La Plata, pág. 46
- Green, J.R. (1890) *Proc. Roy. Soc.* 48: 370 (citado por Taylor, A.E., 1908)
- Haley, D.E. y J. F. Lyman (1921) "Castor bean lipase, its preparation and some of its properties", *J. Amer. Chem. Soc.* 43: 2664-70
- Hammer, M.F y J.B. Murphy (1993) "Properties of the lipid body lipase of *Pinus edulis* and electrophoretic purification of its 64 kDa subunit", *Physiol. Plant.* 87: 39-44
- Hassanien, F.R. y K.D. Mukherjee (1986) "Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63: 893-7

- Hills, M.J. y D.J. Murphy (1988) "Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons", *Biochem. J.* 249: 687-93
- Hills, M.J. y H. Beevers (1987) "Ca⁺⁺ stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies", *Plant Physiol.* 84: 272-8
- Huang, A.H.C. (1984) "Plant lipases", en "*Lipases*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 419-42
- Huang, A.H.C. (1992) "Oil bodies and oleosins in seeds", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 177-200
- Huang, A.H.C. y R.A. Moreau (1978) "Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seed during germination", *Planta* 141: 111-6
- Huang, A.H.C., Y-H. Lin y S-M. Wang (1988) "Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 65: 897-9
- INTA (1985) "El cultivo del girasol", Serie Agricultura-Oleaginosas, N° 4802, pág. 5
- Iwai, M. y Y. Tsujisaka (1984) "Fungal lipases", en "*Lipases*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 465-8
- Jensen, R.G. (1983) "Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources", *Lipids* 18: 650-7

- Kausar, N. y M.W. Akhtar (1979) "Isolation and characterization of *Hibiscus cannabinus* seed lipase", *Pak. J. Biochem.* 12: 58-64
- Kermasha, S., F.R. van de Voort y M. Metohe (1986) "Characterization of french bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lipase", *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 19: 23-7
- Kwon, D.Y. y J.S. Rhee (1986) "A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63: 89-92
- Lamberet, G. y A. Menassa (1982) "Détermination des activités lipolytiques dans les fromages à pâte persillée", en "*Use of enzymes in food technology*" (P. Dupuy, ed.), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 253-8
- Lee, I y E.G. Hammond (1990) "Oat (*Avena sativa*) caryopse as natural lipase bioreactor", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 67: 761-5
- Lin, Y.-H. y A.H.C. Huang (1983) "Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings", *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 360-9.
- Lin, Y.-H. y A.H.C. Huang (1984) "Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings", *Plant Physiol.* 76: 719-22.
- Lin, Y.-H., L.T. Wimer y A.H.C. Huang (1983) "Lipase in lipid bodies of corn scutella during seedling growth", *Plant Physiol.* 73: 460-3.
- Lin, Y.-H., R.A. Moreau y A.H.C. Huang (1982) "Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage

- triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings", *Plant Physiol.* 70: 108-12
- Macrae, A.R. (1983) "Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 60: 291-4
- Maeshima, M y H. Beevers (1985) "Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean", *Plant Physiol.* 79: 489-93
- Martin, H.F. y F.G. Peers (1953) "Oat lipase", *Biochem. J.* 55: 523-9
- Momsen, W.E. y H.L. Brockman, (1976) "Effects of colipase and taurodeoxycholate on the catalytic and physical properties of pancreatic lipase B at an oil-water interfase", *J. Biol. Chem.* 251: 378-83
- Mukherjee, K.D. (1990) "Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids", *Biocatalysis* 3: 277-93
- Muto, S y H. Beevers (1974) "Lipase activities in castor bean endosperm during germination", *Plant Physiol.* 54: 23-8
- Nevgi G.V.y C.V. Ramakrishnan, (1950) "Studies on lipase from oil seeds. I. General study of the ricinus lipase from castor seeds", *J. Indian Chem. Soc.* 27: 255-9
- Noma, A. y B. Borgström (1971) "The acid lipase of castor bean positional specificity and reaction mechanism", *Biochim. Biophys. Acta* 227: 106-15
- Onley, C.E., R.G. Jensen, J. Sampugna y J.G. Quinn (1968) "The purification and specificity of a lipase from *Vernonia anthelmintica*", *Lipids* 3: 498-502

- Opute, F.I. (1975) "Lipase activity in germinating seedlings of *Cucumeropsis edulis*", *J. Exp. Bot.* 26: 379-86
- Ory, R.L. (1969) "Acid lipase of the castor bean", *Lipids* 4: 177-85
- Ory, R.L., A.J. St Angelo y A.M. Altschul (1960) "Castor bean lipase: action on its endogenous substrate", *J. Lipid Res.* 1: 208-13
- Ory, R.L., A.J. St Angelo y A.M. Altschul (1962) "The acid lipase of the castor bean. Properties and substrate specificity", *J. Lipid Res.* 3: 99-105
- Ory, R.L., L.Y. Yatsu y H.W. Kircher (1968) "Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*", *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 255-64
- Ory, R.L., R.H. Barker y G.J. Boudreaux (1964) "Nature of the cofactor for the acid lipase of *Ricinus communis*", *Biochemistry* 3: 2013-6
- Pancholy, S.K. y J.Q. Lynd (1972) "Characterization of wheat germ lipase", *Phytochemistry* 11: 643-5
- Piazza, G.J. (1991 a) "Generation of polyunsaturated fatty acids from vegetable oils using the lipase from ground oat (*Avena sativa* L.) seeds as a catalyst", *Biotech. Letters* 13: 173-8
- Piazza, G.J. (1991 b) "Generation of ricinoleic acid from castor oil using the lipase from ground oat (*Avena sativa* L.) seeds as a catalyst", *Biotech. Letters* 13: 179-84
- Radin, N.S. (1969) "Preparation of lipid extracts", *Meth. Enzymol.* 14: 215-54

- Rosnitschek, I y R.R. Theimer (1980) "Properties of membrane-bound triglyceride lipase of rapeseed (*Brassica napus* L.) cotyledons", *Planta* 148: 193-8
- Sanders, T.H. y H.E. Patee (1975) "Peanut alkaline lipase", *Lipids* 10: 50-4
- Sanz, L.C. y J.M. Olias (1990) "Characterization of lupin seed lipase", *Food Chem.* 37: 221-8
- Shastry, B.S. y M.R. Raghavendra Rao (1976) "Chemical studies on rice bran lipase", *Cereal Chem.* 53: 190-200
- Sicard, P. (1982) "Applications industrielles des enzymes", en "*Les enzymes. Production et utilisations industrielles*" (G. Durand y P. Monsan, eds.), Gauthier-Villars, Paris, págs. 121-64
- Singer, T.P. y B.H.J. Hofstee (1948) "Studies on wheat germen lipase. I. Methods of estimation, purification, and general properties of the enzyme". *Arch. Biochem.* 18: 229-44
- St. Angelo, A.J. y A.M. Altschul (1964) "Lipolysis and the free fatty acid pool in seedlings", *Plant Physiol.* 39: 880-3
- Stoll, V.S. y J.S. Blanchard (1990) "Buffers: Principles and practice", *Meth. Enzymol.* 182: 31-8
- Sugiura, M. (1984) "Bacterial lipases", en "*Lipases*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 519-20
- Taylor, A.E. (1906) "On the action of lipase", *J. Biol. Chem.* 2: 87-104

- Theimer, R.R. e I. Rosnitschek (1978) "Development and intracellular localization of lipase activity in rapeseed (*Brassica napus* L.) cotyledons", *Planta* 139: 249-56
- Urquhart, A.A., I. Altosaar y G.J. Matlashewski (1983) "Localization of lipase activity in oat grains and milled oat fractions", *Cereal Chem.* 60: 181-3
- Verger, R. (1980) "Enzyme kinetics of lipolysis", *Meth. Enzymol.* 64: 340-92
- Vijayaraghavan, M.R. y N. Seth (1987) "Metabolic changes during angiosperm seed germination", *Indian Rev. Life Sci.*, 7: 3-20
- Villalobos, N., F. Simon, L. Martin, M. Herrera y G. Nicolas (1987) "Activities and subcellular responsible for lipolysis and gluconeogenesis during the germination of *Brassica campestris* cv. *esculenta* seeds", *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 551-8
- Wang, S.M. y A.H.C. Huang (1987) "Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel", *J. Biol. Chem.* 262: 2270-4
- Wanner, G. y R.R. Theimer (1978) "Membranous appendices of spherosomes (oleosomes)", *Planta* 140: 163-9
- Whitaker, J.R. (1982) "Enzymes of importance in high protein foods", en "*Use of enzymes in food technology*" (P. Dupuy, ed.), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, págs. 329-58
- Whitenberg, D.C. y C.I. Pao (1980) "Characteristics of lipase from *Carya illinoensis*", *Texas Sci. J.* 22: 150-7