

Aislamiento y Caracterización parcial de una Lipasa presente en Raíces Primarias de *Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2* (Malvaceae)

Nora S. PRIOLO, María C. ARRIBÉRE¹ y Néstor O. CAFFINI²

LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,
Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina.

RESUMEN. Los extractos crudos de raíces de plántulas de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2*) de 1-2 días de crecimiento manifiestan actividad lipolítica cuando se utiliza aceite de algodón como sustrato. La actividad lipolítica está asociada al pellet obtenido por centrifugación del extracto crudo a 11.000 g a 4 °C durante 30 minutos. La lipasa fue solubilizada a partir del pellet mediante tratamiento con Tritón X-100 1% (v/v) en buffer Tris-HCl 20 mM de pH 8,5 conteniendo DTT 1 mM y EDTA 0,5 mM. Luego de dos centrifugaciones sucesivas a 50.000 g durante 30 minutos y a 100.000 g durante 1 hora la enzima se recupera en el sobrenadante de la última centrifugación. La lipasa manifiesta máxima actividad en un rango de pH entre 8,0 y 8,5 y a temperaturas comprendidas entre 55 °C y 60 °C, siendo estimulada por la presencia de ion calcio. El análisis por HPLC de los triacilglicéridos (TAG) residuales de aceite de algodón luego de la acción de la lipasa revela una mayor afinidad de la misma hacia TAG que contienen ácido oleico. El fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300) muestra la presencia de dos fracciones con actividad lipolítica.

SUMMARY. "Isolation and partial characterization of a lipase from primary roots of *Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2* (Malvaceae)". Crude extracts of cotton seedling roots (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2*) exhibit lipolytic activity on cotton seed oil. When the crude extract is centrifuged for 30 min at 4 °C and 11.000 g lipolytic activity is recovered from the pellet by adding 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 1% Triton X-100, 1 mM DTT and 0,5 mM EDTA. After centrifugation for 30 min at 50.000 g and for 1 h at 100.000 g the enzyme is recovered in the supernatant. The lipase shows maximum activity at pH 8.0-8.5 and at 55 °C - 65 °C and is stimulated by calcium. HPLC analysis of the remanent triacylglycerols (TAG) after the action of the lipase on cotton seed oil reveals higher affinity for TAG containing oleic acid. Fractionation of the soluble enzyme preparation by gel chromatography (Sephacryl S-300) reveals the presence of two active fractions.

PALABRAS CLAVE: Lipasas, Algodón, *Gossypium hirsutum*, Malvaceae, Hidrolasas vegetales

KEY WORDS: Lipases, Cotton, *Gossypium hirsutum*, Malvaceae, Plant hidrolases

¹ Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

² Miembro de la Carrera del Investigador de la CIC

INTRODUCCION

Las lipasas (triacilglicerolacilhidrolasas, EC 3.1.1.3) representan aproximadamente un 3% de las enzimas utilizadas en procesos industriales de diferente tipo ¹.

Una reciente aplicación de las lipasas es la obtención de ácidos grasos y glicerol a partir de triacilglicéridos, reemplazando el tradicional proceso de hidrólisis química, que requiere altas presiones y temperaturas; el empleo de las mismas como catalizadores disminuye el costo energético y previene la formación de polímeros y de compuestos coloreados, evitando una ulterior purificación de los productos de reacción ².

La reciente introducción de técnicas enzimáticas en medio orgánico ha incrementado enormemente el alcance de reacciones catalizadas por lipasas. En medio acuoso favorecen principalmente la hidrólisis de triacilglicéridos y otros ésteres, pero en medio predominantemente orgánico catalizan un amplio rango de esterificaciones y transesterificaciones, que dan como resultado productos de alto valor comercial ^{3,4}.

Por su parte, la industria farmacéutica frecuentemente incluye lipasas en preparaciones polienzimáticas destinadas a ser utilizadas como coadyuvantes digestivos ⁵.

Aunque las lipasas utilizadas en la industria son en su mayoría de origen fúngico o bacteriano, las derivadas de plantas superiores se caracterizan por ser relativamente específicas, lo que las convierte en un producto de gran interés en la biotecnología de los lípidos ¹. Si bien existe información sobre la presencia de lipasas en semillas de diversas especies vegetales, muy pocas han podido ser purificadas ^{3,6-8}. Asimismo es muy escasa la literatura que hace referencia al estudio de enzimas lipolíticas en otros órganos vegetales y en particular en raíces ⁹⁻¹⁰.

La única referencia existente sobre lipasas de algodón es un breve trabajo en el que se detecta actividad lipolítica en preparaciones enzimáticas no purificadas obtenidas a partir de plántulas enteras ¹¹. En el presente trabajo se comunica la presencia de una lipasa alcalina en raíces primarias de plántulas de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv *Guazuncho 2*), incluyendo el aislamiento y caracterización parcial de la misma.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal

Semillas de *Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2* (*Malvaceae*), provistas por la Estación Experimental Sáenz Peña del INTA (Pcia. del Chaco, Argentina). Las semillas se lavaron con agua corriente durante 24 horas a temperatura ambiente (20 °C) y se hicieron germinar sobre toallas de papel húmedo a 33 °C en la oscuridad. El fin del período de imbibición fue considerado día cero de la germinación. Las raíces fueron separadas manualmente y el resto de la plántula fue descartado.

Preparación y fraccionamiento de extractos

Raíces de plántulas de 1-2 días de desarrollo fueron cuidadosamente removidas, lavadas con agua destilada y homogeneizadas (Omni-mixer, Sorval) durante

un minuto a 4 °C con solución buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5. El extracto crudo fue obtenido por filtración del homogenato a través de una tela de nylon (tamaño de poro: 0,2 mm²). Los extractos crudos fueron centrifugados a 11.000 g a 4 °C durante 30 minutos. Tanto el sobrenadante como el pellet resuspendido en solución buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 fueron sometidos a ensayos de actividad lipolítica.

Aislamiento de la lipasa

El pellet obtenido luego de la centrifugación a 11.000 g fue extraído durante 3 horas a 4 °C en un medio buffer Tris-HCl 20 mM de pH 8,5 conteniendo DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM y Tritón X-100 al 1% (v/v). La suspensión resultante fue centrifugada a 50.000 g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido sometido nuevamente a centrifugación a 100.000 g durante 1 hora (Fracción S-100.000 g). El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford ¹².

Determinación de la actividad lipolítica

En los ensayos de caracterización parcial de la lipasa, la actividad lipolítica se determinó por un método colorimétrico ¹³ en el que los ácidos grasos liberados en la lipólisis son convertidos en complejos de cobre que se solubilizan en isooctano, cuya absorbancia se determina a 715 nm. El medio de reacción contenía 5 ml de solución de aceite de algodón al 10% en isooctano, 0,2 ml de CaCl₂ 0,15 M y 0,5 ml de muestra. La mezcla de reacción fue agitada durante 20 minutos a 37 °C, la actividad enzimática se detuvo por el agregado de 0,5 ml de HCl 6N y se siguió agitando 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 en vórtex durante 90 segundos, se midió la absorbancia de la solución a 715 nm y los resultados se expresaron como nanomoles de ácido oleico por minuto por mg de proteínas. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo especialmente diseñado para la realización de determinaciones enzimáticas múltiples en un sistema de dos fases ¹⁴.

En las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular la actividad fue determinada sobre 1-C¹⁴.trioleína marcada (Dupont), incubando durante 30 min a 55 °C 1 µl de sustrato con 200 µl de muestra y 10 µl de solución 0,8 M de cloruro de calcio, emulsionando la mezcla por sonicación. La reacción se detuvo por inmersión en baño de agua hirviendo. Se agregó a cada tubo 3 ml de mezcla cloroformo-metanol 2:1, se separó la fase clorofórmica y se evaporó a sequedad, retomando luego el residuo con 10µl de la misma mezcla. Los productos de reacción fueron separados por HPTLC (Silicagel 60 Merck) utilizando hexano-éter etílico-ácido acético (80:20:1,5) como fase móvil y cuantificados con un contador de radioactividad por barrido Berthold de tipo 2π con Argón como gas de conteo y un registrador Autochron XY. Las áreas bajo los picos, proporcionales a la cantidad de radioactividad, se calcularon por triangulación de la tangente que corta a la línea de base a ambos lados del pico y fueron expresadas como porcentaje de la radioactividad total ¹⁵.

Efecto del ión calcio sobre la actividad lipolítica

Se ensayó el efecto de distintas concentraciones de ión calcio (5 mM a 50 mM) sobre la actividad lipolítica de la fracción S-100.000 g en el medio de reacción. Las determinaciones se realizaron a 37 °C y a pH 8,5.

Efecto del pH sobre la actividad lipolítica

Para la obtención del perfil de actividad enzimática en función del pH se utilizaron los siguientes sistemas buffer ¹⁶: citrato-fosfato (pH 2,6-7,0), ácido bórico-borato de sodio (pH 7,6-9,2) y glicina-hidróxido de sodio (pH 8,6-10,6). La actividad lipolítica fue ensayada durante 20 minutos a 37 °C en presencia de cloruro de calcio 40 mM; los valores de pH consignados corresponden a mediciones realizadas en la mezcla de reacción.

Variación de la actividad lipolítica con la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la lipólisis se estableció determinando la actividad lipolítica a pH 8,5 durante 20 minutos de reacción entre 35 °C y 65 °C, en presencia de cloruro de calcio 40 mM.

Estabilidad térmica

Las muestras se incubaron a 37 °C, 45 °C, 50 °C y 55 °C durante 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. La actividad lipolítica residual se determinó a 55 °C durante 20 minutos y en presencia de cloruro de calcio 40 mM.

Variación del contenido de triacilglicéridos durante la lipólisis

Se analizó por HPLC la composición de los triacilglicéridos (TAG) residuales luego de 20 minutos de lipólisis frente a aceite de algodón como sustrato, a pH 8,5 y 55 °C. Los cromatogramas fueron comparados con los obtenidos a tiempo cero.

Las determinaciones se llevaron 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. Para la preparación de la muestra a analizar fueron evaporados bajo corriente de nitrógeno 3 ml de la fase isoocetano correspondientes a la mezcla de reacción y el residuo fue retomado con cloroformo, de modo de lograr una concentración de TAG de aproximadamente 5 mg/ml. Las muestras así tratadas se inyectaron y fueron eluidas con una mezcla de acetonitrilo-etanol (3:7) a una velocidad de flujo de 1,3 ml/min. La detección de los TAG 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 TAG patrones (Sigma): trilinoleína (LLL), trioleína (OOO), dilinoleiloleína (LLO), dioleilestearina (OOS) y dioleilpalmitina (OOP) y teniendo en cuenta el orden de elución de los TAG de aceite de algodón obtenido por otros autores ¹⁷⁻¹⁸.

Cromatografía de exclusión molecular

La fracción S-100.000 g fue sometida a un proceso de purificación inicial mediante pasaje a través de una columna (Pharmacia K 15/30) rellena con Sephacryl S-300 (Pharmacia) y eluida con buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 conteniendo Tritón X-100 reducido (Sigma) al 1% (v/v) a una velocidad de flujo de 0,2 ml.min⁻¹. Se recogieron fracciones de 2,1 ml sobre las que simultáneamente se determinó el contenido de proteínas por medición de la absorbancia a 280 nm y por el método de Bradford ¹²; la actividad lipolítica se midió mediante el método radioactivo previamente descrito ¹⁵.

RESULTADOS Y DISCUSION

En extractos crudos de raíces de plántulas de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Guazuncho 2*, *Malvaceae*) se determinó la existencia de actividad lipolítica, que es máxima al día 1 pero que prácticamente desaparece al día 4 de la germinación (Figura 1). La actividad es nula en semillas sin germinar.

Al centrifugar los extractos crudos a 11.000 g se comprobó que la lipasa está asociada al pellet, el que resuspendido en un medio buffer alcalino (Tris-HCl 0,1M pH 8,5) muestra actividad lipolítica frente a aceite de algodón (sustrato nativo).

Por tratamiento del pellet con solución de Tritón X-100 al 1% (v/v) en buffer Tris-HCl 20 mM de pH 8,5 conteniendo EDTA 0,5 mM y DTT 1 mM y posterior centrifugación a 100.000 g la lipasa pudo ser aislada en forma soluble, lo que demuestra que la misma está fuertemente asociada a membranas. Ensayos similares utilizando deoxicolato de sodio o solución de cloruro de sodio en el medio extractante dieron resultados negativos. La Figura 2 muestra el esquema de purificación utilizado.

La actividad lipolítica se manifiesta esencialmente a pH alcalino, con un máximo entre pH 8,0-8,5 (Figura 3), mostrando un comportamiento similar al de la mayoría de las semillas hasta ahora estudiadas ¹⁹.

El ion calcio estimula fuertemente la actividad lipolítica, al igual que lo que ocurre con la lipasa de raíces primarias de melón ¹⁰, siendo máximo su efecto a una concentración de 40 mM (Figura 4). La presencia de calcio en el medio de reacción resulta imprescindible para poner de manifiesto la actividad en presencia de Tritón X-100, dada la acción inhibitoria que manifiesta el detergente sobre la lipasa, que reduce la actividad a una tercera parte del valor inicial (datos no mostrados).

La actividad lipolítica se ve marcadamente estimulada por la temperatura,

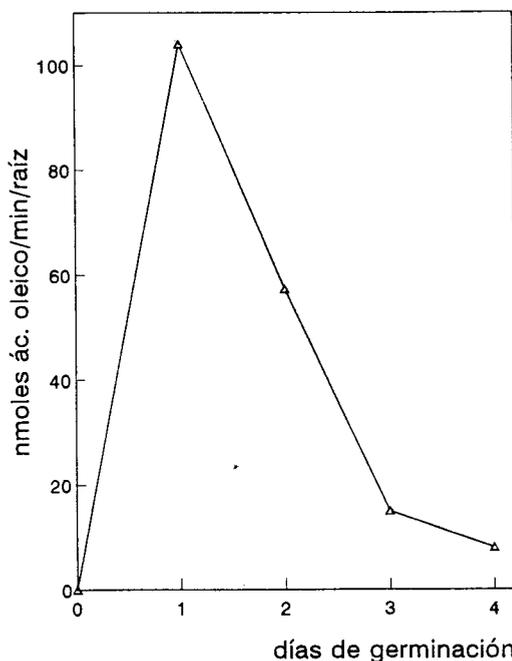


Figura 1. Variación de la actividad lipolítica en raíces durante la germinación de semillas de algodón.

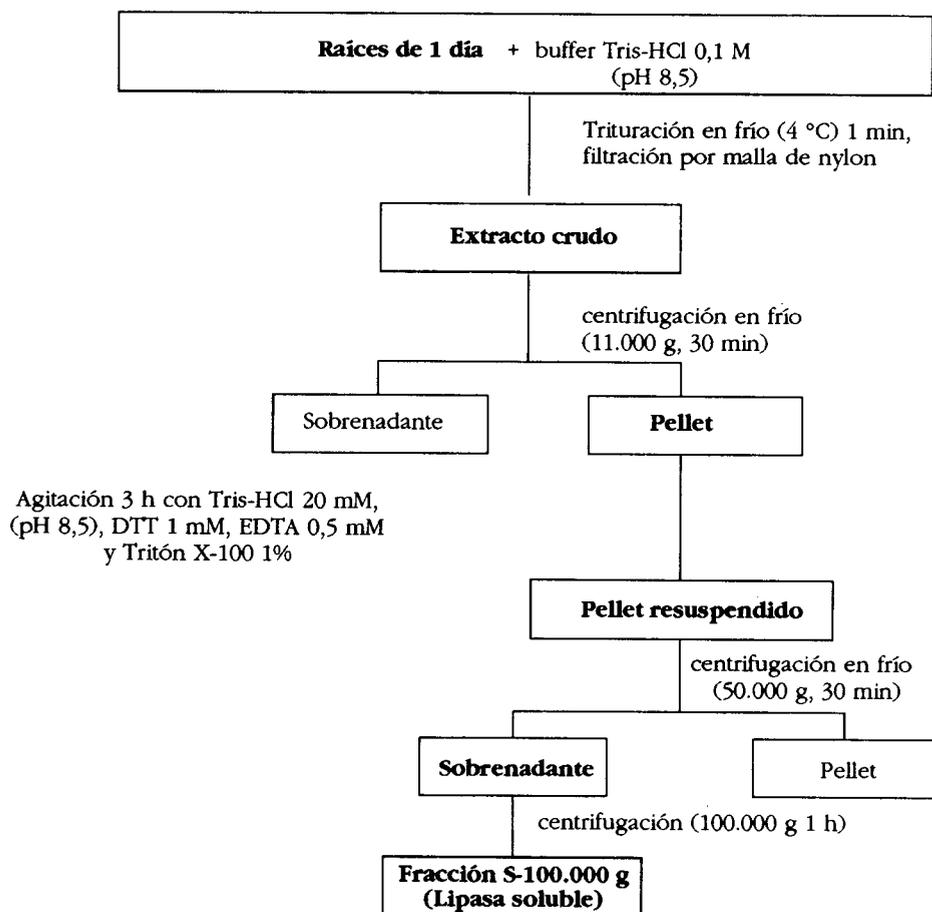


Figura. 2. Esquema de aislamiento y solubilización de la lipasa de raíces de plántulas de algodón

alcanzando su valor máximo entre 55 °C y 60 °C (Figura 5). La estabilidad térmica de la lipasa se muestra en la figura 6, donde se representa el porcentaje de actividad residual en función del tiempo de incubación: al cabo de una hora a 37 °C la preparación conserva un 73% de la actividad inicial y hasta los 30 minutos a 50 °C la actividad es considerablemente alta (80% del valor inicial), pero a temperaturas mayores disminuye significativamente (al cabo de 10 minutos a 55 °C retiene solamente un 20% de la actividad inicial).

La composición de TAG del aceite de algodón (tiempo cero) y la modificación producida luego de hacer actuar la lipasa de algodón sobre su sustrato nativo se muestran en la Tabla 1. El análisis de las áreas relativas de los principales TAG en los cromatogramas obtenidos por HPLC (Figura 7) permite observar la disminución de dilinoleiloleína (LLO), dioleillinoleína (LOO) y linoleiloleilpalmitina (LOP), por lo cual podría inferirse que la lipasa de raíces de algodón manifiesta una mayor afinidad por TAG que contengan ácido oleico.

Al someter la fracción S-100.000 g a cromatografía de exclusión molecular se puso de manifiesto la existencia de dos fracciones proteicas (I y II), no totalmente resueltas (Figura 8). La fracción de peso molecular más elevado (I) es la que manifiesta mayor actividad lipolítica (Figura 9a), ya que en iguales condiciones de reac-

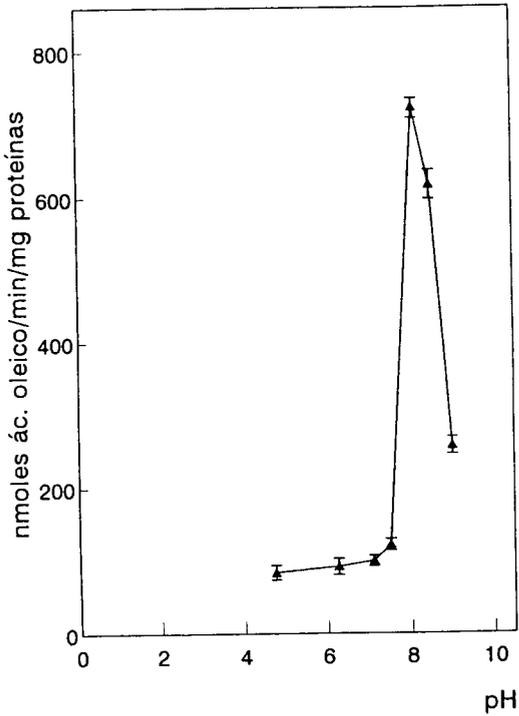


Figura 3. Variación de la actividad de la lipasa de algodón en función del pH.

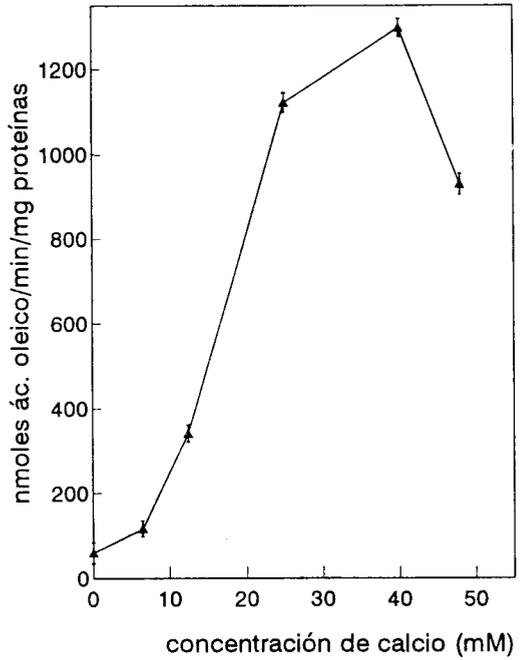


Figura 4. Efecto del ion calcio sobre la actividad de la lipasa de algodón.

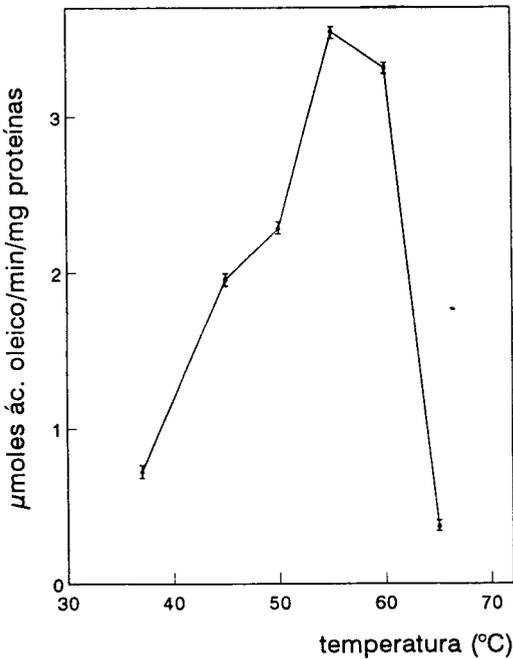


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lipasa de algodón.

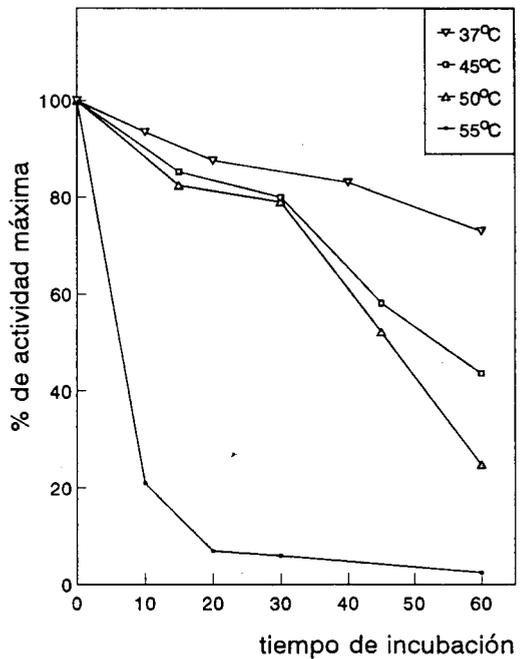


Figura 6. Estabilidad térmica de la lipasa de algodón.

TAG	LLL	LLO	LLP	LOO	LOP	PPL
tiempo cero	31,3	15,1	35,6	2,4	11,8	3,7
20 minutos	32,1	15,0	36,1	1,7	11,3	3,7
% variación	+2,5	-0,6	+1,4	-29	-4,2	-

Tabla 1. Composición de triacilglicéridos de aceite de algodón y variación observada luego de la acción de la lipasa de raíces de plántulas de algodón. Los valores corresponden a las áreas relativas de los distintos triacilglicéridos separados por HPLC (Figura 7). TAG: triacilglicéridos, LLL: trilinoleína, LLO: dilinoleiloleína, LLP: dilinoleilpalmitina, LOO: linoleildioleína, LOP: linoleiloleilpalmitina, PPL: linoleildipalmitina

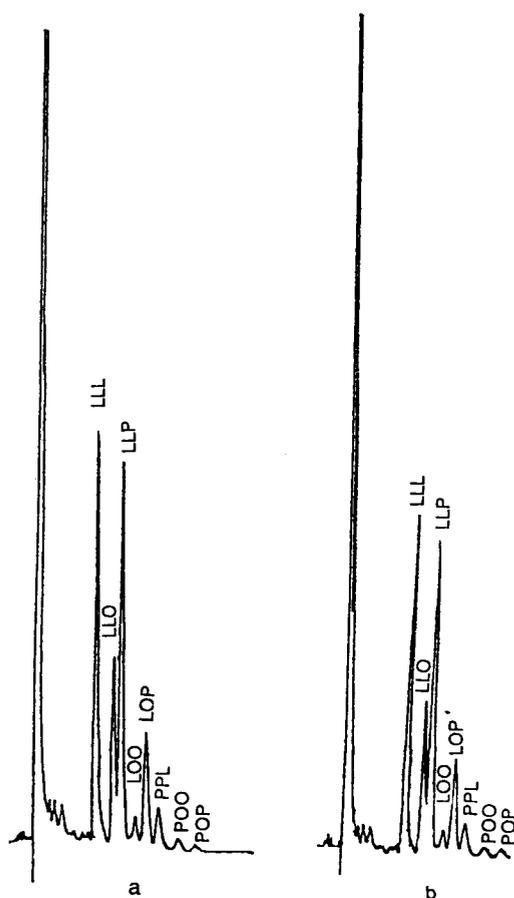


Figura 7. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los triacilglicéridos presentes en aceite de algodón. a) composición a tiempo cero y b) triacilglicéridos residuales luego de 20 minutos de lipólisis. TAG: triacilglicéridos, LLL: trilinoleína, LLO: dilinoleiloleína, LLP, dilinoleilpalmitina, LOO: linoleildioleína, LOP: linoleiloleilpalmitina, PPL: linoleildipalmitina

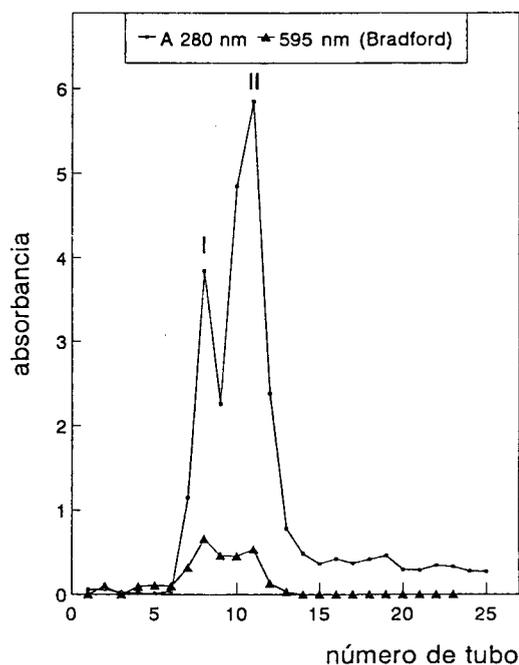


Figura 8. Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300) de la fracción S-100.000 g.

ción degrada un 53,5% de 1-C^{14} trioleína, contra un 34,4% de degradación producido por la fracción II (Figura 9b). Asimismo, el análisis de los productos de reacción sugeriría un diferente comportamiento lipolítico de ambas fracciones, ya que la relación de diacilglicéridos a monoacilglicéridos luego de hacer actuar la fracción I (2:1) es significativamente distinta a la obtenida con la fracción II (4,5:1).

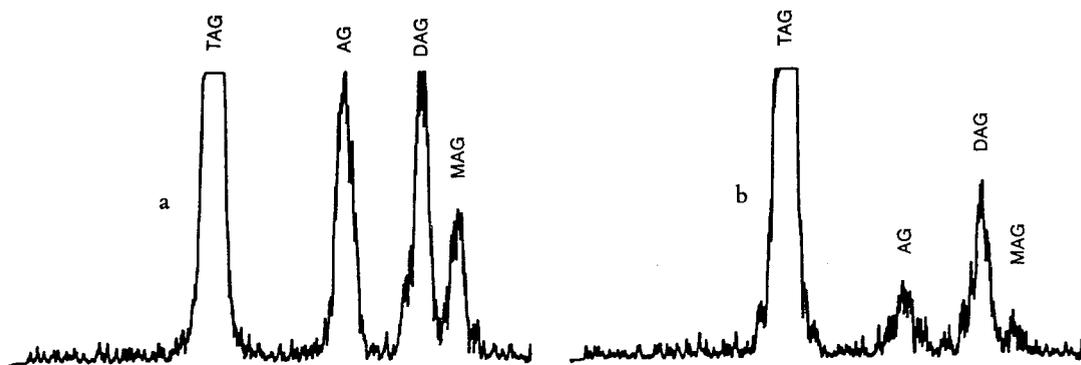


Figura 9. Radiogramas de los productos de lipólisis obtenidos por acción de las fracciones I (a) y II (b) sobre 1-C¹⁴ trioleína, separados por HPTLC (Silicagel 60 Merck). AG: ácidos grasos libres, DAG: diacilglicéridos, MAG: monoacilglicéridos, TAG: triacilglicéridos.

Agradecimientos. El presente trabajo ha sido financiado conjuntamente por el CONICET (PID-BID 1119) y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Los autores desean agradecer la colaboración de la Lic. Laura Gaspar en las determinaciones de actividad sobre sustratos radiactivos, así como el apoyo técnico brindado por la Srta. Marisa Bettioli.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Huang, A.H.C., Y. Lin y S. Wang (1988) *JAOCs* **65**: 897-9
- Dandik, L., G. Arioglu y H.A. Aksoy (1993) *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **42**: 119-26
- Ncube, I., P. Adlercreutz, J. Read y B. Mattiasson (1993) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 327-36
- Mukkerjee, K.D. (1990) *Biocatalysis* **3**: 277-93
- Arribére, M.C. y N.O. Caffini (1988) *Acta Farm Bonaerense* **7**: 131-41
- Lin, Y.-H. y A.H.C. Huang (1984) *Plant Physiol.* **76**: 719-22
- Maeshima, M y H. Beevers (1985) *Plant Physiol.* **79**: 489-93
- Hammer, M.F y J.B. Murphy (1993) *Physiol. Plant.* **87**: 39-44
- Heimann-Matile, J. y P.E. Pilet (1977) *Plant Science Letters* **9**: 247-52
- Akhtar, M.W., N. Kausar y M.N. Nawazish (1981) *Pak. J. Sci. Res.* **33**: 102-9
- Olcott, H.S. y T.D. Fontaine (1941) *J. Am. Chem. Soc.* **63**: 825-7
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
- Kwon, D.Y. y J.S. Rhee (1986) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **63**: 89-92
- Caffini, N.O., M.C. Arribére y N.S. Priolo (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 183-5
- 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. 62
- Stoll, V.S. y J.S. Blanchard (1990) *Meth. Enzymol.* **182**: 24-38
- Bland J.M., E.J. Conkerton y G. Abraham (1991) *JAOCs* **68**: 840-3
- Balesdent, D., C. Kapseu y G.J. Kayem (1989) *Rev. Fr. Corps. Gras* **36**: 27-33
- Arribére, M.C., N.S. Priolo y N.O. Caffini (1994) *Acta Alimentaria* (Budapest) **23**: 311-22