

Enzimas Lipolíticas de Plantas Superiores. III. Lipasas de Semillas de Cruciferae (Brassicaceae)

MARIA C. ARRIBÉRE *, NORA S. PRIOLO y NESTOR O. CAFFINI

Laboratorio de Botánica Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina

RESUMEN. En la presente contribución se proporciona información actualizada sobre las lipasas provenientes de semillas de *Brassica napus* L., *B. alba* (L.) Boiss. (= *Sinapsis alba* L.), *B. campestris* L. y *B. juncea* (L.) Czern. et Cosson (= *Sinapsis juncea* L.), con algunos comentarios sobre aspectos taxonómicos de los materiales estudiados por los distintos autores. También se incluyen las referencias que dan soporte a dos teorías sobre la formación de los cuerpos lipídicos en los tejidos de reserva de semillas de Cruciferae.

SUMMARY. "Lipolitic Enzymes of Higher Plants. III. Lipases of Cruciferae (Brassicaceae)". The present paper provides up to date information on lipases from seeds of *Brassica napus* L., *B. alba* (L.) Boiss. (= *Sinapsis alba* L.), *B. campestris* L. and *B. juncea* (L.) Czern. et Cosson (= *Sinapsis juncea* L.), together with some comments on taxonomical aspects about the plant material studied by the different authors. References that hold theories on the origin of lipid bodies in the storage tissue of Cruciferae seeds are also included.

INTRODUCCION

Las Cruciferae (Brassicaceae) constituyen una gran familia (alrededor de 380 géneros y 3.000 especies) de mucha importancia económica, que incluye una elevada proporción de plantas cultivadas como forrajeras, medicinales, ornamentales y alimenticias (hortalizas, condimentos y productoras de aceites) ¹.

En nuestro país se cultivan unas 50 especies, que se destinan a todos los usos antes mencionados. *Brassica* es el género más re-

presentativo, con 7 especies y 12 variedades cultivadas (Tabla 1) ².

Los aceites de semillas de Cruciferae ocupan el quinto lugar en importancia después de los de soja, algodón, maní y girasol. Las mayores producciones se obtienen a partir de *Brassica napus* L. ("colza") y *Brassica rapa* L. ("turnip") ¹.

Asimismo, la presencia de lípidos de reserva en semillas de Cruciferae ha estimulado el estudio de las lipasas responsables de la primera etapa de degradación de los

PALABRAS CLAVE: Lipasas; Enzimas lipolíticas; Cruciferae; Brassicaceae; *Brassica napus*; *B. alba*; *B. campestris*; *B. juncea*; *Sinapsis alba*.

KEY WORDS: Lipases; Lipolytic enzymes; Cruciferae; Brassicaceae; *Brassica napus*; *B. alba*; *B. campestris*; *B. juncea*; *Sinapsis alba*.

* Becaria de la Universidad Nacional de La Plata

<i>B. alba</i> (L.) Boiss. (= <i>Sinapsis alba</i> L.)	"mostaza blanca"
<i>B. nigra</i> (L.) Koch (= <i>Sinapsis nigra</i> L.)	"mostaza negra"
<i>B. juncea</i> (L.) Czernjaew et Cosson (= <i>Sinapsis juncea</i> L.)	"mostaza de la China"
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.	
subvar. <i>cauliflora</i> (Gars.) DC.	"coliflor"
subvar. <i>cymosa</i> Lamk.	"brócoli, "brócoli de cabeza", "albenga"
subvar. <i>asparagoides</i> DC.	"brócoli espárrago", "brócoli calabrés", "brocolata"
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> DC.	"repollito o col de Bruselas"
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>sabauda</i> (L.) Martens	"col de Milán", "repollo cresco"
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	"repollo"
<i>B. oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> DC.	
subvar. <i>palmifolia</i> DC.	"berza", "berza gallega"
subvar. <i>plana</i> Peterm.	"col cavalier"
f. <i>viridis</i> (L.) Thellung	"col cavalier de hojas verdes"
f. <i>purpurascens</i> DC.	"col cavalier de hojas rojas"
<i>B. napus</i> L. var. <i>arvensis</i> (Lam.) Thell.	
f. <i>biennis</i> (Schubl. et Mart.) Thell. ^a	"rape"
f. <i>annua</i> (Schubl. et Mart.) Thell.	"colza", "nabiza", "grello", "nabo"
<i>B. napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> (L.) Peterm.	"colinabo", "rutabaga"
<i>B. rapa</i> L.	"nabo", "turnip"
<i>B. chinensis</i> L.	"col o repollo de la China"

Tabla 1. Nómima de especies y variedades de *Brassica* cultivadas en Argentina ².

^a: a esta forma pertenece la raza Dwarf Essex.

aceites durante la germinación. Si bien la mayoría de los trabajos son de neto corte fisiológico, recientemente ³ se ha señalado la posible trascendencia biotecnológica del uso de lipasas de semillas.

En la presente revisión se brinda una información actualizada sobre la presencia de lipasas en semillas de las pocas especies de Cruciferae hasta ahora estudiadas. El status taxonómico de la familia —y en particular del género *Brassica*— es aún motivo de controversia, hecho que se refleja en la mayoría de los trabajos, donde la imprecisión de los autores al citar el material en estudio dificulta la comparación de los resultados. En razón de ello, el ordenamiento dado a esta reseña respeta los nombres científicos utilizados por los autores, consignándose cuando corresponda las sinonimias y la posible filiación taxonómica de las especies de denominación dudosa.

Lipasas de Brassica napus L.

El primer estudio sobre esta especie estuvo dirigido esencialmente a determinar la ubicación subcelular de la enzima, analizándose también la influencia de factores exógenos (luz y nutrientes nitrogenados) sobre la actividad lipásica ⁴.

En el trabajo citado, homogenatos de cotiledones de plántulas (*B. napus* L. var. Lemke's Diamant) de 4 días de germinación fueron centrifugados a 62000 g durante 5 h en gradiente lineal de sacarosa, método usual para la separación de organelas celulares a partir de homogenatos de tejidos vegetales ⁵, en el que la ubicación de cada organela (con valores de densidad característicos) se pone en evidencia determinando la actividad de enzimas específicas ("marcadores enzimáticos"). En las condiciones mencionadas, el 90% de la actividad lipásica aparece en la zona correspondiente

a una concentración de 20% a 30% de sacarosa (densidad promedio 1,094 kg/l), mientras que las enzimas marcadoras de glioxisomas (isocitratoliasa y catalasa) y de mitocondrias (fumarasa) lo hacen a densidades promedio de 1,246 y 1,187, respectivamente. Estos resultados descartan la posibilidad de que la lipasa estuviera asociada a las membranas de las mitocondrias, como ocurre en cotiledones de maní ⁶ y en células de levadura ⁷, o a las membranas de los glioxisomas, como en ricino ⁸.

Cuando se somete el homogenato a centrifugación diferencial a 23000 g se separa una capa grasa superior (fracción esferosomal) con sólo un 5% de actividad lipásica, un particulado crudo carente de actividad y un sobrenadante. La ulterior centrifugación de este sobrenadante a 150000 g produce un pellet (fracción microsomal) en el que se recupera el 90% de actividad lipásica. Centrifugando la fracción microsomal en un gradiente lineal de sacarosa, la fracción de membrana a la que está asociada la lipasa queda ubicada en la zona proteica de menor densidad (1,085 kg/l), separándose de la fracción correspondiente a la fosforilcolinaglicéridotransferasa (densidad promedio 1,106 kg/l) y a la fosforilcolinacitidiltransferasa (densidad promedio 1,133 kg/l), ambas correspondientes a fracciones de membrana del retículo endoplásmico. Esto confirmaría que la actividad lipásica está asociada a una fracción discreta de membrana que sedimenta en forma diferente de las fracciones correspondientes al retículo endoplásmico. Este procedimiento permitió purificar 22 veces a la lipasa, con una recuperación del 36% de la actividad inicial.

Los autores no detectaron actividad lipásica en semillas en reposo. Durante la germinación, la caída de lípidos coincide con la aparición de la actividad lipásica, pero la mayor velocidad de degradación de los glicéridos se logra cuando la misma no ha al-

canzado la mitad de su valor máximo, lo que ocurre recién al cuarto día de la germinación, manteniendo luego valores elevados. Este comportamiento podría obedecer a la presencia de un inhibidor que estaría inactivo en la célula intacta, pero que se pondría en evidencia al preparar el homogenato.

Este perfil de actividad no es afectado por la luz, pero sin embargo depende del suministro nitrogenado: semillas germinadas en un medio enriquecido con sales nitrogenadas muestran una notoria disminución de la actividad lipásica luego de alcanzado el valor máximo.

La mayor actividad enzimática sobre aceite de girasol se logra a pH 9, no detectándose liberación de ácidos grasos a valores inferiores a pH 7 ni superiores a pH 11. El comportamiento es similar utilizando N-metilindoxilmiristato, pero el pH óptimo es 8,5.

Uno de los primeros estudios acerca de la ubicación subcelular de las lipasas es el realizado por Ory *et al.* ⁹ en semillas no germinadas de ricino, donde la microscopía electrónica junto a técnicas histoquímicas reveló que la lipasa estaba asociada a la membrana de los esferosomas.

El nombre de esferosomas se ha utilizado para definir a partículas de forma globular y de pequeño tamaño que se tiñen con colorantes lipofílicos, limitadas por una "media unidad de membrana" ¹⁰. Bergfeld *et al.* ¹¹ consideran que los esferosomas que contienen lípidos neutros (aceites, en la mayoría de los casos) ubicados en tejidos específicamente almacenadores como frutos y semillas deberían designarse más apropiadamente "oleosomas" o "cuerpos lipídicos"; sin embargo, el empleo del término "esferosomas" en este sentido es muy frecuente.

De acuerdo al trabajo antes citado ⁴, sólo un 5% de la actividad lipásica está presen-

te en la fracción esferosomal, quedando la mayor parte asociada a una fracción microsomal diferente a la que corresponde a glioxisomas, mitocondrias y retículo endoplásmico.

La observación al microscopio electrónico de la fracción microsomal que exhibe actividad lipásica ¹² revela la presencia de fragmentos con estructura 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, los autores ¹² proponen un novedoso mecanismo del origen de los esferosomas, síntesis de la lipasa y degradación de glicéridos (Fig. 1). Los esferosomas se formarían por acumulación de triglicéridos de reserva dentro de la capa lipídica de las porciones terminales de los sacos membranosos del retículo endoplásmico. La acumulación de lípidos fuerza gradualmente la separación de las dos capas lipoproteicas que forman la unidad de membrana (Fig. 1a). Dado que el esferosoma en formación sigue conectado al retículo endoplásmico, éste proveería los fosfolípidos necesarios para incrementar el área superficial de la media unidad de membrana que constituye el límite del esferosoma.

Una vez que el esferosoma ha alcanzado 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 se-

para del retículo endoplásmico, reteniendo una porción intacta del mismo con ribosomas asociados; los "apéndices tipo asa" observados por microscopía electrónica estarían representados por estos restos de retículos endoplásmico (Fig. 1b).

Los ribosomas unidos a los apéndices esferosomales 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 glicéridos, los cuales migrarían desde el cuerpo del esferosoma hacia el apéndice para ser degradados. Esta circulación forzada a través del apéndice provocaría un incremento del contenido de ácidos grasos en el cuerpo del esferosoma, en detrimento de los triglicéridos allí almacenados. Los ácidos grasos liberados constituyen el sustrato inicial de la gluconeogénesis, proceso que transcurre en los glioxisomas, que están en estrecho contacto con los cuerpos lipídicos (Fig. 1c). Los ácidos grasos podrían llegar a los glioxisomas atravesando la capa de fosfolípidos de la media unidad de membrana, o bien por ruptura del apéndice (Fig. 1d). Finalmente, la pérdida de contenido del esferosoma hace que las paredes opuestas se aproximen, transformándolo en una estructura vesicular del tipo de una unidad de membrana (Fig. 1e).

En un trabajo posterior, los mismos autores caracterizaron parcialmente la lipasa presente en cotiledones de *Brassica napus* L. Estudios realizados sobre distintos sustratos naturales (aceite de girasol, lino, maní, sésamo, oliva, almendra, ricino y nabo) demostraron que la actividad lipásica es inversamente proporcional al contenido de ácido oleico de los aceites. Por otra parte el agregado de cantidades crecientes de ácidos grasos a una emulsión de aceite de girasol reduce la actividad, efecto que es máximo en el caso del ácido erúxico (principal com-

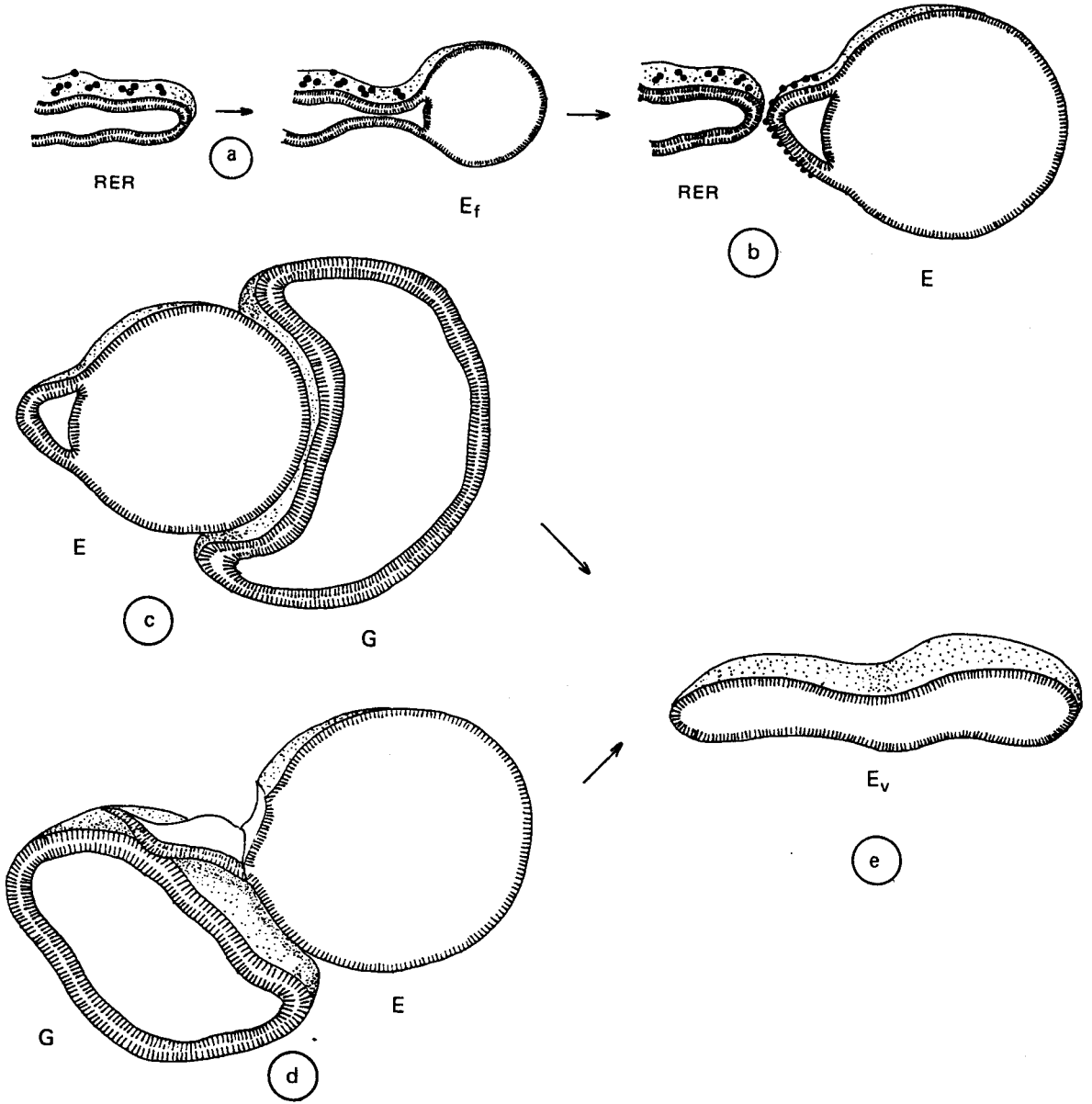


Figura 1. Representación esquemática de la formación y degradación de los esferosomas. a) Formación del esferosoma: los triglicéridos se acumulan dentro de la unidad de membrana de una porción terminal de los sacos membranosos del retículo endoplasmático, separando las capas fosfolípido-proteicas de dicha unidad para formar la media unidad de membrana que rodea al esferosoma; b) separación del cuerpo lipídico del retículo endoplasmático reteniendo una porción del mismo con ribosomas asociados, encargados de la síntesis de la lipasa; c) esferosoma asociado a un glioxisoma; d) ruptura del "apéndice tipo asa" de un esferosoma asociado a un glioxisoma; e) esferosoma vacío ("fantasma") con las caras internas de la media unidad de membrana muy próximas, aparentando una estructura del tipo unidad de membrana. RER: retículo endoplasmático rugoso; Ef: esferosoma en formación; E: esferosoma; Ev: esferosoma vacío; G: glioxisoma. (Adaptado de Wanner y Theimer) 12.

ponente del aceite de nabo), lo que sugeriría un posible rol en la regulación de la lipólisis *in vivo*.

La lipasa es mucho menos eficiente sobre sustratos sintéticos: la actividad frente al N-metilindoxilmiristato y trioleína es el 12,5% y el 5%, respectivamente, de la exhibida frente al aceite de girasol; sin embargo es nula en el caso de la triacetina, dilaurato de fluoresceína y lecitina, indicando ausencia de actividad esterásica y fosfolipásica.

Utilizando sustratos radiactivos (trioleína C^{14}) y analizando los productos de hidrólisis se pudo comprobar la presencia de 1,2- y 1,3-diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. Dado que el contenido de 1,2-diglicéridos es superior al de 1,3-diglicéridos, podría interpretarse que existe una especificidad posicional por la que los ácidos grasos de posición 1 (3) son preferentemente hidrolizados.

La máxima actividad lipásica depende de la preincubación de la fracción de membrana en cloruro de sodio 0,15 M y la presencia de al menos una concentración 0,1 M de cloruro de sodio en la mezcla de reacción. El desoxicolato de sodio y el cloruro de calcio hasta una concentración 0,1 M también activan la enzima, mientras que el EDTA y los detergentes tales como Triton X 100, digitonina y Tween 85 en elevadas concentraciones y el SDS, aún en bajas concentraciones, la inhiben.

Otro grupo de investigadores¹⁴, utilizando diferentes variedades de cultivo de *B. napus* L. (cv. Dwarf Essex y cv. Tower, esta última con escaso contenido de ácido erúxico), determinaron que la actividad lipásica está ausente en semillas en reposo y que se incrementa durante la germinación. La lipasa es más activa sobre triacilglicéridos nativos y está localizada en la membrana de los cuerpos lipídicos.

Trabajando con extractos crudos de cotiledones de *B. napus* L. cv. Dwarf Essex o

con la membrana de los cuerpos lipídicos a la cual está asociada la lipasa (que se obtiene por extracción con dietiléter de los cuerpos lipídicos separados por centrifugación), estos autores encuentran que la actividad lipásica es máxima a pH 5,5-6,5 sobre trierucina y trilinoleína, pero es capaz de hidrolizar di- y monoglicéridos a velocidades menores. Asimismo, los cuerpos lipídicos de semillas germinadas sufren máxima autólisis a pH 6,5.

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

La actividad sobre trierucina se incrementó sólo en un 10-20% por el agregado de cloruro de sodio y cloruro de calcio, pero se redujo notablemente al adicionar EDTA 10 mM, fosfato sódico 20 μ M, desoxicolato de sodio 2 mM y Tritón X-100 al 1%.

Los resultados obtenidos empleando semillas de *B. napus* cv. Tower (con menos de 1% de ácido erúxico) son muy similares: la actividad lipásica es máxima también al cuarto día de iniciada la germinación y a pH 6,5; la mayor actividad se obtiene sobre trioleína, trilinoleína y trierucina cuando se la compara con otros triglicéridos y con mono- y diglicéridos. La capacidad de hidrolizar trierucina haría suponer que en esta variedad el gen responsable de la producción de la lipasa no habría sido afectado.

Los lípidos de reserva comienzan a degradarse a partir del segundo día de la germinación y su contenido disminuye linealmente hasta el día seis. La actividad lipolítica *in vitro* también se pone en evidencia desde el día dos y alcanza un máximo al cuarto día de la germinación, pero la actividad que se manifiesta al segundo día es suficientemente alta como para explicar la velocidad de la lipólisis *in vivo*.

Si se usa trierucina como sustrato la hidrólisis prácticamente se detiene cuando el 70% del triglicérido ha sido convertido en ácido erúico. El análisis de los productos de reacción muestra que los di- y monoglicéridos respectivos prácticamente no se acumulan en el transcurso de la lipólisis. La velocidad de reacción es constante y se reduce sólo después que el 50% de la trierucina ha sido degradada.

La Tabla 2 resume las características diferenciales de las lipasas presentes en semillas de *Brassica napus* L. cv. Lemke's Diamant^{4,13} y cv. Dwarf Essex¹⁴.

En los trabajos anteriormente citados^{4,13,14} se demostró la existencia de actividad lipásica en las membranas de los cuerpos lipídicos como en la fracción microsomal obtenida por centrifugación en gradiente de sacarosa (centrifugación isopícnica), aunque en diferentes proporciones. Sin embargo, los resultados no permitían establecer si se trataba de una única lipasa localizada en los cuerpos lipídicos (en cuyo caso la actividad lipásica observada en la fracción microsomal obedecería a la presencia de fragmentos de membrana de cuerpos lipídicos) o si eran dos lipasas distintas.

En un trabajo reciente¹⁵, sobre plántulas de *B. napus* cv. Andor (una variedad cultivada que no contiene trierucina) se efectuó un estudio comparado de las fracciones microsomal y esferosomal, comprobando que la actividad lipásica asociada a cada una de ellas presentaba características diferenciales: a) el 70-80% de la actividad se recuperó en la fracción microsomal, mientras que sólo el 20-25% estaba asociada a los cuerpos lipídicos; b) la actividad de la fracción microsomal frente a la trimiristina es máxima a pH 7,5, pero declina bruscamente por encima de pH 9 y es nula a pH 11; en cambio la fracción esferosomal muestra máxima actividad a pH 9 y conserva el 50% de la misma a pH 11; c) en el caso de la enzima microsomal la actividad se incrementa con la concentración de sustrato alcanzando un *plateau* a una concentración 5mM; en contraste, la velocidad de la lipólisis catalizada por la enzima de los cuerpos lipídicos es lineal hasta una concentración 20 mM; d) la actividad de la lipasa microsomal se incrementa con la disminución de la cadena carbonada y el aumento del número de dobles enlaces de los ácidos grasos, mientras que la velocidad de la reacción cataliza-

<i>B. napus</i> L. cv. Lemke's Diamant ^{4,13}	<i>B. napus</i> L. cv. Dwarf Essex ¹⁴
Se recupera el 90% de la actividad lipásica en la fracción microsomal (apéndices en forma de asa separados de los cuerpos lipídicos)	El 50% de la actividad lipásica está asociada a los cuerpos lipídicos
pH óptimo 9 (sustrato: aceite de girasol)	pH óptimo 6,5 (sustrato: trierucina)
La actividad es máxima sobre aceite de girasol y de lino y es muy reducida frente al aceite de nabo	La actividad es máxima sobre trierucina y trilino-leína
Concentraciones de ácido erúico de 10 µmoles/mol de triglicérido inhiben completamente la reacción	Concentraciones de ácido erúico de hasta 1,5 milimoles/mol de triglicérido no afectan la velocidad de reacción
La actividad lipásica se incrementa por el agregado de cloruro de sodio	El agregado de sales prácticamente no influye sobre la actividad lipásica

Tabla 2. Características diferenciales de lipasas presentes en semillas germinadas de dos variedades cultivadas de *Brassica napus* L.

da por la enzima de los cuerpos lipídicos no se ve sensiblemente afectada en ninguno de los dos casos.

Los resultados obtenidos por estos autores ¹⁵ parecerían demostrar 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. Sin embargo, los resultados no coinciden con los señalados anteriormente ^{4, 13, 14}, por lo que tanto la ubicación subcelular como la identidad de la o las lipasas todavía es un tema no resuelto.

LIPASAS DE *Brassica alba* (L.) Boiss. (= *Sinapis alba* L.) ²

El origen de los cuerpos lipídicos en tejidos de reserva de semillas es aún motivo de controversia. Como se ha mencionado para el caso de *Brassica napus* L. ¹², aquéllos se formarían por acumulación local de triglicéridos en la capa media de la unidad de membrana del retículo endoplásmico, por lo que la envoltura del cuerpo lipídico derivaría en última instancia de la mitad externa de dicha unidad de membrana.

Al estudiar el desarrollo de los cuerpos lipídicos de *Sinapis alba* L. desde el momento de la polinización por microscopía electrónica, Bergfeld *et al.* ¹¹ encuentran que las primeras gotas de triglicéridos aparecen en el citoplasma basal a los doce días, en estrecho contacto con plástidos, y no están limitadas por una línea oscura, que es característica de los cuerpos lipídicos típicos; en esta etapa no se detectan las membranas del retículo endoplásmico, pero sí una cantidad importante de ribosomas dispersos en el citoplasma. A los dieciocho días hay un rápido desarrollo del retículo endoplásmico, al cual se unen la mayor parte de los ribosomas citoplasmáticos para constituir el retículo endoplásmico rugoso. A continuación, cada glóbulo lipídico es

abrazado por una cisterna del retículo endoplásmico y, a pesar de que no se observa una conexión estructural entre ellos, comienza a definirse una línea oscura que lo limita y constituye la cubierta del cuerpo lipídico, que está formada por proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso.

Estos autores ¹¹ comprobaron además que las membranas del retículo endoplásmico y de los cuerpos lipídicos exhibían diferentes densidades de flotación por centrifugación isopícnica y que también era distinta la composición polipeptídica de ambas por SDS-PAGE, por lo que consideran que los cuerpos lipídicos no constituyen un desprendimiento del retículo endoplásmico, en oposición a la hipótesis de Wanner y Theimer ya descripta ¹².

Recientemente y con el objeto de explorar la posible aplicación de lipasas de semillas en procesos biotecnológicos, se consiguió aislar una lipasa de plántulas de *Sinapis alba* L. de 4 días de germinación ³.

Las plántulas fueron homogeneizadas en buffer tricina (pH 7,5) conteniendo sacarosa, cloruro de magnesio, EDTA, cloruro de potasio y ditiotreitól, filtradas a través de gasa y centrifugadas a 23000 g durante 30 minutos. Se obtuvieron así una capa grasa, flotante, un sobrenadante y un pellet, en los que se ensayó la actividad lipásica a 37 °C sobre aceite de girasol emulsionado, estimando los ácidos grasos liberados por titrimetría.

La mayor actividad lipásica se detecta a los cuatro días de germinación en la fracción sobrenadante. Su pH óptimo sobre aceite de girasol se logra a pH 9, declinando bruscamente por encima de pH 10 y haciéndose nula por debajo de pH 6.

La preparación cruda así obtenida pierde un 10-12% de la actividad inicial cuando se almacena a -10 °C durante cinco semanas y la actividad se reduce a la mitad cuando

se la somete a liofilización. Tampoco la diálisis parece mejorar la actividad lipásica, pero la obtención de un polvo acetónico por el procedimiento tradicional produce una preparación más activa y estable.

El análisis de los productos de hidrólisis por cromatografía en capa fina a los 5 y 15 minutos de iniciada la misma revela la presencia mayoritaria de 1,2 (2,3)-diacilglicéridos y ácidos grasos libres, con reducida proporción de 2-diacilglicéridos, lo que demuestra que la enzima es altamente específica para las posiciones *sn*-1,3 de los triacilglicéridos.

LIPASAS DE *Brassica campestris* L.

La advertencia preliminar (cf. Introducción), referida tanto al controvertido estado taxonómico del género *Brassica* como a la inseguridad de la determinación del material en estudio por parte de algunos autores, es especialmente aplicable en el caso de esta especie. Por considerarla ilustrativa, se transcribe la opinión de Bailey¹⁶ al respecto: "los manuales contienen más bien pocas que muchas especies de *Brassica*, por la desafortunada y antinatural tendencia a incluir a muchas de ellas dentro de *Brassica campestris*".

La primera referencia sobre la presencia de lipasas en semillas de esta especie¹⁷ también constituye el primer informe sobre actividad lipolítica en semillas de Cruciferae. En él se da cuenta de la existencia de actividad lipásica sobre tributirina en semillas germinadas de *Brassica campestris* L. ("Polish rapeseed").

Las semillas germinadas en presencia de luz se desarrollan más lentamente que las que lo hacen en la oscuridad, pero en ambos casos la actividad lipolítica máxima ocurre a los cinco días de iniciada la germinación. Sin embargo, la actividad de las plántulas crecidas en el invernadero en con-

diciones óptimas de iluminación es más de tres veces superior a la de las plántulas etioladas.

La preparación enzimática se obtiene homogeneizando las plántulas con acetona (-10 °C) durante 10 minutos, lo que proporciona un "polvo acetónico" que es secado y almacenado en frío hasta el momento de su uso.

El sustrato consiste en una emulsión de tributirina al 10% en lecitina vegetal y agua, homogeneizada a 45000 rpm durante 4 minutos. La actividad enzimática se expresa en milimoles de ácido butírico liberados luego de una hora de incubación a 35 °C y pH 8,5. Los ácidos grasos se determinan por titulación automática con hidróxido de sodio 0,1 N. Con concentraciones de polvo acetónico de hasta 90 mg en 150 ml de una emulsión de tributirina 0,66 mM y por el término de una hora, la reacción es de orden cero.

Una suspensión de la enzima en solución de cloruro de sodio al 0,9% conservada a 4 °C es estable durante 24 horas y mantiene el 78% de la actividad inicial al cabo de 9 días.

La actividad óptima se logra a pH 8,5, tanto para las preparaciones enzimáticas de semillas germinadas en presencia de luz como en ausencia de ella. La actividad disminuye rápidamente a pH alcalino y es nula a valores inferiores a pH 5.

La lipasa se muestra menos activa sobre otros sustratos sintéticos: ante trioleína y triacetina la actividad disminuye a la mitad y a la quinta parte, respectivamente. Frente a aceites vegetales el comportamiento es variable: utilizando aceite de oliva, nabo y girasol, la actividad alcanza al 51%, 40% y 36%, respectivamente, de la demostrada frente a tributirina.

El agregado de cianuro de sodio, azida sódica y en menor medida el glutatión ejercen un ligero efecto activador, en tanto que

la cisteína no parece afectar la actividad lipolítica.

En un trabajo muy reciente ¹⁸, destinado a estudiar la actividad y localización celular de las enzimas responsables de la lipólisis y gluconeogénesis durante la germinación de semillas de *Brassica campestris* cv. esculenta ("turnip"), se comunicó la presencia de dos lipasas con características diferenciales.

En las semillas en reposo, aproximadamente el 50% del peso seco está representado por lípidos, con un 22% de azúcares solubles. En ellas está presente una lipasa, cuyo contenido se incrementa durante las 24 horas de germinación y luego decrece bruscamente, que es activa en un rango de pH muy estrecho (pH 4-5).

A partir del tercer día de iniciada la germinación se hace evidente la presencia de una lipasa alcalina y también parecería detectarse actividad en medio neutro. La lipasa alcalina es particularmente activa entre los días 5 y 8 y su concentración es máxima al sexto día, coincidiendo con el período de mayor movilización de los triacilglicéridos de reserva, por lo que es considerada como la principal responsable de la degradación de aquéllos. El perfil de pH es también estrecho (la actividad es muy reducida por debajo de pH 8 y por encima de 9,5, con un máximo a pH 8,5) y la mayor parte de la actividad lipásica está asociada a los esferosomas (58,61%).

Si bien en los dos trabajos mencionados existe coincidencia en que la enzima responsable de la degradación de los lípidos de reserva de las semillas muestran máxima actividad a pH 8,5, no existe seguridad de que ambos estudios se hayan realizado sobre la misma especie. En el último de ellos ¹⁸ el material ensayado es referido como *Brassica campestris* cv. esculenta, pero con el nombre vulgar de "turnip", habitual-

mente asignado a *Brassica rapa* L. (Tabla 1). Teniendo en cuenta la opinión de Bailey ¹⁶ antes citada, así como la transferencia de una parte de *Brassica campestris* como subespecie de *Brassica rapa* ¹⁹, debería confirmarse la identidad taxonómica del material estudiado previamente a cualquier comparación que se quiera realizar de las características de las lipasas aisladas en los trabajos mencionados ^{17, 18}.

LIPASAS DE *Brassica juncea* (L.) Czern. et Cosson

Las semillas de esta especie exhiben un alto contenido de ácido erúico (22%), que junto con los ácidos oleico (20%) y linoleico (20%) representan los principales ácidos grasos de los triacilglicéridos de reserva.

Los homogenatos obtenidos a partir de cotiledones de semillas sin germinar por tratamiento suave en un medio de pH 7,5 conteniendo sacarosa, EDTA, cloruro de potasio y de magnesio y ditiotreitól no muestran actividad lipásica a pH 5, 7 ó 9, ni tampoco se verifica autólisis de los triacilglicéridos contenidos en los cuerpos lipídicos aislados, a los mismos valores de pH.

Por el contrario, los cuerpos lipídicos aislados de plantas de cuatro días muestran máxima autólisis a pH 5. Sometiendo los homogenatos a centrifugación diferencial pudo comprobarse que más del 40% de la actividad lipásica queda retenida en los cuerpos lipídicos, utilizando trilinoleína como sustrato, tanto a pH 5,5 como a pH 9.

La fracción de membrana obtenida desengrasando los cuerpos lipídicos con dietiléter tiene máxima actividad lipásica entre pH 5 y 6 sobre trilinoleína y es ligeramente más activa sobre trioleína y trierucina, en tanto que frente a tripalmitina y triestearina la actividad disminuye a la mitad. También se ha detectado actividad acilhidrolásica con un máximo a pH 9 sobre N-meti-

lindoxilmiristato, pero solamente un 11% de dicha actividad está vinculada a los cuerpos lipídicos ¹⁴.

COMENTARIO FINAL

El reducido número de referencias bibliográficas que acompañan a esta revisión demuestra que el estudio de las lipasas de Cruciferae registra escasos aportes, la mayoría de ellos de reciente data. Asimismo son muy pocas las especies estudiadas y los trabajos están más vinculados hacia aspectos fisiológicos del almacenamiento y degradación de lípidos de reserva que al análisis bioquímico de las lipasas responsables de estos procesos.

La especie que ha recibido más atención es *Brassica napus* L., de la que se han analizado distintas variedades de cultivo, incluidas algunas con bajo contenido en ácido erúxico (22:1). Sin embargo los resultados obtenidos distan de parecer definitivos: mientras algunos autores afirman que la actividad lipásica (máxima a pH 9) está presente mayoritariamente en la fracción microsomal ^{4, 13}, otros ¹⁴ sostienen que al menos la mitad de la actividad está asociada a los cuerpos lipídicos y que es máxima a pH 6,5, además de algunas diferencias en el grado de afinidad hacia los sustratos y en su comportamiento frente a activadores e inhibidores. Recientemente se ha comunicado que la actividad lipásica detectada en los cuerpos lipídicos y en la fracción microsomal obedecería a la existencia de dos lipasas de características distintas ¹⁵, pero los perfiles de pH tampoco coinciden con los valores consignados por los autores anteriores.

A partir de plántulas de *Sinapsis alba* L., con el objeto de obtener preparaciones lipolíticas para su uso en procesos biotecnológicos ³, se obtuvo un polvo acetónico con actividad lipásica máxima a pH 9, altamen-

te específico para las posiciones sn-1,3 de los triacilglicéridos. En el mismo trabajo se comparan las actividades de las lipasas de esta especie y de la anterior, que revelaron un comportamiento marcadamente similar.

El origen de los cuerpos lipídicos en tejidos de reserva de semillas de las dos especies mencionadas también ha sido estudiado, agregando un nuevo aspecto controvertido en el conocimiento del mismo. En efecto: se ha postulado que los cuerpos lipídicos de *Brassica napus* L. se formarían por acumulación de triacilglicéridos en la capa media de la unidad de membrana de una porción terminal del retículo endoplasmático, por lo que la envoltura del cuerpo lipídico derivaría en última instancia de la mitad externa de dicha unidad de membrana ¹²; por el contrario, en el caso de *Sinapsis alba* L. las gotas de lípidos se acumularían muy tempranamente en el citoplasma y al cabo de un cierto tiempo se definiría el límite del cuerpo lipídico por la aparición de una cubierta formada *de novo* a partir de componentes proteicos sintetizados en regiones específicas del retículo endoplasmático rugoso ¹¹.

El polvo acetónico de semillas germinadas de *Brassica campestris* L. exhibe máxima actividad lipásica sobre tributirina a pH 8,5 y su actividad es menor frente a aceites vegetales y otros sustratos sintéticos ¹⁷. En un trabajo reciente ¹⁸ se detectó la presencia de una lipasa ácida en semillas sin germinar (propiedad casi exclusiva de las semillas de ricino) y de una lipasa alcalina en semillas germinadas, de características similares a las antes mencionadas, si bien no existe en este caso la seguridad de que se haya estudiado la misma especie (probablemente el material corresponda a *B. rapa* L.).

También ha sido detectada actividad lipásica en semillas germinadas de *Brassica juncea* (L.) Czern. et Cosson, retenida ma-

yoritariamente en los cuerpos lipídicos. La máxima actividad se manifiesta a pH 5,5 y

frente a sustratos que contienen ácidos grasos insaturados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Heywood, V.H. (1985) "Las plantas con flores", Ed. Reverté, Barcelona, págs. 115-8
2. La Porte, J. (1978) "Crucíferas", en "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" (M.J. Dimitri, dir.), Tomo I, Primer volumen, Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires, Argentina, págs. 406-20
3. Hassanien, F.R. y K.D. Mukherjee (1986) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63: 893-7
4. Theimer, R.R. e I. Rosnitschek (1978) *Planta* 139: 249-56
5. Lord., J.M., T. Kagawa y H. Beevers (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 2429-32
6. Jacks, T.J., L.Y. Yatsu y A.M. Altschul (1967) *Plant Physiol.* 42: 585-97
7. Schousboe, I. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 424: 366-75
8. Muto, S. y H. Beevers (1974) *Plant Physiol.* 54: 23-8
9. Ory, R.L., L.Y. Yatsu y H.W. Kircher (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 255-64
10. Yatsu, L.Y. y T.J. Jacks (1972) *Plant Physiol.* 49: 937-43
11. Bergfeld, R., Y.-N. Hong, T. Kühni y P. Schopfer (1978) *Planta* 143: 297-307
12. Wanner, G. y R.R. Theimer (1978) *Planta* 140: 163-9
13. Rosnitschek, I. y R.R. Theimer (1980) *Planta* 148: 193-8
14. Lin, Y.-H. y A.H.C. Huang (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 360-9
15. Hills, M.J. y D.J. Murphy (1988) *Biochem. J.* 249: 687-93
16. Bailey, L.H. (1953) "The Standard Cyclopedia of Horticulture". The Macmillan Co., N.Y., vol. I, págs. 541-4
17. Wetter, L.R. (1957) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 34: 66-70
18. Villalobos, N., F. Simón, L. Martín, M. Herrera y G. Nicolás (1987) *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 551-8
19. Cabrera, A.L. y E.M. Zardini (1978) "Manual de la Flora de los alrededores de la Provincia de Buenos Aires", 2da. Ed., Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires, pág. 306