

Detección del Sistema Lipolítico Responsable de la Movilización de los Lípidos de Reserva Durante la Germinación de Semillas de *Helianthus annuus* L. (Compositae)

MARIA C. ARRIBERE*, 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. Se ha detectado la presencia de actividad lipolítica en homogenatos de cotiledones provenientes de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871) cultivadas a 30 °C en la oscuridad. Las semillas en dormancia no manifiestan actividad lipolítica, pero la misma se incrementa durante la germinación conjuntamente con el decrecimiento de los lípidos de reserva. La mayor actividad se registra entre los días 2 y 3, con valores máximos a pH 3,7 y 8,5.

SUMMARY. "Detection of the Lipolytic System Responsible for the Mobilization of Seed Storage Lipids During Germination of *Helianthus annuus* L. (Compositae)". The total extract of sunflower (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871) seedlings underwent lipolysis as measured by the release of fatty acids. The lipolytic activity was absent in the dry seeds and increased after germination (30 °C in darkness) concomitant with the decrease in total lipids. Maximum activity is reached at pH 3.7 and 8.5 and the peak stage of *in vitro* lipolysis in both cases occurs at days 2 and 3.

INTRODUCCION

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son las enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos, para lo cual requieren la existencia de una interfase lípido-agua. La necesidad de esta interfase es lo que permite diferenciarlas de las esterasas, que sólo pueden actuar en sistemas homogéneos¹:

Durante la germinación, las lipasas presentes en las semillas son las enzimas responsables de la etapa inicial de la degradación (movilización) de los aceites de reserva

contenidos en los cuerpos lipídicos del endosperma o de los cotiledones, con producción de glicerol y ácidos grasos. Estos últimos son convertidos mayoritariamente en azúcares simples a través del ciclo del glucoxilato por el proceso de gluconeogénesis que tiene lugar en los glioxisomas, orgánulos que están en estrecho contacto con los cuerpos lipídicos².

En cuanto a su campo de aplicación, las lipasas son utilizadas por las industrias alimentaria, química, farmacéutica, cosméti-

* Becaria del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: Enzimas lipolíticas; Lipasas; Lípidos de reserva; *Helianthus annuus* L., Compositae; Girasol; Germinación.

KEY WORDS: Lipolytic Enzymes; Lipases; Storage Lipids; *Helianthus annuus* L.; Compositae; Sunflower; Germination.

ca, del cuero y de los detergentes, entre otras ³. En la mayoría de los casos las enzimas utilizadas son de origen fúngico ⁴, incluidas las que se emplean en procesos biotecnológicos de reciente data, como la interesterificación de aceites y grasas (ej.: obtención de manteca de cacao artificial a expensas de aceite de palma ⁵). Sin embargo, trabajos muy 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. El contenido de lipasas, salvo excepciones, se incrementa durante los primeros días de la germinación, las plántulas son fáciles de cosechar, las técnicas de extracción son simples y es más que satisfactoria la estabilidad y actividad de las preparaciones hasta ahora conocidas ⁶.

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 ². Dentro de la familia Compositae, probablemente la primera lipasa estudiada fue la de semillas de *Vernonia anthelmintica*, una enzima de elevado peso molecular (superior a 200 kD) y escasa especificidad posicional ⁷. Más recientemente se ha logrado la purificación y caracterización parcial de una lipasa de semillas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), activa a pH ligeramente alcalino ⁸.

Huang y Moreau ⁹ son los primeros en señalar la presencia de actividad lipolítica en plántulas de cuatro días de *Helianthus annuus* L. a pH 5, 7 y 9, utilizando N-metilindoxilmiristato como sustrato. En un estudio posterior Fusseder y Theimer ¹⁰ comprueban la existencia de una monoacilglicerolhidrolasa activa sobre el mismo sustrato a pH 8,5 en semillas en maduración (30

días posteriores a la antesis). Más recientemente, un intento fallido de aislar la lipasa responsable de la movilización de las reservas lipolídicas de semillas de girasol permitió el aislamiento y caracterización de un inhibidor de lipasas, una proteína de peso molecular cercano a los 70 kD ¹¹.

En el presente trabajo se ha estudiado la relación entre la disminución del contenido de lípidos durante la germinación de semillas de *Helianthus annuus* L. y la aparición de actividad lipolítica, incluyendo una caracterización preliminar del sistema enzimático frente a su sustrato endógeno, como paso previo al aislamiento y purificación de las enzimas que lo componen.

MATERIAL

Material vegetal

Semillas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871), provistas por la Asociación de Cooperativas Argentinas C.L., Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados fueron de calidad p.a.: acetato de cobre, cloruro de sodio, fosfato monosódico, glicina y glucosa (Mallinckrodt), ácido acético, fenol y fosfato disódico (Fluka), ácido bórico (Anedra), ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, cloruro de potasio y metanol (Merck) ácido oleico y Tris (Sigma), cloroformo, iso octano y piridina (Sintorgan), etanol (Soria, rectificado) e hidróxido de sodio (Carlo Erba).

Equipos

a) *Homogeneizador*. Se trata de un equipo *ad-hoc* constituido por un eje de acero inoxidable en el que se insertan hojas de afeitar que gira a 2.000 rpm, sumergido en un recipiente de vidrio de 100 ml de capacidad útil.

b) *Agitador múltiple en cubas termostatazadas*. Utilizado para las determinaciones de actividad lipolítica en sistema de dos fases. Es un equipo *ad-hoc* que permite la realización de diez determinaciones simultáneas en un medio termostatzado (baño Lauda con circulación externa), con velocidad de agitación regulable, reproducible, constante e igual en todas las cubas de reacción ¹².

METODOS

Pretratamiento y germinación de las semillas

Las semillas se lavan con agua en forma continua durante 24 horas, al cabo de las cuales son colocadas sobre toallas de papel húmeda y puestas a germinar en la oscuridad, a 25 °C y 30 °C. El fin del período de imbibición fue considerado como día cero de la germinación.

Obtención de homogenatos de cotiledones

Los ensayos para determinar la presencia de actividad lipolítica se llevaron a cabo sobre homogenatos de semillas en dormancia y en distintos estadios de germinación. Los cotiledones, seleccionados tanto por edad como por el tamaño del hipocótilo, fueron separados manualmente y homogeneizados 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 por cm) y congelado inmediatamente hasta el momento de ser usado.

Determinación del contenido de lípidos totales

Cotiledones obtenidos como se indicó en el punto anterior fueron triturados en el homogeneizador descrito más arriba con una mezcla cloroformo-metanol (2:1), utilizando 17 ml de mezcla por gramo de cotile-

dones frescos. La suspensión fue filtrada a través de papel de filtro y el residuo lavado dos veces con 2 ml de mezcla extractante por gramo de cotiledones ¹³. Los filtrados fueron mezclados y evaporados con corriente de aire caliente hasta peso constante.

Determinación de azúcares 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 ¹⁴. Para la determinación de glúcidos en los extractivos etanólicos se utilizó el método del fenol-sulfúrico ¹⁵.

Determinación de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó por un método colorimétrico ¹⁶ 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 contiene 3 ml de solución buffer, 5 ml de isooctano y 3 ml de homogenato, agregados en ese orden.

La reacción se lleva a cabo en el equipo mencionado previamente ¹² a 37 °C durante 10 minutos y comienza con el agregado del homogenato, que contiene tanto la enzima como el sustrato (aceites propios de la semilla). La actividad enzimática se detiene por la adición de 3 ml de ácido clorhídrico 6 M y la mezcla se sigue agitando durante un minuto.

Finalmente se separan 3 ml de la capa superior de isooctano, que contienen los ácidos grasos liberados, y se hacen reaccionar con 0,6 ml de solución de acetato de cobre al 5% llevada a pH 6,1 con piridina. Se agita cada tubo 90 segundos y se determina la concentración de los ácidos grasos presentes midiendo la absorción a 715 nm de la fase isooctano. Los resultados se expresan

como nanomoles de ácido oleico liberados por minuto por par de cotiledones.

Para la obtención de los valores de pH deseados se utilizaron los siguientes sistemas buffer: glicina-cloruro de sodio-ácido clorhídrico 0,25 M (pH 1,2-3,4), ácido acético-acetato de sodio 0,25 M (pH 3,6-5,6), fosfato monosódico-fosfato disódico 0,25 M (pH 6,0-7,5), ácido bórico-cloruro de potasio-hidróxido de sodio 0,25 M (pH 8,0-10,0) y glicina-cloruro de sodio-hidróxido de sodio 0,25 M (pH 10,5-12,0).

RESULTADOS

Ensayos de germinación

En primer término fue necesario optimizar el esquema de germinación, determinando el contenido de lípidos residuales de los cotiledones en plántulas de distintos días. Cuando las semillas 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 a cabo a 30 °C, en sólo 7 días el contenido de lípidos disminuye al 20% (Fig. 1). Por lo tanto todas las experiencias posteriores fueron realizadas a esta última temperatura.

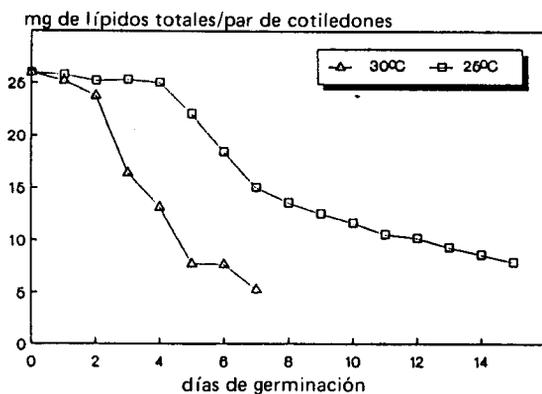


Figura 1. Disminución del contenido de lípidos durante la germinación de semillas de girasol a 25 °C y 30 °C en la oscuridad.

Variación del contenido de lípidos totales y glúcidos solubles durante la germinación

Como muestra la Fig. 2, el contenido de lípidos sólo decrece un 9% durante los primeros dos días de la germinación y luego sufre una brusca caída (30% del valor inicial al quinto día), reduciéndose a un 20% al cabo de siete días. El contenido de glúcidos solubles disminuye durante las primeras 24 horas y luego se incrementa concomitante con la caída de los lípidos totales, manteniendo un nivel más o menos constante hasta que el contenido de lípidos residual es un cuarto del valor inicial.

Variación de la actividad lipolítica durante la germinación

Para comprobar si la máxima velocidad de lipólisis *in vivo* se correlaciona con la aparición de actividad lipolítica *in vitro* se incubaron homogenatos de distintos estadios de desarrollo (días 0 a 7), a 37 °C y a pH 5, 7 y 9. Los resultados (Fig. 3) muestran que a los valores de pH ensayados no se manifiesta actividad lipolítica en semillas sin germinar, pero la misma ya aparece durante el primer día de la germinación, alcanzando sus valores máximos entre los días dos y tres, decrece a partir del día cuatro y es prácticamente nula al día siete.

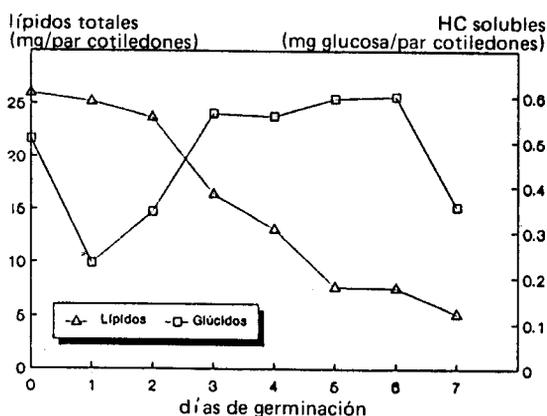


Figura 2. Variación en el contenido de lípidos totales y de glúcidos solubles durante la germinación de semillas de girasol a 30 °C en la oscuridad.

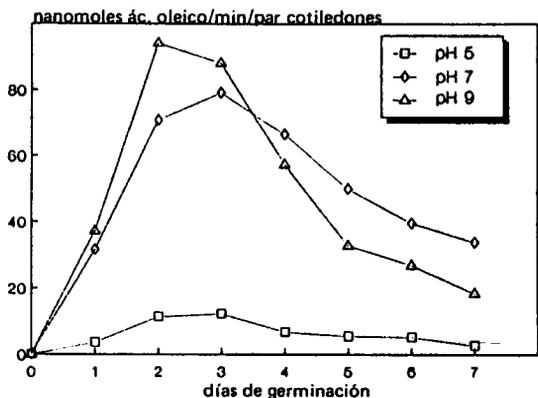


Figura 3. Variación de la actividad lipolítica durante la germinación de semillas de girasol (30 °C, en la oscuridad) a pH 5,7 y 9.

La actividad lipolítica detectada a pH 7 y 9 es considerablemente mayor que a pH 5, lo que podría hacer suponer que el sistema era escasamente activo a pH ácido. Para comprobarlo se hicieron determinaciones de actividad con homogenatos de cotiledones de tres días de crecimiento, pero ampliando el rango de pH entre 2,9 y 9,9 (Fig. 4), observándose la presencia de dos picos de máxima actividad a pH 3,7 y 8,5.

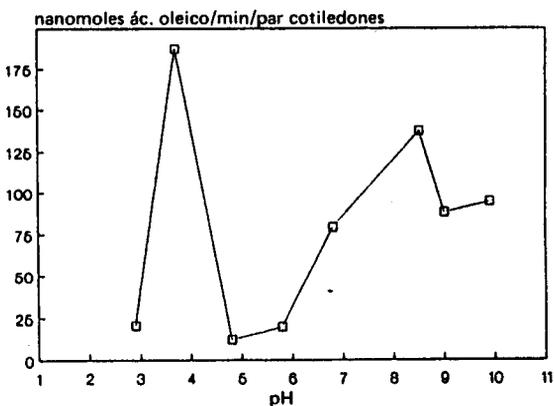


Figura 4. Variación de la actividad lipolítica en función del pH de un homogenato de cotiledones de plántulas de girasol de 3 días de crecimiento (30 °C, en la oscuridad).

Este comportamiento podría obedecer a la existencia de al menos dos enzimas lipolíticas, una ácida y otra alcalina. En consecuencia se estudió el perfil de actividad du-

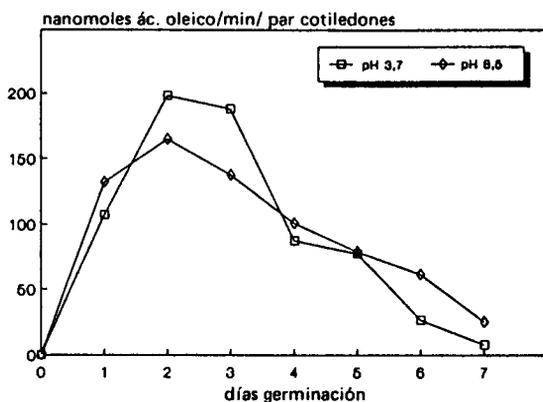


Figura 5. Variación de la actividad lipolítica durante la germinación de semillas de girasol (30 °C, en la oscuridad) a los valores de pH de máxima actividad.

rante la germinación a los dos valores de pH mencionados con el objeto de establecer si ambos estaban desplazados, lo que hubiera constituido una prueba a favor de la existencia de dos enzimas. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos, pudiendo comprobarse que ambos perfiles están prácticamente superpuestos.

DISCUSION

La germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871) en la oscuridad resulta ser un proceso extremadamente sensible a las condiciones 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. Dado que la caída de lípidos guarda estrecha relación con la aparición de actividad lipolítica *in vitro*, esta característica reduce significativamente el tiempo necesario para la obtención de material destinado al estudio del sistema lipolítico.

Aún cuando la detección de actividad lipolítica *in vitro* (homogenatos de cotiledones) no necesariamente refleja lo que ocurre en el sistema celular intacto, en este caso se comprueba una aceptable correlación entre la caída de los lípidos (con una fuerte pendiente a partir del segundo día) y la actividad lipolítica *in vitro*, que es máxima

entre los días 2 y 3. 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 tendría 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, o ambas cosas a la vez.

El análisis del contenido de glúcidos solubles es congruente con el comportamiento observado *in vivo*, ya que el mismo disminuye 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.

Todas las experiencias han sido realizadas sobre homogenatos de cotiledones de

girasol a los que no se adicionó sustrato, por lo que los valores de actividad lipolítica registrados corresponden entonces a la acción de las enzimas del sistema sobre su sustrato endógeno. Huang ² no encontró actividad autolítica (liberación enzimática de ácidos grasos a partir de triglicéridos nativos) en cuerpos lipídicos aislados de plántulas de girasol de cuatro días, hecho que podría obedecer tanto a la ausencia de una lipasa asociada a la membrana de los cuerpos lipídicos como a la separación de algún cofactor durante el aislamiento de los mismos a partir de homogenatos.

La actividad del sistema lipolítico responsable de la movilización de los lípidos de reserva en plántulas de girasol exhibe dos máximos, a pH 3,7 y 8,5. Los perfiles de actividad en función de los días de germinación para ambos valores resultan prácticamente superponibles, lo que por ahora no permite sustentar la hipótesis de la existencia de distintas enzimas, a diferencia de lo que ocurre en ricino ¹⁷ y *Brassica campestris* ¹⁴.

AGRADECIMIENTOS. Al Ing. Agr. José María Bruniard, de la Asociación de Cooperativas Argentinas C.L., por la provisión de semillas de girasol. Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, por su apoyo (estímulo científico) al proyecto "Lipasas de semillas".

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brockman, H.L. (1984) "General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches", en "*Lipasas*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 3-46
2. Huang, A.H.C. (1984) "Plant lipases", en "*Lipasas*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 419-42
3. Arribére, M.C. y N.O. Caffini (1988) *Acta Farm. Bonaerense* 7: 131-41
4. Iwai, M. e Y. Tsujisaka (1984) "Fungal Lipase", en "*Lipasas*" (B. Borgström y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, págs. 465-6
5. Macrae, A.R. (1983) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 60: 291-4

6. Hassanien, F.R. y K.D. Mukherjee (1986) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63: 893-7
7. Olney, C.E., R.G. Jensen, J. Sampugna y J.G. Quinn (1968) *Lipids* 3: 498-502
8. Daood, H. y H. Al-Ani (1988) *Acta Alimentaria* 17: 127-39
9. Huang, A.H.C. y Moreau, R.A. (1978) *Planta* 141: 111-6
10. Fusseder, A. y R.R. Theimer (1984) *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 403-11
11. Chapman, G.W., Jr. (1987) *Phytochemistry* 26: 3127-31
12. Caffini, N.O., M.C. Arribére y N.S. Priolo (1990) *Acta Farm. Bonaerense* 9: 183-5
13. Radin, N.S. (1969) *Meth. Enzymol.* 14: 215-54
14. Villalobos, N., F. Simón, L. Martín, M. Herrera y G. Nicolás (1987) *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 551-8
15. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956) *Anal. Chem.* 28: 350-6
16. Kwon, D.Y. y J.S. Rhee (1986) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 63: 89-92
17. Muto, S. y H. Beevers (1974) *Plant Physiol.* 54: 23-8