

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis fue encontrar nuevas lipasas, extraídas de semillas germinantes que presentaran una actividad hidrolítica importante frente a un aceite. Se partió de la hipótesis de trabajo de que las semillas que tuvieran un porcentaje de aceite elevado como reserva energética podrían poseer lipasas activas para hidrolizarlo *in situ* durante su germinación. En primer lugar se hizo una búsqueda de semillas de distintas familias. Las semillas estudiadas fueron achicoria de raíz (*Cichorium intybus*), cardo de Castilla (*Cynara cardunculus*), girasol (*Helianthus annuus* L.), colza variedad 00 (*Brassica napus* cv. Ceres), nabiza (*Brassica napus* L.), nabo (*Brassica napus* L. cultivada), repollo blanco (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.), repollo crespo (*Brassica oleracea* L.), rabanito de punta blanca (*Raphanus sativus* L. var. *Acanthiformis* Makino), Morrón (*Capsicum annuum* L.), tomate perita (*Lycopersicon esculentum* L.), zanahoria (*Daucus carota*), zapallo de cáscara dura (*Cucurbita pepo*), remolacha (*Beta vulgaris* L.). Se analizó su contenido en aceite, así como otros parámetros tales como el contenido de agua y la velocidad de germinación. Esta se consideró como un índice indirecto de la actividad de las lipasas presentes. Una vez que se encontraron las semillas con las características buscadas (alto contenido en aceite y periodo de germinación de duración intermedia, menor de 16 días) se determinó, para cada uno de sus distintos estadios de germinación, la actividad hidrolítica endógena o *in vivo* y la actividad hidrolítica exógena o *in vitro* de los crudos preparados con ellas. Todas las semillas presentaron una disminución poco significativa (menos del 10%) de su contenido en aceite y un aumento de masa apreciable antes del estadio E₂.

Todas las semillas presentaron algo de actividad hidrolítica *in vitro*, desde el estadio E₁ de su germinación, aunque ésta estuvo ausente en todas las semillas sin germinar. En general, no se notó un aumento de la actividad hidrolítica *in vitro* (medida por el ensayo descrito en la Tesis) a medida que avanzó la germinación y en la mayoría de los casos, más bien ésta decreció (lo cual no era esperable, de acuerdo con el metabolismo normal de las semillas). Solamente las semillas de colza, repollo blanco y tomate perita tuvieron una tendencia clara a alcanzar un máximo en el estadio E₄. Los máximos grados de hidrólisis

exógena obtenidos, en general, fueron muy bajos (excepto para colza: 47.6%): achicoria de raíz 4.6%, cardo 11.5%, girasol 17.1%, Morrón 3.5%, nabiza 9.7%, nabo 13.8%, rabanito 7.3%, repollo blanco 19.4%, repollo crespo 7.0%, tomate perita 17.2%, zanahoria 2.6% y zapallo de cáscara dura 2.3%.

Se realizó un estudio comparativo de las semillas de la familia *Brassica*: colza variedad 00 (*Brassica napus* cv. *Ceres*), nabiza (*Brassica napus* L.), nabo (*Brassica napus* L. cultivada), repollo blanco (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.), repollo crespo (*Brassica oleracea* L.), rabanito de punta blanca (*Raphanus sativus* L. var. *Acanthiformis* Makino). Dicho estudio indicó que las semillas no presentaron un comportamiento similar durante la germinación. En particular, las de nabiza, nabo y repollo crespo dieron lugar a crudos con baja capacidad de hidrólisis exógena y las de colza y repollo blanco, con alta capacidad.

Luego de realizar los estudios comparativos de la capacidad de hidrólisis endógena y exógena, en función de los resultados obtenidos se eligieron las semillas cuyos crudos presentaron mayor capacidad de hidrólisis exógena. Estas semillas fueron cardo, repollo blanco y tomate perita.

Con los crudos de estas semillas se optimizaron las condiciones del ensayo de actividad exógena: pH, relación gramos semillas / mL buffer, relación gramos crudo/ mL aceite, tiempo de reacción. En base a ello se pudo concluir que la sensibilidad del grado de hidrólisis exógena respecto de cada uno de estos parámetros dependió de la semilla estudiada. Sin embargo, en valores absolutos, la optimización de estos parámetros no modificó de manera importante el grado de hidrólisis exógena.

Se realizó la concentración de las lipasas contenidas en las semillas de cardo, repollo blanco, repollo crespo, nabiza y tomate perita por el método de "acetone powder". Se estudió el comportamiento de los polvos de acetona frente a distintos sustratos para evaluar la existencia de algún tipo de especificidad.

La comparación del comportamiento de estas lipasas frente a los distintos aceites de origen vegetal (coco, girasol y oliva) no indicó ninguna especificidad, ya que la fracción hidrolizada presentó una composición igual a la del aceite original. Cuando las lipasas

actuaron sobre un aceite de pescado se observó que no había hidrólisis de los ácidos grasos con más de tres insaturaciones.

Las lipasas estudiadas bajo forma de "acetone-powder" de semillas germinantes de nabiza, repollo blanco, repollo crespo, tomate y cardo en el estadio E₄ presentaron un comportamiento similar.

Se estudió el comportamiento de las lipasas purificadas por el método de "acetone powder" frente al agregado de distintos cofactores: cloruro de calcio, cloruro de magnesio y Tritón X 100. Se pudo concluir, en forma general, que los cationes calcio y magnesio y el tensoactivo Tritón X100 utilizados en las concentraciones indicadas en esta tesis, produjeron una marcada disminución en la actividad de todas las lipasas estudiadas.