

TS
607

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETA

9-2-80

ENTRADA N.º 49

"BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN PLANTAS SUPERIORES:
EL PAPEL DE LOS ACILTIIOESTERES"

R. 4049



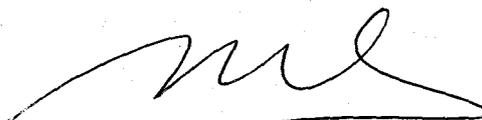
Trabajo que para optar al grado de Doctor en Ciencias presenta el
Licenciado en Ciencias Biológicas Juan Sánchez García.

Sevilla, Febrero de 1980.

"BIOSINTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS SUPERIORES: EL PAPEL DE LOS ACILGlicerol-3-FOSFATOS"

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 8 de Febrero de 1980.



El Catedrático Ponente
Prof. M. Losada Villasante



El autor: J. Sánchez García



El Director del trabajo:
Dr. M. Mancha Perelló
(Investigador del C.S.I.C.)

INDICE.

| | |
|---|----|
| I.- INTRODUCCION TEORICA | 1 |
| I.1.- ESTRUCTURA QUIMICA Y PROPIEDADES DE LOS LIPIDOS | 4 |
| I.1.1.- Los ácidos grasos | 4 |
| I.1.2.- Glicéridos | 7 |
| I.1.3.- Fosfolípidos | 7 |
| I.1.4.- Galactolípidos y sulfolípidos | 9 |
| I.2.- BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN PLANTAS | 11 |
| I.2.1.- Las moléculas portadoras | 12 |
| I.2.2.- Síntesis de los acilCoAs | 14 |
| I.2.3.- La síntesis de novo | 17 |
| I.2.4.- Reacciones de alargamiento | 21 |
| I.2.5.- Desaturación de los ácidos grasos | 22 |
| I.2.6.- Conexión entre los acil-ACPs y los acil-CoAs | 27 |
| I.3.- BIOSINTESIS DE GLICEROLIPIDOS | 29 |
| I.3.1.- Biosíntesis de triglicéridos | 29 |
| I.3.2.- Biosíntesis de fosfolípidos | 31 |
| I.3.3.- Biosíntesis de galactolípidos | 35 |
| I.3.4.- Biosíntesis de sulfolípidos | 38 |
| II.- MATERIAL Y METODOS | 40 |
| II.1.- MATERIALES BIOLÓGICOS | 40 |
| II.2.- OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES | 40 |
| II.2.1.- Obtención del extracto enzimático de girasol | 41 |
| II.2.2.- Aislamiento de cloroplastos de espinaca | 41 |
| II.3.- OBTENCION PREPARATIVA DE ACP DE ESPINACA | 42 |
| II.4.- INCUBACIONES | 44 |
| II.4.1.- Incubación de tejidos intactos | 45 |
| a) Semilla de guisante | 45 |

| | |
|--|----|
| b) Semilla de girasol | 45 |
| c) Hojas de espinaca | 45 |
| II.4.2.- Incubación del extracto enzimático de girasol | 46 |
| II.4.3.- Incubación de cloroplastos de espinaca | 46 |
| a) Cinética de incorporación de radioactividad en relación con la presencia de cofactores en el medio .. | 46 |
| b) El efecto de las concentraciones de ATP y CoA | 47 |
| c) Incubación de cloroplastos en relación con la luz | 47 |
| d) Incubación de cloroplastos aislados de hojas que habían sido preincubadas con ¹⁴ C-acetato | 48 |
| e) Examen del efecto del Triton X-100 y del ClNH ₄ en relación con la presencia de cofactores en el medio .. | 48 |
| f) Ensayo de la actividad del ACP de espinaca | 49 |
| II.5.- PROCEDIMIENTO ANALITICO | 49 |
| II.5.1.- Descripción del método de separación de aciltioésteres . | 49 |
| II.5.2.- Separación de los aciltioésteres y lípidos de los diversos sistemas estudiados | 53 |
| a) Análisis químico de los aciltioésteres de diversos tejidos | 53 |
| b) Semilla de guisante | 55 |
| c) Semilla de girasol | 55 |
| d) Cloroplastos de espinaca | 55 |
| II.5.3.- Extracción de lípidos totales | 56 |
| II.5.4.- Separación de la fracción lipídica por cromatografía en capa fina | 57 |
| II.5.5.- Análisis posicional de los glicerolípidos | 58 |
| II.5.6.- Hidrólisis alcalina de lípidos y aciltioésteres | 59 |
| II.5.7.- Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos .. | 60 |
| II.5.8.- Determinación de la radioactividad | 61 |
| II.5.9.- Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía o radiocromatografía de gases | 63 |

| | |
|---|-----|
| II.5.10.- Separación de los ésteres metílicos por cromatografía en placa de sílice-nitrato de plata | 64 |
| II.5.11.- Determinación de la clorofila | 65 |
| II.5.12.- Determinación de proteína | 66 |
| II.6.- PROCEDENCIA DE LOS PRODUCTOS EMPLEADOS | 67 |
| III.- RESULTADOS Y DISCUSION | 69 |
| III.1.- ANALISIS DE LOS ACILTIÓESTERES DE DIVERSOS ORIGENES | 69 |
| III.1.1.- Interpretación de los cromatogramas | 69 |
| III.1.2.- Resultados | 73 |
| III.1.3.- Discusión | 81 |
| III.2.- BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN LA SEMILLA DE GUISANTE | 85 |
| III.2.1.- Incorporación de radioactividad a las distintas clases de lípidos | 85 |
| III.2.2.- Composición de ácidos grasos de las distintas fracciones | 87 |
| III.2.3.- Análisis posicional | 89 |
| III.2.4.- Separación de series homólogas | 91 |
| III.2.5.- Discusión | 91 |
| III.3.- BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN LA SEMILLA DE GIRASOL | 97 |
| III.3.1.- Incorporación y desaturación del ¹⁴ C-oleato en el tejido intacto | 98 |
| III.3.2.- Incorporación de precursores marcados en diferentes clases de lípidos y aciltioésteres en extractos libres de células | 98 |
| III.3.3.- Análisis posicional de los glicerolípidos | 102 |
| III.3.4.- Composición de ácidos grasos de diferentes fracciones aisladas | 102 |
| III.3.5.- Discusión | 105 |
| III.4.- SINTESIS DE LIPIDOS EN CLOROPLASTOS DE ESPINACA | 109 |
| III.4.1.- Incorporación de ¹⁴ C-acetato en cloroplastos intactos en ausencia de cofactores exógenos | 110 |

| | |
|---|-----|
| III.4.2.- Ensayo de la actividad del ACP de espinaca | 110 |
| III.4.3.- Síntesis de lípidos y aciltioésteres en presencia de cofactores exógenos | 113 |
| III.4.4.- Efecto de las concentraciones de ATP y CoA sobre la la incorporación de radioactividad en lípidos y aciltioésteres | 116 |
| III.4.5.- Variación de la radioactividad asociada a los acil- tioésteres y lípidos de cloroplastos aislados de hojas preincubadas con ¹⁴ C-acetato | 119 |
| III.4.6.- Incorporación de radioactividad en lípidos y acil- tioésteres en relación con la fotofosforilación | 122 |
| a) Papel de la luz en relación con los cofactores exógenos | 122 |
| b) Efecto del Triton X-100 | 123 |
| c) Efecto del cloruro amónico | 134 |
| III.4.7.- Discusión de los resultados | 137 |
| IV.- CONCLUSIONES..... | 147 |
| V.- BIBLIOGRAFIA | 154 |

Abreviaturas utilizadas.

| | | | |
|--------|--------------------------------|-------|----------------------------|
| ACP: | proteína portadora de acilos | PC: | fosfatidilcolina |
| ADP: | adenosindifosfato | PE: | fosfatidiletanolamina |
| AG: | ácido graso | PG: | fosfatidilglicerol |
| AMP: | adenosinmonofosfato | Pi: | fosfato inorgánico |
| ATP: | adenosintrifosfato | PI: | fosfatidilinositol |
| Ci: | curio | PL: | fosfolípido |
| CoA: | coenzima A | PPI: | pirofosfato |
| DG: | diglicérido | PS: | fosfatidilserina |
| DGDG: | digalactosildiglicérido | SAM: | S-adenosinmetionina |
| DGMG: | digalactosilmonoglicérido | SL: | sulfolípido |
| DTT: | ditiotreitól | SQDG: | sulfoquinovosildiglicérido |
| GL: | galactolípido | TG: | triglicérido |
| h: | hora | | |
| M: | concentración molar | | |
| MG: | monoglicérido | | |
| MGDG: | monogalactosildiglicérido | | |
| MGMG: | monogalactosilmonoglicérido | | |
| min: | minuto | | |
| N: | concentración normal | | |
| NADH: | nicotinadeninucleótido | | |
| NADPH: | nicotinadeninucleótido fosfato | | |
| PA: | ácido fosfatídico | | |

I. INTRODUCCION TEORICA.

Los lípidos, sustancias orgánicas-insolubles en agua pero solubles en disolventes apolares, según reza una antigua definición, han sido considerados tradicionalmente como compuestos de un interés mas bien escaso de los cuales el investigador procuraba desembarazarse lo antes posible en el curso del procedimiento de aislamiento de otras sustancias, a partir de materiales biológicos. Realmente el químico orgánico o el bioquímico encontraba grandes dificultades para manipular los lípidos mediante las técnicas clásicas de destilación fraccionada y cristalización, de forma que hubo que esperar al advenimiento de las técnicas cromatográficas mas refinadas para poder abordar con garantías de éxito el estudio de estas sustancias. En este sentido cabe recordar que la cromatografía de gases, técnica de muy amplia aplicación en la actualidad, fue ideada para separar ácidos grasos (James y Martin, 1952), y que la cromatografía en capa fina ha producido sus mayores frutos en el campo de los lípidos (Touchstone y Dobbins, 1978). Efectivamente los grandes avances en la bioquímica de lípidos empezaron a producirse con posterioridad a la aparición de las técnicas cromatográficas citadas, y concretamente en las plantas superiores el número de trabajos publicados se ha multiplicado considerablemente en los últimos 10 años. Sirva como dato que el primer libro monográfico sobre bioquímica de lípidos en plantas no apareció hasta 1971 (Hitchcock y Nichols, 1971), y desde luego continua siendo el texto mas citado en este area de investigación.

En los últimos años hemos asistido tambien a un notable incremento en el número de equipos directamente implicados en bioquímica de lípidos en

en plantas, particularmente en sus aspectos de biosíntesis. Así, mientras que en los primeros años de la década de los 60 el equipo de Stumpf, en Davis, California, y el de James, de los laboratorios de la Unilever, en Inglaterra, eran los principales protagonistas en lo que a biosíntesis de lípidos en plantas superiores se refiere, al final de la década empezaron a aparecer otros nombres en las citas bibliográficas. Entre los más importantes están: Harwood, en Cardiff; Mazliak, en París; Douce, en Grenoble; Leech, en York; Roughan y Slack, en Nueva Zelanda; Beevers, en Santa Cruz, California; Mudd, en Riverside, California; además de otros muchos de más esporádica aparición.

misma
En mi opinión, este considerable aumento del interés por el estudio bioquímico de los lípidos, que como se ha dicho antes ha sido provocado por los avances metodológicos y técnicos en la manipulación de estas sustancias, obedece a dos motivaciones principales. La primera de ellas, de un indudable interés económico, es que un mejor conocimiento de la síntesis de lípidos en semillas y frutos oleaginosos tiene que repercutir necesariamente en una mejora de la cantidad y calidad de los aceites vegetales, productos alimenticios de primer orden y cuyo consumo se encuentra en constante aumento. En segundo lugar, el estudio de los lípidos como constituyentes de las membranas biológicas tiene un interés científico fundamental, pues no se puede olvidar que estas constituyen, sin lugar a duda, el tema de vanguardia en lo que a investigación bioquímica se refiere. Aspectos tales como biogénesis de membranas, transporte de protones y electrones a través de membrana, y su relación con la fosforilación, configuración de los fotosistemas, transporte de metabolitos a través de membrana, y su implicación con la transmisión del impulso nervioso, mecanismo de acción de los enzimas asociados a membranas, etc., ocupan actualmente una buena parte de la investigación, y es que la mayor parte de la materia viva, si excluimos el agua, son membranas, y de estas, un importante porcentaje lo constituyen los lípidos.

Una definición tan ambigua como la expuesta en las primeras líneas de

esta introducción necesariamente incluye una amplia variedad de sustancias químicas, de ahí que modernamente se tienda a restringir la definición para incluir únicamente a aquellos compuestos que derivan de ácidos grasos de cadena larga. Mas concretamente, en la actualidad se consideran lípidos a aquellos compuestos que son ésteres o amidas de ácidos grasos con alcoholes de distinta naturaleza, y este es el criterio que consideraremos en lo que sigue.

La tesis que presentamos está constituida por cuatro trabajos experimentales perfectamente independientes. En el primero de ellos se aborda el análisis químico de los acilglicolípidos de diversos tejidos vegetales. Los otros tres trabajos constituyen sendos estudios acerca de la capacidad de biosíntesis de lípidos y acilglicolípidos en tres sistemas vegetales que consideramos bastante representativos: una semilla en germinación, un extracto enzimático obtenido de una semilla oleaginosa en formación y, finalmente, cloroplastos aislados de hojas de espinaca.

Esta diversidad en el material biológico utilizado tiene una justificación doble. La primera de ellas, y decisiva, se refiere a la disponibilidad de dicho material. Así, mientras que las semillas maduras están realmente disponibles durante todo el año, las semillas en formación, así como los frutos, y las hojas de espinaca están sujetas a un régimen estacional que solo permite su utilización durante una época del año concreta. Esto hace que nos veamos obligados a pasar de un tipo de material a otro en el transcurso del año.

Pero es que además, el estado actual de conocimientos en lo que a rutas de biosíntesis de lípidos se refiere, recomienda el ensayo de diversos tejidos vegetales, en orden a recoger datos que permitan hacer generalizaciones. De hecho solo en los últimos meses se está observando una cierta especialización por parte de algunos equipos implicados en este campo, hasta

ahora los investigadores han actuado en el sentido que hemos comentado, es decir, ensayando tejidos y sistemas muy diversos.

No obstante, en todos estos estudios se ha prestado muy especial atención al papel de los acilglucosídeos, acil-CoAs y acil-ACPs, que de hecho constituyen el motivo central de esta tesis.

Antes de entrar en la parte experimental vamos a hacer un breve resumen de las principales clases de lípidos desde el punto de vista químico, y solo de aquellos que tienen una relación directa con el resto del trabajo que aquí se presenta. A continuación se hará una revisión, asimismo somera, sobre la biosíntesis de ácidos grasos y glicérolípidos en plantas superiores, de modo que podamos situar en su contexto la actuación de los acilglucosídeos. Y a ello vamos a dedicar esta Introducción.

I. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES DE LOS LÍPIDOS.

Como se ha indicado en la introducción solo se van a considerar los ácidos grasos y sus ésteres de la glicerina, y de estos solamente glicéridos, fosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos.

I.1.1.- Los ácidos grasos.-

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena alifática. Si bien en animales es frecuente la presencia de ácidos cortos, de 4 a 10 átomos de carbono, en las plantas la mayor parte de los ácidos grasos presentan de 12 a 30 átomos de carbono, generalmente son de cadena recta y de número par de átomos de carbono. Los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono representan no menos del 90% de los que están presentes en los tejidos vegetales. Esta larga cadena hidrocarbonada es la que confiere a los ácidos grasos, y a los lípidos derivados de estos, su característica insolubilidad en agua. Esta cadena rara vez presenta alguna discontinuidad que no sea la presencia de algún doble enlace, y de ahí la escasa reactividad de estas especies químicas.

En las plantas existen ácidos grasos con uno, dos y hasta tres dobles enlaces, rara vez cuatro. Casi siempre son de configuración "cis", y de existir casi siempre se ubica en la posición $\Delta-9$, esto es, entre los átomos de carbono 9 y 10 contando desde el extremo carboxilo. Si existieran de un doble enlace estos se disponen en dirección al extremo metílico, y normalmente separados por un grupo metileno. La presencia de otros accidentes, tales como grupos funcionales hidroxilo, carboxilo, o ramificaciones, son más bien raras, y generalmente se relacionan con grupos taxonómicos concretos.

Los ácidos grasos más abundantes y ubicuos en las plantas superiores aparecen listados en la Tabla I. La nomenclatura abreviada que aparece en dicha tabla, y en la siguiente, es universalmente utilizada para designar

| Nombre común | Símbolo | Estructura |
|--------------|----------------|---|
| Laúrico | 12:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ |
| Mirístico | 14:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$ |
| Palmitico | 16:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$ |
| Esteárico | 18:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$ |
| Oleico | 18:1 (9) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Linoleico | 18:2 (9,12) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Linolénico | 18:3 (9,12,15) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$. |

TABLA I. Acidos grasos mayoritarios (Hitchcock y Nichols, 1971)

| Nombre común | Símbolo | Estructura |
|--------------|-----------|--|
| Caproico | 6:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ |
| Caprílico | 8:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ |
| Cáprico | 10:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$ |
| Palmitoleico | 16:1 (9) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Margárico | 17:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$ |
| Araquídico | 20:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$ |
| Behénico | 22:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$ |
| Erúxico | 22:1 (13) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$ |
| Lignocérico | 24:0 | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$ |

TABLA II. Acidos grasos minoritarios (Hitchcock y Nichols, 1971)

ácidos grasos. El primer número indica el número de átomos de carbono, el segundo alude al número de dobles enlaces presentes en la molécula y, finalmente, entre paréntesis se especifica la posición de dichos dobles enlaces, empezando por el extremo carboxilo. Otros ácidos grasos, que están ampliamente distribuidos pero casi siempre en cantidades pequeñas, se denominan minoritarios, y una lista de ellos aparece en la Tabla II.

En contraposición con estos dos grupos podemos considerar un tercer grupo, el de los ácidos grasos inusuales, que solo se presentan en grupos taxonómicos muy concretos, y su estructura química se aparta del modelo general por la presencia de algún grupo funcional, tal como ocurre en el ácido ricinoleico, que se corresponde con el ácido oleico pero con un grupo hidroxilo en el carbono 12, y que se presenta en la semilla de Ricinus communis en la que representa el 90 % del total de ácidos grasos (Canvin, 1963); el ácido estercúlico, derivado del oleico pero con un anillo ciclopropano sustituyendo al doble enlace, se presenta en la especie Sterculia foetida dando cuenta del 50 % de los ácidos grasos de la semilla (Wilson y col., 1961); y muchos otros (Hitchcock, 1975).

Digamos, por último, que la composición de ácidos grasos es característica de cada tejido particular, de forma que cada aceite vegetal tiene su propia composición, dentro de un margen de oscilación. Por otra parte, dentro de un mismo órgano vegetal se pueden apreciar diferencias importantes, y así, los ácidos grasos de muy larga longitud de cadena (de 20 a 30 átomos de carbono) son componentes característicos de las ceras que recubren la cutícula de las hojas y algunos frutos y semillas. Mas aún, la composición de ácidos grasos de los distintos tipos de membranas celulares también es característica, encontrándose que por ejemplo las membranas cloroplásticas son especialmente ricas en ácido linolénico (Stumpf, 1975).

I.1.2.- Glicéridos.

Los glicéridos son ésteres de la glicerina y ácidos grasos. Aquellos glicéridos en los que los tres grupos hidroxilo de la glicerina están esterificados por ácidos grasos se denominan triglicéridos (TG). En la naturaleza existen también glicéridos parciales, que solo presentan una o dos posiciones esterificadas, y que se llaman monoglicéridos (MG) y diglicéridos (DG) respectivamente.

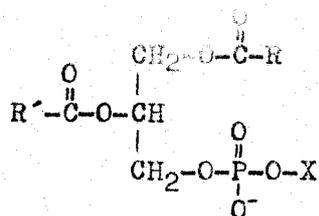
Los glicéridos son los constituyentes mayoritarios de los aceites vegetales, y están esterificados principalmente por los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, predominando los insaturados.

Desde el punto de vista químico, los glicéridos, y particularmente los TG, se caracterizan por su escasa polaridad, ya que no presentan grupos funcionales disociables en su molécula, y reactividad, debido a la gran inercia química de los restos acilo que los esterifican.

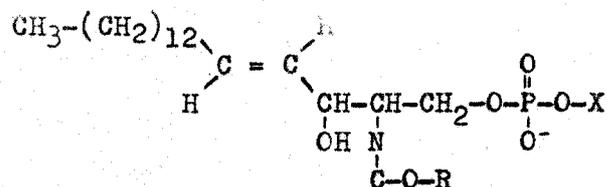
Aunque ampliamente distribuidos por todos los tejidos vegetales, los TG son especialmente interesantes, desde un punto de vista fisiológico, como constituyentes principales de los órganos de reserva de semillas y frutos oleaginosos. En este sentido, estas especies químicas son muy favorables, dado el elevado nivel de reducción que presentan.

I.1.3.- Fosfolípidos.

En la naturaleza existen dos grandes grupos de fosfolípidos, los derivados de la glicerina (fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos) y los derivados de la esfingosina. En la Fig 1 se muestran las fórmulas estructurales de estos dos grandes grupos de sustancias, y en la Tabla III los principales tipos de fosfoglicéridos. En lo que sigue, al hablar de fosfolípidos (PL) debe entenderse que nos referimos a los fosfoglicéridos.



Fosfoglicéridos



Esfingólpidos

FIG 1. Fórmulas generales de los dos tipos de fosfolípidos. R representa restos acilo de distinta naturaleza, y X es una pequeña molécula orgánica tal como las que se exponen en la Tabla III.

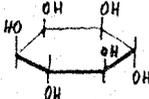
| X | Nómbre | Abrev |
|---|-----------------------------|-------|
| H | Acido fosfatídico | PA |
| $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)$ | Fosfatidilcolina (lecitina) | PC |
| $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ | Fosfatidiletanolamina | PE |
| $\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$ | Fosfatidilserina | PS |
| $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ | Fosfatidilglicerol | PG |
|  | Fosfatidilinositol | PI |

TABLA III. Las principales clases de fosfoglicéridos.

Los fosfolípidos son componentes importantes de todas las membranas celulares, pero las proporciones en que aparecen las distintas clases reseñadas en la Tabla III varían considerablemente de un tejido a otro, e incluso entre los distintos orgánulos celulares (Morre, 1975). Así, mientras que PC, PE y PI se encuentran principalmente en tejidos seminales, el PG se localiza en gran cantidad en los tejidos foliares. (Stumpf, 1976).

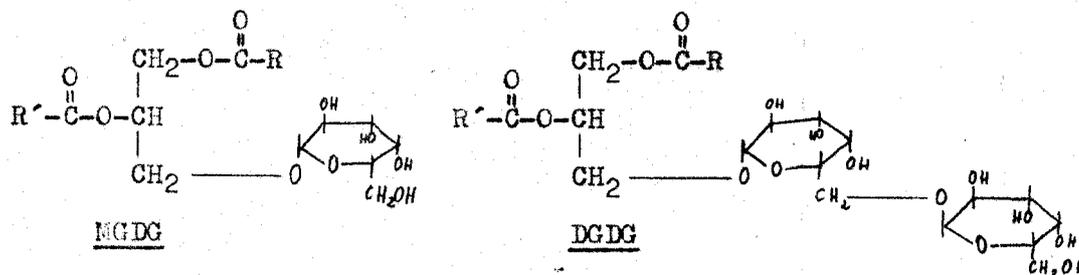
Los fosfolípidos constituyen la clase de lípidos más polares, como se desprende de su fórmula estructural, y en ^{la} ~~su~~ composición de ácidos ^{sus} grasos predominan los más insaturados, característica ésta que probablemente está relacionada con la estructura semifluida de las membranas biológicas, pues debe recordarse que el punto de fusión de los ácidos grasos se relaciona con el grado de insaturación de manera inversa. En este sentido, la incapacidad de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados por parte de la mayoría de las bacterias (Gurr y James, 1976), y su carencia de sistemas membranosos internos, probablemente constituyen dos aspectos de una misma tendencia evolutiva; es decir, es probable que los ácidos grasos poliinsaturados aparecieran en el curso de la evolución por necesidades inherentes a la función de las membranas.

I.1.4.- Galactolípidos y sulfolípidos.

Se reúnen en este apartado dos clases de lípidos que, además de presentar cierta similitud estructural, son constituyentes típicos y mayoritarios de las membranas fotosintéticas.

Los galactolípidos son los más sobresalientes representantes de la clase de los glicolípidos, glicerolípidos que se caracterizan por poseer uno o más residuos de azúcar en su molécula. En los galactolípidos, como

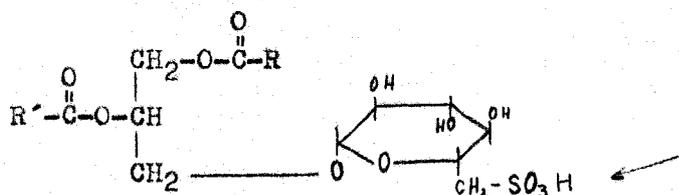
su nombre indica, es la galactosa el azúcar presente. Los dos tipos mas importantes son los monogalactosildiglicéridos (MGDG) y los digalactosildiglicéridos (DGDG), cuyas estructuras se muestran a continuación:



Existen tambien hmólogos con tres o cuatro residuos de galactosa, pero solo se presentan en muy pequeñas cantidades.

Los galactolípidos, MGDG y DGDG, constituyen el porcentaje mas elevado de la fracción lipídica de las membranas cloroplásticas, tanto de la envuelta (Mackender y Leech, 1974) como de las lamelas (Park, 1976), y por tanto representan la mayor proporción de lípidos de cualquier tejido fotosintético (Roughan y Batt, 1969). El ácido linoléico, 18:3, es con mucho el mas abundante ^{en} de los galactolípidos de los tejidos fotosintéticos (Safford y Nichols, 1970).

Bajo el nombre de sulfolípidos se reunen, obviamente, aquellos lípidos que poseen azufre en su molécula. Los mas interesantes de estos son los sulfoquinovosildiglicéridos (SQDG), que pueden ser incluidos en los glicolípidos, por cuanto poseen glucosa en su molécula. Su fórmula estructural se expone a continuación:



Los sulfolípidos, lo mismo que los galactolípidos antes comentados, se presentan típicamente en las membranas fotosintéticas, en las que dan cuenta de un porcentaje notable, y son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, 18:2 y 18:3.

I. 2. BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN PLANTAS.

Como se ha indicado anteriormente, los ácidos grasos mas importantes poseen un número par de átomos de carbono. Desde muy antiguo se pensaba que esta característica debería estar relacionada con el propio mecanismo de síntesis. Con el descubrimiento por parte de Knoop, en 1904, de que los ácidos grasos son degradados en sucesivas unidades de dos átomos de carbono, se empezó a especular que su biosíntesis podría llevarse a cabo, de manera análoga, mediante condensaciones sucesivas de unidades de dos átomos de carbono. Cuando en la década de los 40 se elucidaron las reacciones individuales implicadas en la degradación de los ácidos grasos, la β -oxidación, surgió la idea de que su biosíntesis podría suponer una simple reversión de la ruta de degradación. Aunque pronto se demostró que esta suposición era fundamentalmente errónea, lo que sí quedó establecido es que realmente los ácidos grasos se sintetizan a partir de unidades de dos carbonos, acetato en su forma activada, es decir, acetil-CoA, mediante una secuencia de reacciones que, al parecer, es común a bacterias, levaduras, animales y plantas.

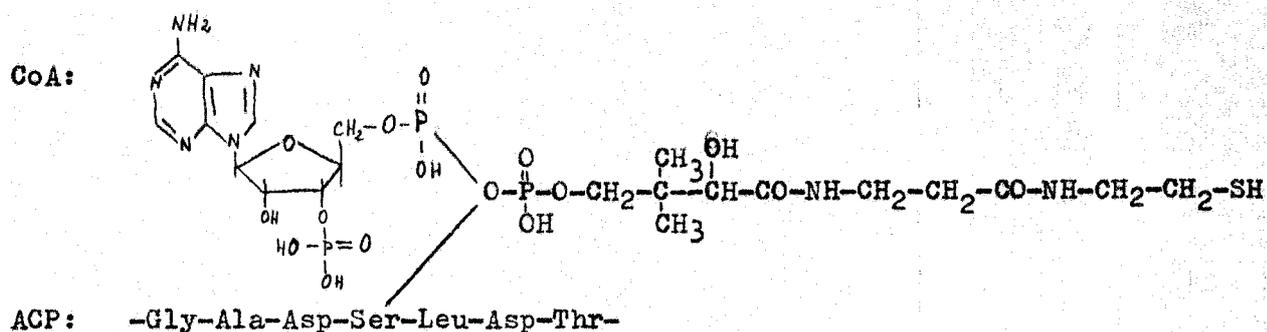
Sin embargo existe una diferencia de organización de los sistemas enzimáticos de síntesis de ácidos grasos entre los grupos de organismos antes citados. Así, mientras que en levaduras y animales los enzimas se organizan en forma de complejo multienzimático, llamado ácido graso sintetasa, y del que no se separan los intermediarios implicados, que por lo tanto no pueden ser aislados, en las bacterias los enzimas se encuentran en forma de unidades discretas, lo que permite el aislamiento de los diferentes intermediarios, así como la caracterización de las diferentes reacciones (Hitchcock y Nichols, 1971).

Con respecto a la sintetasa de ácidos grasos de las plantas se puede decir que, si bien sus reacciones individuales no han sido aun caracterizadas, todo parece indicar, como ya se verá, que está mas próximo al tipo bacteriano, de enzimas soluble y separables, que al tipo animal.

I.2.1.- Las moléculas portadoras.

El metabolismo del acetato y homólogos superiores se caracteriza porque los intermediarios implicados aparecen siempre en forma activada, esto es, unidos mediante un enlace rico en energía, enlace tioéster, a unas moléculas especiales que, en razón a su función, se denominan portadoras. Esta unión tiene un gran significado fisiológico, ya que incrementa la reactividad de unas especies químicas muy inertes, como ya se indicó, y además las hace solubles en el medio acuoso celular (Hitchcock y Nichols, 1971; Gurr y James, 1976). Actualmente se conocen dos moléculas portadoras de acilo: el coenzima A (CoA) y la proteína portadora de acilos (Acyl carrier protein, ACP).

Aunque de naturaleza muy diferente, el CoA es un nucleótido y el ACP una proteína, las dos moléculas presentan un rasgo común: la posesión de un resto 4'-fosfopanteteina, en cuyo grupo sulfidrilo terminal se une el resto acilo. En el ACP, el resto 4'-fosfopanteteina se une al resto serina ubicado en la posición 36 de la secuencia de aminoácidos.



El CoA es el portador de acilos mas ampliamente distribuido en los sistemas biológicos, interviniendo como cofactor en numerosas reacciones enzimáticas que implican la transferencia de acilos. Fue aislado por Lipman y su grupo, al final de la década de los 40, cuando estudiaban la reacción de la piruvatodeshidrogenasa, y su intervención en el metabolismo lípido fue indicada poco despues por Lynen y sus colaboradores, quienes demostraron tambien que el resto acilo se une, mediante un enlace tioéster, al grupo sulfhidrilo terminal de la molécula.

La existencia de un portador proteinico en el complejo sintetasa de ácidos grasos de bacterias fue demostrada al principio de los 60 por Vagelos y su equipo. Este mismo grupo aisló y caracterizó el ACP de E.coli, encontrandose que era una pequeña proteína globular, termoestable y de un peso molecular aproximado de 9.000, y en la que abundaban los aminoácidos acídicos, siendo su punto isoeléctrico de 3,6.

La existencia y requerimiento de una proteína análoga en las plantas fue primeramente demostrada por Overath y Stumpf (1964) utilizando preparaciones de aguacate, en las que la síntesis de ácidos grasos se incrementaba notablemente agregando ACP bacteriano. Un requerimiento similar fue demostrado poco despues por Brooks y Stumpf (1966) en los cloroplastos de lechuga y espinaca. Finalmente, el aislamiento y caracterización de ACPs vegetales fue llevado a cabo por el equipo de Stumpf a partir de hojas de espinaca y mesocarpio de aguacate (Simoni y col. 1967), y la elucidación parcial de la secuencia de aminoácidos del ACP de espinaca (Matsumura y Stumpf, 1968) demostró que el entorno próximo al resto serina 36, mostrando arriba, era idéntico al del ACP bacteriano.

Se ha demostrado, así mismo, que los ACPs bacteriano y vegetal son intercambiables con sus respectivas sintetetasas (Simoni y col., 1967), hasta tal punto que el ACP aislado de E.coli es mas activo que el de las

hojas de espinaca cuando se ensaya con la sintetasa de ácidos grasos de los propios cloroplastos de espinaca, de modo que es el ACP bacteriano, facilmente aislable, el que se suele utilizar en los ensayos de biosíntesis de ácidos grasos en plantas. Estos hechos, apoyan indirectamente la presunción, expuesta anteriormente, de que la sintetasa de los vegetales es del tipo bacteriano, es decir, enzimas separados y solubles.

I.2.2.- Síntesis de los acil-CoAs.

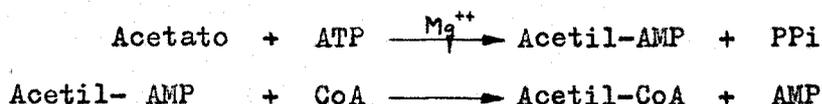
Como ya se ha indicado, consideraciones termodinámicas y de solubilidad determinan que los restos acilo deben encontrarse en forma activada para poder intervenir en las reacciones metabólicas. La activación de las moléculas acílicas se produce con la intervención de una familia de enzimas llamados tiokinasas, que las unen al CoA mediante un enlace tioéster rico en energía. Actualmente se concen tres tiokinasas distintas que difieren en especificidad de sustrato: la acetil tiokinasa (EC 6.2.1.1) que actua sobre acetato y propionato, la tiokinasa general (EC 6.2.1.2) que actua sobre ácidos grasos de 4 a 12 átomos de carbono, y tiokinasa de ácidos grasos de cadena larga (EC 6.2.1.3) que puede actuar sobre ácidos grasos de 8 a 18 átomos de carbono (Hitchcock y Nichols, 1971; Gurr y James, 1976).

La acetil tiokinasa, o acetil-CoA sintetasa, cataliza la siguiente reacción:



El enzima fue estudiado primero en tejidos animales, por el equipo de Lipman, y en levaduras. En las plantas superiores fue encontrado por Rebeiz y col. (1965) en la fracción soluble de cotiledones de cacahuete en germinación; posteriormente fue purificado parcialmente a partir de tubérculos de patata y estudiado desde el punto vista cinético por Huang y Stumpf (1970)

quienes demostraron que el enzima sigue una cinética iso Ping Pong Bi-Uni Uni Bi, igual que el enzima de levadura anteriormente estudiado:



Aun cuando este sistema enzimático ha demostrado operar muy activamente en todos los tejidos, de hecho el ^{14}C -acetato es el precursor mas ampliamente utilizado en estudios de síntesis de lípidos, desde que Newcomb y Stumpf (1952) demostraron su incorporación en cotiledones de cacahuete, en la célula viva debe tener una importancia secundaria, toda vez que el acetato libre no es un metabolito habitual en la célula. La principal fuente de acetil-CoA en la célula muy probablemente proviene de los carbohidratos, por via glucolítica, siendo el piruvato el precursor inmediato, según se desprende de los resultados obtenidos por Yamada y Nakamura (1975) y Murphy y Leech (1978) en cloroplastos de espinaca, ya que se mostraron capaces de incorporar $^{14}\text{CO}_2$ en ácidos grasos. Por el contrario, los resultados obtenidos por Sherrat y Givan (1973) con cloroplastos de hojas de guisante indican la incapacidad de estos para incorporar $^{14}\text{CO}_2$ en los ácidos grasos, lo que indica que estos cloroplastos no poseen el sistema glucolítico implicado en la conversión de los azúcares fotosintetizados en acetil-CoA, aunque, como dichos autores señalan, no se puede excluir la participación de enzimas extracloroplásticas que contribuyan al suministro de acetil-CoA en el cloroplasto in vivo.

La acil-CoA sintetasa de cadena larga, que actua sobre ácidos grasos de 8 a 18 átomos de carbono, en las plantas está asociada con la fracción microsómica (Hitchcock y Nichols, 1971), y ha sido detectada en el endospermo de semillas de ricino por Yamada y Stumpf (1965). Mas recientemente, Roughan y Slack (1977) han demostrado actividad aciltiokinasa en las envueltas de los cloroplastos de espinaca aislados. Estas tiokinasa parece que

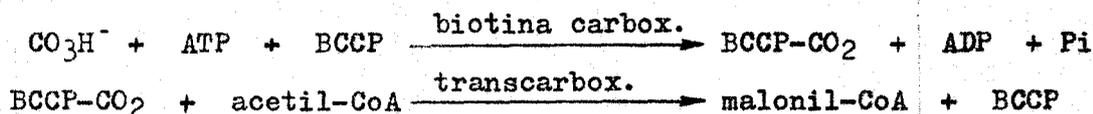
parece que desempeñan un importante papel en el sistema de conexión entre los acil-ACPs y los acil-CoAs (Shine y col., 1976), como se discutirá mas adelante (pag.).

Una reacción clave en la biosíntesis de ácidos grasos es la mediada por la acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2):



El enzima ha sido estudiado principalmente por el equipo de Stumpf. Aislado y purificado primeramente por Hatch y Stumpf (1961) a partir de germen de trigo, su existencia ha sido demostrada posteriormente en otros muchos tejidos (Harwood, 1975).

El enzima bacteriano está constituido por tres subunidades: a) la proteína portadora de carboxilo con biotina (BCCP), b) la biotina carboxilasa, y c) la transcarboxilasa (Stumpf, 1975) que catalizan las siguientes reacciones:



En los cloroplastos de espinaca Kannangara y Stumpf (1972) demostraron la existencia de una carboxilasa de tipo bacteriano, con la particularidad de que el primer componente, BCCP, está unido a la membrana del tilakoide, mientras que los otros dos componentes se encuentran solubles en el estroma.

Más recientemente se ha demostrado el efecto activador de los cationes K^+ y Rb^+ sobre la acetil-CoA carboxilasa (Nielsen y Stumpf, 1976) de germen de trigo, y posteriormente los mismos autores han confirmado el requerimiento de K^+ a la vez que realizaban la caracterización del enzima por electroforesis en gel (Nielsen y col., 1979).

Como se verá a continuación, el malonato es realmente el donador de las unidades de dos átomos de carbono en la síntesis de ácidos grasos, en un proceso en el que se produce la pérdida, por descarboxilación, del mismo átomo de carbono incorporado en la reacción de la carboxilasa.

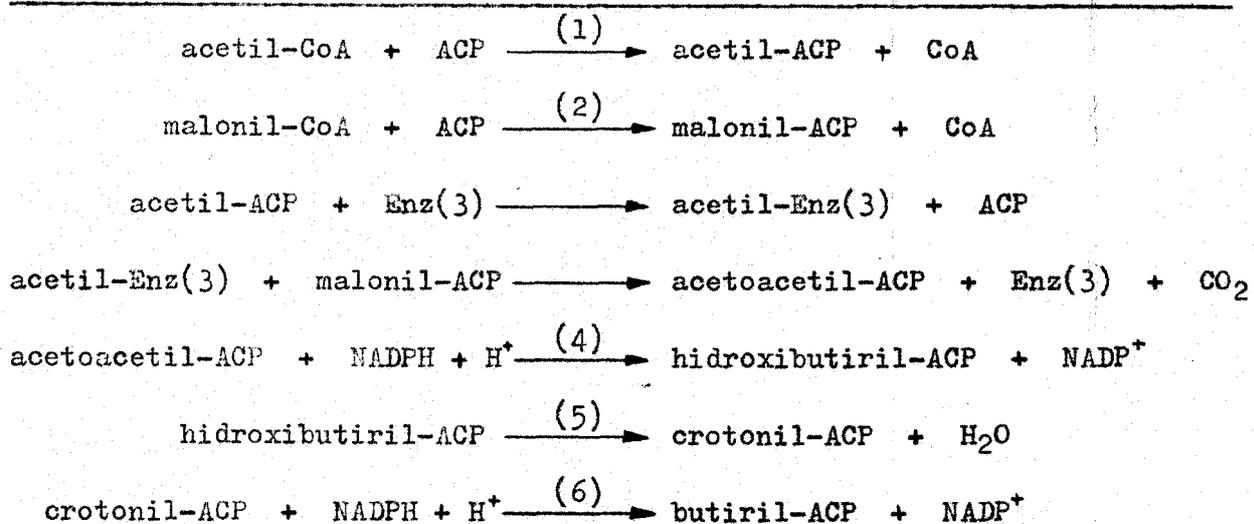
I.2.3.- La síntesis de novo.

Bajo este nombre se designa al conjunto de reacciones que, mediante condensaciones sucesivas de unidades de dos átomos de carbono, conduce a la síntesis de ácido palmítico.

En las plantas, así como en las bacterias, todos los intermediarios implicados en el sistema aparecen unidos al ACP, así como el donador de unidades de dos átomos de carbono, que según se indicó antes, es el malonato. Por otra parte, el sistema enzimático de plantas y bacterias se presenta en forma de unidades disociables y solubles, al contrario que la sintetasa de ácidos grasos de animales y levaduras que aparecen en forma de complejo multienzimático no disociable (ver pag. 11).

Las etapas individuales de la ruta de síntesis de novo en E.coli, delucidadas por Vagelos y su equipo en los primeros años de la década de los 60, se ordenan según la secuencia mostrada en la Fig. 2 (pag. 18).

En las plantas, aunque no demostradas hasta la fecha, parece ser que opera la misma secuencia (Harwood, 1975). Es de destacar que la molécula de CO_2 desprendida en la condensación entre acetato y malonato es la misma que se incorporó al malonil-CoA en la reacción de la acetil-CoA carboxilasa, lo que implica que no hay fijación neta de CO_2 ; esta estrategia tiene un claro significado, pues desplaza considerablemente la reacción mediada por el enzima condensante (Fig. 2, enz.3).



- (1) Acetil transacilasa
- (2) Malonil transacilasa
- (3) β -cetoacil-ACP sintetasa (enzima condensante)
- (4) β -cetoacil-ACP reductasa
- (5) Enoil-ACP hidratasa
- (6) Enoil-ACP reductasa

FIG. 2. Secuencia de reacciones enzimáticas que constituyen el sistema de síntesis de novo de la bacteria E.coli.

Esta serie de reacciones, actuando siete veces consecutivas, origina palmitil-ACP, que es el producto final de la síntesis de novo. En todos los ciclos el malonil-ACP es el donador directo de unidades de dos carbonos, de modo que el acetato solo es donador directo de los dos primeros átomos de carbono, que son los que constituyen el extremo metílico de la molécula de palmitato.

La síntesis de novo a partir de acetato, malonato y otros sustratos ha sido repetidamente verificada en muy diversos sistemas vegetales (Harwood, 1975; Stumpf, 1975). En un trabajo pionero, Macey y Stumpf (1968) estudiaron la síntesis de ácidos grasos, a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, en homogenados crudos y fracciones celulares, obtenidos por centrifugación diferencial, de semillas de guisante en germinación. Demostraron que todos los sistemas requieren ACP, piridín nucleótidos reducidos si se utiliza malonil-CoA, pero si el sustrato es acetil-CoA se requiere además la presencia de ATP, Mg^{++} y CO_2 .

Posteriormente Huang y Stumpf (1971) caracterizaron una sintetasa soluble en tubérculos de patata, y Harwood y Stumpf (1972) estudiaron la síntesis de ácidos grasos en distintas fracciones subcelulares, aisladas de diferentes tejidos y especies, a partir de acetato y malonil-CoA, y comprobaron que las fracciones solubles solo son capaces de sintetizar ácidos grasos a partir de malonil-CoA, indicando que carecen de acetil-CoA carboxilasa. Además, la capacidad de síntesis de palmitato a partir de malonil-CoA fue también demostrada en una fracción proteica soluble de mesocarpo de aguacate (Harwood y Stumpf, 1972), y más recientemente, Porra y Stumpf (1976) han demostrado la síntesis de palmitato, a partir de acetato y de malonato, en un extracto celular, conteniendo las fracciones soluble y microsómica, de semillas de soja en germinación y en desarrollo; los dos sistemas requerían ACP, ATP, CoA y nucleótidos reducidos. Los co-

factores ATP y CoA son requeridos para la activación del precursor, por lo que se hacen innecesarios cuando se utiliza malonil-CoA como sustrato (Bolton y Harwood, 1977a).

De todo lo dicho se colige que el sistema de síntesis de novo se localiza en la fracción soluble, y que puede funcionar a partir de malonato, siempre que se cumplan los requerimientos de ACP, ATP, CoA, NADPH y Mg^{++} , pero no a partir de acetato, pues tales fracciones no poseen la capacidad de carboxilar el acetato (pag. 16).

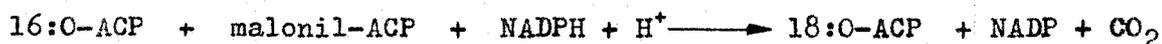
Por otra parte, la capacidad de síntesis de ácidos grasos a partir de acetato ha sido confirmada en multitud de ocasiones por muy diversos investigadores (Stumpf, 1975) y por nosotros mismos, como se verá mas adelante, desde que fuera demostrada por primera vez (Smirnov, 1960). Ciertamente los cloroplastos asimilan perfectamente el acetato en presencia de luz, y lo incorpora principalmente en ácidos grasos. La influencia de diferentes factores y los requerimientos para la síntesis de ácidos grasos en cloroplastos fueron estudiados por Nakamura y Yamada (1975a,b), quienes demostraron el requerimiento de luz, CoA, CO_3H^- , $PO_4H^?$, e iones Mg^{++} y Mn^{++} . El sistema resultó ser altamente estimulado por el ATP, que podía ser sustituido por ADP y Pi. No se encontró requerimiento de piridinucleótidos reducidos. En los cloroplastos rotos la síntesis era mucho menos eficaz. Efectivamente los plastidios han demostrado ser el sitio de mayor actividad de síntesis de ácidos grasos en mesocarpo de aguacate (Weaire y Kekwick, 1975), semillas de ricino en germinación (Vick y Beevers, 1978), cultivos de células de soja en suspensión (Nothelfer y col., 1977), etc. También se ha demostrado una alta actividad de síntesis de ácidos grasos en los cromoplastos aislados (Kleinig y Liedvogel, 1978).

Por último decir que recientemente se ha demostrado la capacidad de síntesis de ácidos grasos, a partir de malonil-CoA, en la fracción microsómica de semillas de guisante en germinación (Bolton y Harwood, 1977b).

I.2.4.- Reacciones de alargamiento.

Como se indicó anteriormente (pag. 4), los ácidos grasos de 18 átomos de carbono dan cuenta de la mayor proporción de los ácidos grasos de la célula; además, los ácidos de 20 o más átomos de carbono son componentes habituales, aunque minoritarios, de todos los tejidos, y son particularmente abundantes en las ceras. Es obvio, por lo tanto, que el producto de la síntesis de novo, el palmitato, debe sufrir alargamiento para dar origen a estos ácidos grasos de cadena muy larga.

Se ha podido demostrar que el alargamiento del ácido palmítico se realiza, como en la síntesis de novo, por la adición de malonato con desprendimiento de CO₂, siendo el sustrato específico el palmitil-ACP, y el producto estearil-ACP, reacción que requiere NADPH (Jaworski y col., 1974):



En el sistema parece estar implicada la misma secuencia descrita en la síntesis de novo (pag. 18), esto es, condensación-reducción-deshidratación-reducción. Sin embargo, se trata de un sistema distinto, que es más sensible al calor que las reacciones de la ruta de novo, tiene pH óptimo diferente y presenta distinto comportamiento frente a los inhibidores. Se localiza también en la fracción soluble.

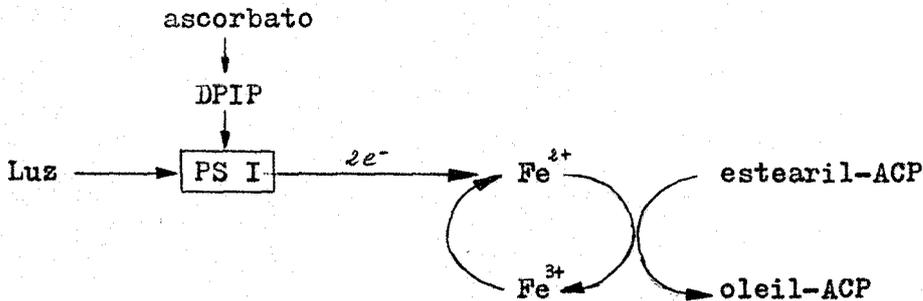
El posterior alargamiento del ácido esteárico se realiza en la fracción microsómica (Macey y Stumpf, 1968; Harwood y Stumpf, 1971; Bolton y Harwood, 1977b), siendo el malonil-CoA el donador de los dos carbonos. En ninguno de los trabajos citados se dice cuál es el portador implicado en el sistema. Muy recientemente, Ohlrogge y col. (1978), trabajando con un material nuevo de gran interés económico, la semilla de jojoba (Simmondsia chinensis), han sugerido que el alargamiento de 18:1, para dar los ácidos grasos largos, de los que derivan los alcoholes grasos característicos de esta semilla, se realiza a nivel de la celda. La semilla es

rísticos de estas semillas, se realiza a nivel del CoA. Mas notable es el hallazgo de Vance y Stumpf (1978), en la fracción soluble de los cloroplastos de espinaca, de un sistema capaz de alargar diversos acil-CoAs de cadena larga utilizando acetil-CoA como donador, en un proceso que, aparentemente, se lleva a cabo por reversión de las reacciones características de la β -oxidación.

I.2.5.- Desaturación de los ácidos grasos.

La formación de oleato fue estudiada primeramente en levaduras (Bloomfield y Bloch, 1960) y en células hepáticas de rata (Marsh y James, 1962), y en ambos sistemas se encontró que la transformación era catalizada por un sistema enzimático unido a membrana, y que el sustrato específico era estearil-CoA. Posteriormente se aisló el sistema enzimático responsable de la síntesis de oleato de Euglena gracilis y de cloroplastos de espinaca (Nagai y Bloch, 1968) y de cotiledones de soja (Rinne, 1969), demostrándose que eran proteínas solubles.

La naturaleza del sustrato implicado en la reacción no fue establecida hasta fecha reciente, en que Jaworski y Stumpf (1974) demostraron que la fracción soluble aislada de semillas de cártamo en formación cataliza la desaturación de estearil-ACP a ácido oleico, en una reacción que requiere la presencia de ferredoxina, NADPH y O_2 . En un trabajo independiente, investigadores del grupo de Stumpf (Jacobson y col., 1974), estudiaron la estearil-ACP desaturasa (EC 1.14.99.6) presente en la fracción estrómica de los cloroplastos de espinaca, y demostraron la especificidad de sustrato y el requerimiento de ferredoxina, y también que el requerimiento de NADPH podía ser cumplimentado por un sistema constituido por membranas de grana, ascorbato, diclorofenolindofenol y luz. En base a esto, Stumpf (1977) propuso el siguiente esquema para la reacción:



Parece ser que la ferredoxina es el donador directo de electrones, y que el NADPH funciona como reductor de la ferredoxina.

Más recientemente, Stumpf y Porra (1976) han estudiado el enzima presente en la fracción soluble de semillas de soja en desarrollo, confirmando los requerimientos antes citados y la gran afinidad del enzima por el O_2 . Estos autores ensayaron, además de estearil-ACP, ácido esteárico libre y estearil-CoA, encontrándose que eran totalmente inactivos.

La formación de ácido linoleico, 18:2, en plantas ha originado la más interesante discusión que se ha producido en este área de investigación en la década de los 70. El inicio de la discusión hay que situarlo en 1969, año en el que Gurr y col. (1969) encontraron que cuando se incuban células de Chlorella vulgaris con ^{14}C -oleato la mayor parte de la radioactividad (más del 75 %) se incorpora a los lípidos complejos en solo 2 min, y que hay que esperar hasta 5 min para poder detectar ^{14}C -linoleato, que aparece unido a la PC, y 30 min para que aparezca como ácido grasos libre. Todo parecía indicar que el 18:1 unido a la PC, oleil-PC, es el verdadero sustrato para la desaturación, hipótesis que se vio reforzada por otros trabajos del mismo equipo (Gurr y Brawn, 1970; Appleby y col., 1971). Independientemente, y por las mismas fechas, Roughan (1970) estudió la formación de ácidos grasos y lípidos en la hoja de calabaza, a partir de $^{14}CO_2$ y ^{14}C -acetato, encontrando que la PC es el lípido que presenta mayores actividades específicas al comienzo de la incubación, y que posteriormente esta actividad específica decaía exponencialmente; ningún otro lípido pre-

24 -

sentaba un turnover tan acentuado. El estudio de la variación de la composición de ácidos grasos marcados de la PC a lo largo del tiempo, también resultaba consistente con la hipótesis enunciada por Gurr y colaboradores el año antes.

Así las cosas, en 1971 aparece un trabajo de Vijay y Stumpf (1971), que sería seguido inmediatamente por otro más (Vijay y Stumpf, 1972), en el que, en base a unas investigaciones realizadas incubando microsomas de cártamo con oleil-CoA, sugieren que el oleil-CoA es el verdadero sustrato de la desaturación, siendo el linoleil-CoA el producto. Conviene resaltar que la evidencia experimental presentada por estos autores descansaba en el análisis de los acilglucosídeos, formados durante la incubación, por el método de Barron y Mooney (1968), y que este método, como demostraron Nichols y Safford (1973), presenta interferencia por parte de los oxiglucosídeos más polares.

Las dos hipótesis comentadas solo se contradicen en la naturaleza del sustrato y del producto de la reacción, habiendo acuerdo en que el enzima se localiza en la fracción microsómica y que requiere la presencia de NADPH y O₂.

La hipótesis de Stumpf fue asumida por Mazliak y su grupo, quienes estudiaron la oleato desaturasa de tubérculo de patata (Abdelkader y col., 1973) demostrando los requerimientos ya citados y las condiciones óptimas para la reacción; demostraron, así mismo, la incapacidad del sistema para llevar a cabo la desaturación del ácido oleico libre, y que el linoleato formado a partir del oleil-CoA adicionado se incorpora principalmente a la PC. El enzima es sensible al cianuro e insensible al CO (Kader, 1977).

Por otra parte, la evidencia acumulada en favor de la hipótesis de Gurr es bastante amplia. Roughan (1975) aportó nueva evidencia en torno a la implicación de la PC en la desaturación de oleato en la hoja de calabaza. Slack y Roughan (1975) estudiaron entonces la variación en la radio-

actividad incorporada a los distintos glicerolípidos cuando las hojas de maiz, incubadas con ^{14}C -acetato, eran privadas del precursor radioactivo, y encontraron una disminución en la cantidad de 18:1 y 18:2 asociados con la PC y un aumento concomitante en 18:2 y 18:3 de MGDG. Un trabajo posterior de este mismo equipo (Slack y col., 1976) aportó una evidencia mas directa en favor de la hipótesis de Gurr, demostrando que cuando se incubaba el homogenado de hojas de guisante con ^{14}C -oleil-CoA, este se metaboliza completamente en solo 5 min, incorporandose principalmente a la PC, mientras que la desaturación a 18:2 procede linealmente durante una hora. Otras evidencias, mas o menos directas, en favor de la implicación de la PC en la desaturación del ácido oleico en tejidos foliares han aparecido mas recientemente, entre ellas: Williams y col. (1976), Bolton y Harwood (1978) y Wharfe y Harwood (1978).

La objeción mas fuerte a la hipótesis de Stumpf, aparecida recientemente, ha sido publicada por los suecos Stymne y Appelqvist (1978). Estos autores encontraron que cuando se incuban microsomas obtenidos de semillas de cártamo en desarrollo, el mismo sistema utilizado por Vijay y Stumpf (1971), con ^{14}C -oleil-CoA, el resto acilo se incorpora rapidamente a la PC de las membranas microsómicas, de forma que a los 10 min de incubación el precursor radioactivo está practicamente agotado, y sin embargo la desaturación a 18:2 aumenta considerablemente con posterioridad a dicho tiempo, resultados similares a los obtenidos por Slack y col. (1976) según hemos visto.

Recientemente, Slack y col (1978), utilizando semillas de soja, lino y cártamo, en experimentos de tipo cinético de doble marcaje, con ^{14}C -acetato y ^3H -glicerol, han aportado nuevo apoyo a la hipótesis de desaturación a nivel de la PC.

Resumiendo se puede decir que la desaturación de ácido oleico en las

en las plantas, los animales no poseen la capacidad de sintetizar linoleico, tiene lugar con el sustrato, oleato, unido a la PC de las membranas microsómicas, aunque es posible que exista una reacción secundaria en la que el sustrato sea el oleil-CoA.

Finalmente añadir que el Prof. Stumpf, promotor de la hipótesis de desaturación a nivel del CoA, ha guardado un significativo silencio en los últimos 5 años con respecto a este asunto, y que en un trabajo suyo recientemente aparecido (Murphy y Stumpf, 1979) asume completamente la hipótesis de la PC, sin citar siquiera los dos trabajos que dieron origen a esta interesante polémica (Vijay y Stumpf, 1971; Vijay y Stumpf, 1972).

Actualmente disponemos de escasa información acerca de la síntesis de ácido linolénico, 18:3, siendo como es el ácido graso más abundante, e interesante, de la naturaleza, y es que su formación directa in vitro aun no ha sido demostrada. Existe evidencia de que ciertos tejidos fotosintéticos pueden desaturar el ácido linoleico añadido exogenamente (Cherif y col., 1975), lo que sugiere que el paso de 18:2 a 18:3 supone un nuevo eslabón en la desaturación secuencial de los ácidos grasos de 18 átomos de carbono. Sin embargo la naturaleza del sustrato implicado en la reacción es, todavía materia de especulación. Nichols y Moorhouse (1969) apuntaron la posible implicación del MGDG en las reacciones de desaturación de ácidos grasos en Chlorella vulgaris, y Roughan (1975) sugirió la posible participación de la PC en la desaturación del ácido linoleico. Sin embargo, resultados muy recientes parecen excluir la participación de la PC en la desaturación de 18:2 a 18:3 en tejidos foliares (Harwood, 1977; Wharfe y Harwood, 1978).

Una ruta totalmente distinta, implicando desaturaciones a nivel de los ácidos grasos de 12 átomos de carbono, para producir 12:3, y posterior alargamiento de este hasta 18:3, fue sugerido por Stumpf y su equipo (Ka-

nnangara y col., 1973; Jacobson y col., 1973), aunque sus resultados no han sido posteriormente ratificados.

I.2.6.- Conexión entre los acil-ACPs y los acil-CoAs.

En las páginas anteriores se ha tratado de poner de manifiesto el destacado papel que desempeñan las moléculas portadoras, ACP y CoA, en la síntesis de los diferentes ácidos grasos. Hemos visto como los acil-ACPs son los sustratos implicados en las reacciones de la síntesis de novo, el alargamiento a esteático y la desaturación de este para dar ácido oleico. Los acil-CoAs han sido propuesto como sustrato y producto de la oleato desaturasa y de las reacciones de alargamiento que dan origen a ácidos grasos de 20 o mas átomos de carbono. Además de ello, como veremos inmediatamente, los acil-CoAs son sustratos de numerosas transferasas implicadas en el metabolismo de diferentes glicerolípidos.

Todos estos hechos implican la necesidad de un mecanismo de conexión entre los acil-ACPs y los acil-CoAs. Un mecanismo tal ha sido sugerido por Shine y col. (1976), quienes resumieron su hipótesis en el esquema que aparece en la Fig 3.

Como puede verse, el sistema de conexión propuesto por estos autores implica la actuación de una aciltioesterasa, que libera los ácidos grasos unidos al ACP, y una aciltiokinasa, que une los ácidos grasos liberados al CoA, originando acil-CoAs. Ambos enzimas estan ampliamente distribuidos por los tejidos vegetales.

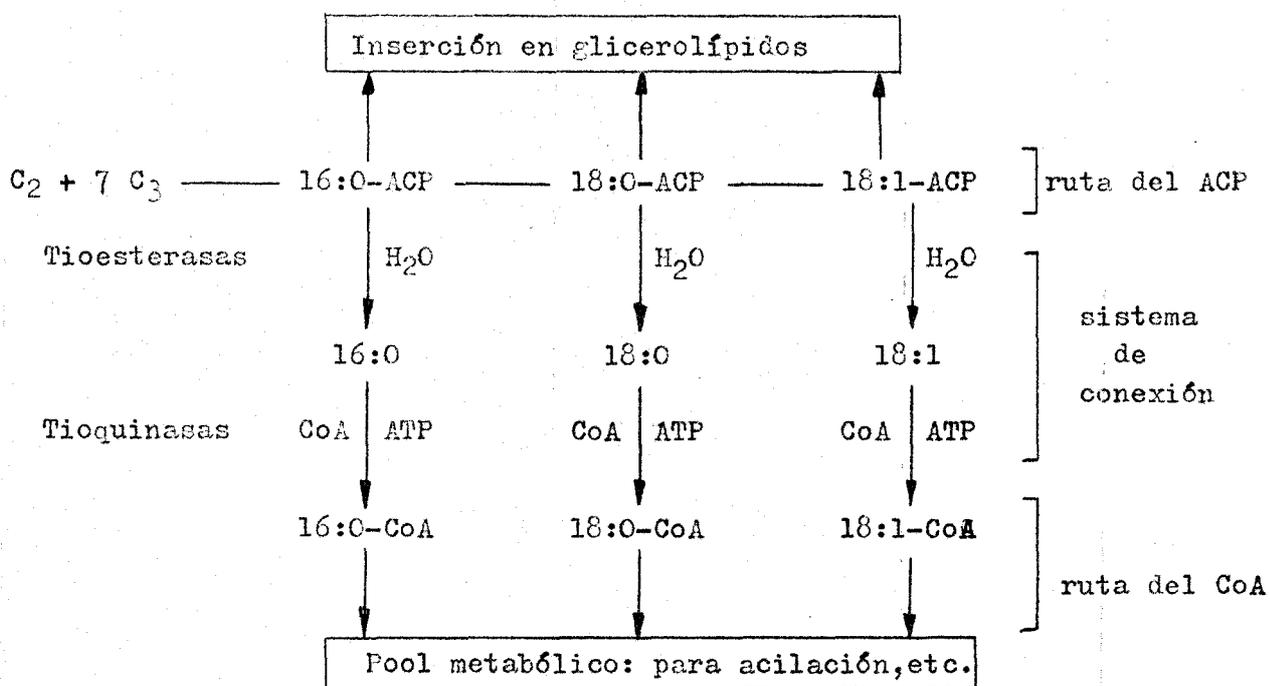


FIG. 3. Sistema de conexión entre los acil-ACPs, formados en la ruta de síntesis de novo, alargamiento a estearato y desaturación a oleato, y los acil-CoAs. (Shine y col., 1976).

I.3.- BIOSINTESIS DE GLICEROLÍPIDOS.

La mayor parte de los ácidos grasos formados en las reacciones antes descritas se incorporan, por medio de las aciltransferasas, en los glicerolípidos: glicéridos, fosfoglicéridos y glicolípidos principalmente. La evidencia acumulada indica que el L- α -glicerofosfato es el aceptor inicial de restos acilo para la síntesis de las diferentes clases de lípidos antes citados, y que el ácido fosfatídico es el intermediario común (Hitchcock y Nichols, 1971). Esta ruta, propuesta originalmente por el americano Kennedy para E.coli, ha demostrado ser operativa en numerosos y diversos tejidos vegetales. En las páginas que siguen se revisan los aspectos mas interesantes, desde el punto de vista de la participación de los aciltioésteres, de la biosíntesis de los glicerolípidos mas abundantes en las plantas superiores: TG, PL, GL y SL.

I.3.1.- Biosíntesis de triglicéridos.

Los TG constituyen, como ya se ha dicho, la sustancia de reserva de los frutos y semillas oleaginosos, y son, por lo tanto, los componentes mayoritarios de los aceites vegetales extraídos de ellos. Sin embargo, a pesar de su indudable interés económico, los estudios sobre biosíntesis de TG en semillas y frutos oleaginosos son mas bien escasos.

Barron y Stumpf (1962) demostraron la formación de ácido fosfatídico, a partir de glicerofosfato, en la fracción microsómica de mesocarpo de aguacate, y que dicho intermediario era posteriormente transformado en DG y finalmente en TG. El origen de las gotas de aceite, características de las semillas oleaginosas, fue investigado por Harwood y col. (1971), quienes las aislaron de semillas de ricino en formación y demostraron que contenían los enzimas de la sintetasa de ácidos grasos y los de la síntesis de TG.

Posteriormente, Gurr y col. (1974) y Appleby y col. (1974) estudiaron específicamente la síntesis de TG en semillas oleaginosas de Crambe abyssinica; en este tejido el precursor marcado se incorporaba inicialmente en PL y DG, y más tarde en TG, conforme a la secuencia antes expuesta; así mismo demostraron la capacidad de síntesis de ácidos grasos y TG en la fracción grasa obtenida por flotación al centrifugar el homogenado crudo.

Los TG de reserva de las semillas oleaginosas presentan muy poca actividad metabólica, medida como capacidad de turnover, como ocurre con los TG del tejido adiposo de los mamíferos (Appelqvist, 1975).

Con respecto a los donadores de acilos para la esterificación del glicerófosfato, desde el pionero trabajo de Kennedy se acepta que los acil-CoAs suministran los restos acilo para las dos primeras esterificaciones, las que dan lugar al ácido fosfatídico. Por el contrario la acilación de la posición 3 de los 1,2-DG puede ser acilada tanto por los acil-CoAs como por los acil-ACPs (Shine y col., 1976), mostrando ambos tioésteres una eficacia similar para la acilación.

Los últimos resultados llegados hasta nosotros (Slack y col., 1978) sugieren que los TG de las semillas de soja, cártamo y lino provienen de la PC, y no del ácido fosfatídico, a través de los DG. Por el contrario, Porra (1979), utilizando homogenados de semillas de soja incubados con ^{14}C -glicerol-3-fosfato encontró poca radioactividad en la fracción de PC, y propuso que la síntesis de TG en semillas oleaginosas se realiza a través del ácido fosfatídico, según la ruta propuesta por Kennedy.

I.3.2.- Biosíntesis de fosfolípidos.

La biosíntesis de esta importante clase de lípidos está en relación directa con la biogénesis de membranas biológicas, de las que son componentes fundamentales. No es de extrañar, por tanto, que el asunto haya atraído la atención de numerosos investigadores, y que hoy dispongamos de un considerable volumen de información al respecto. No obstante, la mayor parte de esta información procede de los estudios llevados a cabo con sistemas animales y microbianos, bastante menos es lo que se conoce acerca de la biosíntesis de fosfolípidos en plantas superiores. Es evidente que para comprender mejor el mecanismo de ensamblaje de las membranas biológicas es necesario profundizar en el conocimiento de la síntesis de fosfolípidos en las plantas, pues no debe olvidarse que la capacidad de síntesis de ácidos poliinsaturados, componentes esenciales de las membranas y que les confieren su característica fluidez, solo la poseen las células vegetales, y es que, como decíamos antes, la evolución de los ácidos grasos, hacia especies cada vez más insaturadas, y la de las membranas biológicas, quizás estén relacionadas.

Las rutas biosintéticas que originan las distintas clases de PL_{es} están, como cabía esperar, estrechamente relacionadas, siendo el ácido fosfatídico el intermediario común. El esquema general, que se desprende de los estudios realizados con animales, bacterias y levaduras, se expone en la Fig 4 para que sirva de telón de fondo para la discusión.

De la visión del cuadro se pueden extraer algunas conclusiones. Como ya se ha indicado, el ácido fosfatídico, formado según la ruta propuesta por Kennedy, es el intermediario común para la síntesis de todos los PL. Con respecto a su formación en plantas hay que indicar que, tal como se indica en la Fig. 4, la segunda acilación de la molécula de glicerofosfato se realiza por un acil-CoA, según demostraron Shine y col.

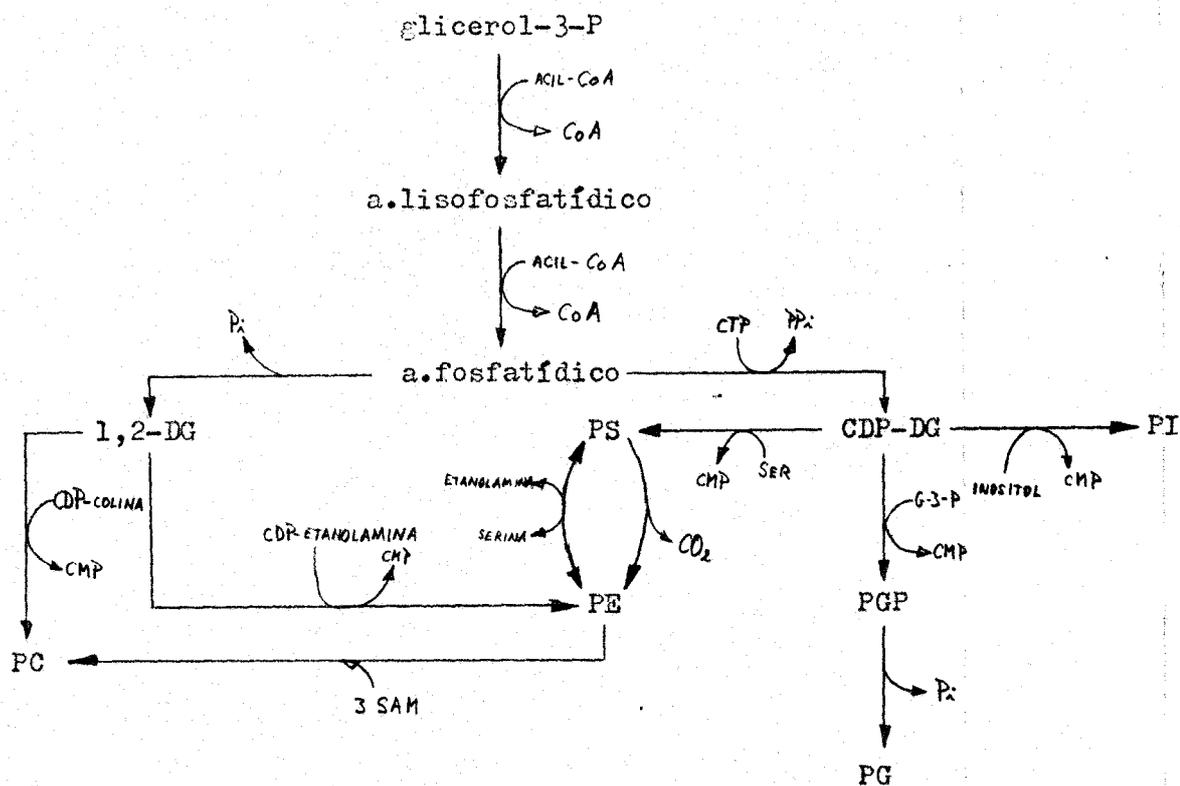
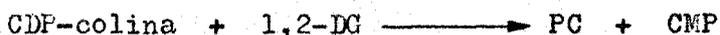


FIG. 4. Esquema general de la biosíntesis de los fosfolípidos más importantes, según Kates y Marshall (1975)

(1976), siendo los acil-ACPs completamente ineficaces como sustratos. La segunda característica relevante es la implicación de los derivados citidínicos, de la misma forma que en la síntesis de galactolípidos, como veremos mas adelante, estan implicados derivados uridínicos. Por último es interesante constatar las relaciones de procedencia entre algunos de los PL mas interesantes (PC, PE y PS), de acuerdo con su proximidad estructural.

En los diversos sistemas vegetales ensayados parece que opera un sistema muy similar, en líneas generales, al expuesto en la Fig. 4. Asi, la síntesis de ácido fosfatídico a partir de diferentes precursores ha sido demostrada en diversos tejidos, según la ruta propuesta por Kennedy en tejidos animales (Harwood y col., 1971; Gurr y col., 1974; Joyard y Douce, 1977; Porra, 1979). Las aciltransferasas de animales y levaduras han sido localizadas en mitocondrias y microsomas; en los vegetales, en cambio, la distribución de la actividad es mas compleja, habiendose encontrado en cloroplastos, mitocondrias, microsomas y en la capa flotante característica de las semillas oleaginosas (Harwood y col., 1971; Porra, 1979).

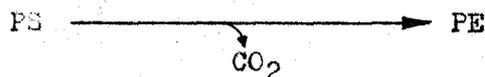
La síntesis de PC a partir de CDP-¹⁴C-colina y de ¹⁴C-DG ha sido demostrada de forma concluyente en la fracción microsómica de hojas de espinaca por Devor y Mudd (1971), quienes tambien establecieron los requerimientos y condiciones para el óptimo funcionamiento de la actividad enzimática. La incorporación de ¹⁴C-colina en PC tambien ha sido confirmada en hojas de alfalfa (Willemot y Verret, 1973), en semillas de soja en germinación (Harwood, 1976) y en distintas preparaciones de hojas de espinaca (Joyard y Douce, 1976). Parece claro, por tanto, que en las plantas superiores tiene lugar la síntesis de PC según la reacción de transferencia:



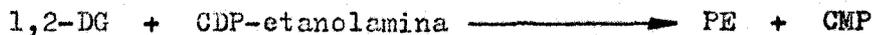
Pero además, se ha demostrado la incorporación de radioactividad en la porción glicerofosforilcolina de la PC a partir de ^{14}C -serina, ^{14}C -etanolamina y ^{14}C -metionina (Kates y Marshall, 1975), lo que apoya la existencia de una ruta de metilación, a partir de PE, mediante S-adenosilmetionina (SAM) como agente metilante, en reacciones mediadas por una metiltransferasa que ha sido localizada en la fracción microsómica de hojas de espinaca (Joyard y Douce, 1976).



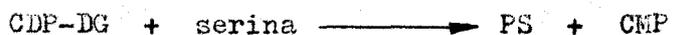
En la Fig. 4 se indica que la PE puede sintetizarse por descarboxilación de la PS, así como por una reacción de intercambio serina:etanolamina, y también a partir de DG con el concurso de CDP-etanolamina. La reacción de descarboxilación, fosfatidilserina descarboxilasa, ha sido demostrada, mediante estudios in vivo e in vitro, en la hoja de espinaca (Kates y Mashall, 1975); por tanto parece cierto que en la hoja de espinaca opera una reacción como la que sigue:



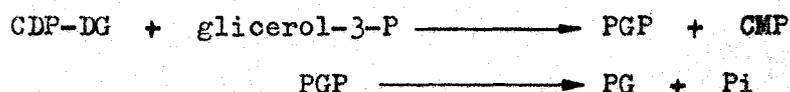
La reacción de intercambio serina:etanolamina también ha sido demostrada en hojas de espinaca, aunque con una actividad muy baja. La tercera posibilidad, formación de PE a partir de DG y CDP-etanolamina, ha sido verificada en hojas de espinaca, concretamente en la fracción microsómica (Marcher y Mudd, 1974; Kates y Marshall, 1975):



Con respecto a la PS, se ha indicado que su síntesis en plantas superiores tiene lugar mediante la misma reacción que opera en las bacterias, y que aparece en la Fig. 4 (Kates y Marshall, 1975):



El PG, el fosfolípido mas importante de las membranas cloroplásticas, se sintetiza en las plantas superiores mediante una única ruta que implica la formación de fosfatidilglicerofosfato (PGP) como intermediario. Esta actividad biosintética fue estudiada por Marshall y Kates (1972) en preparaciones microsómicas de hojas de espinaca, y demostraron que la síntesis de PG es absolutamente dependiente de CDP-DG exógenos, lo que indica la implicación de los siguientes intermediarios:



Recientemente, Beck y Levine (1977) han estudiado la biosíntesis de PG en cultivos sincronizados de Chlamydomonas reinhardi, demostrandose que la síntesis de este importante fosfolípido es dependiente de la luz.

Finalmente, la síntesis de PI ha sido estudiada en tejidos fotosintéticos (Kates y Marshall, 1975) y no fotosintéticos (Sexton y Moore, 1978); en los dos casos se ha demostrado la existencia de una CDP-DG:inositol transferasa:



I.3.3.- Biosíntesis de galactolípidos.

Los galactolípidos, principalmente MGDG y DGDG, constituyen los lípidos mas abundantes de las membranas fotosintéticas, según se ha indicado (pag. 9).

El esquema general de la síntesis de galactolípidos en plantas, tal

y como aparece en una reciente revisión de Mudd y García (1975), es el que se expone en la Fig. 5.

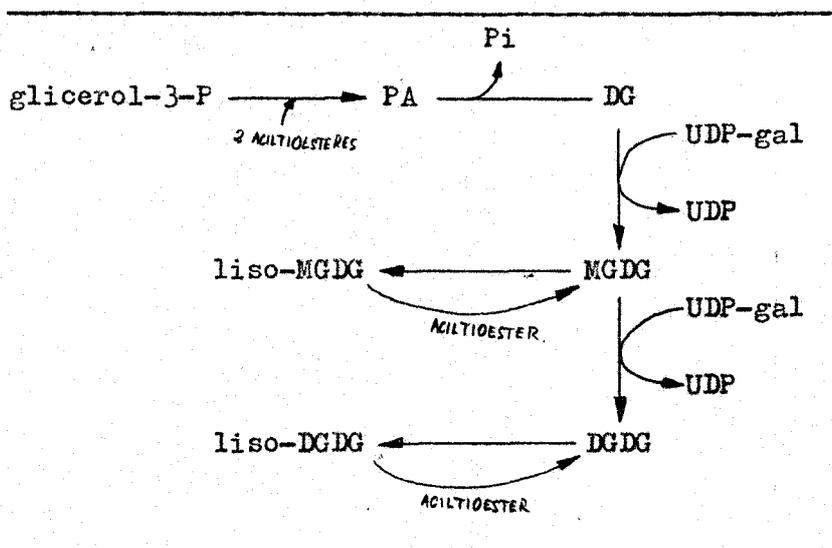


FIG. 5. Esquema general de la biosíntesis de GL en plantas (Mudd y García, 1975).

Al igual que en los fosfolípidos, PA y DG son intermediarios en la síntesis de galactolípidos, ruta que también incluye derivados nucleotídicos, en este caso uridínicos. La acilación del glicerofosfato, para dar ácido fosfatídico, puede realizarse a partir de los dos tipos de acil-tióésteres, acil-CoAs y acil-ACPs, según demostraron Renkonen y Bloch (1969) utilizando preparaciones celulares de *Euglena gracilis*, a diferencia de la ruta biosintética de los PL que realiza las dos acilaciones con acil-CoAs. El asunto es interesante pues trae a consideración la cuestión de hasta qué punto son iguales o distintas las rutas biosintéticas que conducen a la formación de PL y GL, teniendo en cuenta la presencia de intermediarios comunes y la diferencia de composición de ácidos grasos entre los dos tipos de lípidos. Si los GL se sintetizan a partir del mismo "pool" de DG que los PL habría que pensar, para explicar el alto grado de insaturación de sus restos acilo, en un mecanismo de desacilación, mediante una galactolipasa, y posterior acilación que favoreciese la entrada de ácidos

grasos poliinsaturados; en efecto, Safford y col. (1971) demostraron que los homogenados de hojas de espinaca podían acililar a los monogalactosilmonoglicéridos en presencia de ATP, CoA y luz, y Bajwa y Sastry (1973) demostraron que el enzima presentaba la máxima actividad con el ácido linolénico, 18:3. Otra posibilidad es la apuntada por Nichols y Moorhouse (1969) de que la desaturación de los restos acilo de los GL se produzca con posterioridad a su inserción, utilizándose la molécula de GL como sustrato.

La participación de UDP-galactosa en la síntesis de GL fue establecida por Ongun y Mudd (1968), quienes demostraron que la UDP-galactosa podía galactosidar dioleina en presencia de un polvo acetónico de cloroplastos de espinaca, produciendo MGDG, y posteriormente este para dar DGDG. El sistema fue posteriormente estudiado por Mudd y col. (1969), quienes demostraron que el requerimiento de DG exógenos por parte del polvo acetónico de cloroplastos de espinaca se satisfacía mejor mediante DG muy insaturados, lo que sugiere que esta especificidad en la galactosilación es responsable del alto grado de insaturación de los GL. Esta especificidad se ha visto posteriormente apoyada por Williams y col. (1976), quienes, además, no encontraron indicio de desaturación a nivel de los GL.

En los últimos años hemos asistido a la aparición de numerosos trabajos acerca de la biosíntesis de GL y su relación con la biogénesis de membranas cloroplásticas. Entre los autores implicados cabe destacar al francés Douce, quien puso de manifiesto que la membrana externa del cloroplasto es el sitio de síntesis de GL (Douce, 1974), propuesta que ha sido confirmada en otros trabajos del mismo equipo (Joyard y Douce, 1976 a y b) y por otros autores (Van Hummel y col., 1975; Van Besouw y Wintermans, 1978). Por otra parte, Joyard y Douce (1977) demostraron la existencia de los enzimas necesarios para la síntesis de PA y DG en cloroplastos de espinaca aislados, indicando que son autótomos en cuanto a la síntesis de sus pro-

pios GL. Así pues, la envuelta de los cloroplastos puede sintetizar PA, DG y GL, lo que parece indicar que los cloroplastos no dependen del "pool" de PA sintetizado en el retículo endoplásmico, aunque si depende de éste en cuanto al suministro de ácidos grasos poliinsaturados, probando que los cloroplastos aislados no son capaces de sintetizarlos.

La síntesis de galactolípidos a partir de UDP-galactosa y DG ha sido demostrada también en el sistema membranoso interno de los cromoplastos de las flores de narciso (Liedvogel y Kleinig, 1976).

I.3.4.- Biosíntesis de sulfolípidos.

La síntesis de esta clase de lípidos, constituyentes típicos de las membranas lamelares, en las que representa una fracción importante de los lípidos (Park, 1976), ha recibido muy poca atención.

Un esquema hipotético para la síntesis de 6-sulfoquinovosa, la parte no acílica de estos lípidos, fue elaborado por Davies y col. (1966), e incluía la participación de ácido cisteico y fosfoenolpiruvato como intermediarios. La 6-sulfoquinovosa debe unirse, de alguna forma, a un DG para formar SQDG, el más importante de los sulfolípidos. Wolfersberger y Pieringer (1974) demostraron que ciertas preparaciones obtenidas de Chlorella pyrenoidosa podían catalizar la acilación de SQMG, mediante un acil-CoA, para producir SQDG, mientras que el sulfoquinovosilglicerol era inactivo como aceptor, lo que lo excluye como posible precursor.

Por tanto, actualmente disponemos de evidencia acerca de la segunda reacción de acilación, que puede realizarse con un acil-CoA, aunque no se descarta la posibilidad de que los acil-ACPs sean también sustratos apropiados, pero no conocemos la ruta por la que se unen las porciones glucosídica y glicerídica de la molécula.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1.- MATERIALES BIOLÓGICOS.

Las hojas de espinaca (Spinacea oleracea) y los tubérculos de patata (Solanum tuberosum), fueron adquiridos en el mercado. Las semillas de soja (Glycine max), cártamo (Carthamus tinctorius) y girasol (Helianthus annuus) fueron recogidas en diversas plantaciones unos 30, 20 y 30 días después de la floración respectivamente. Las aceitunas (Olea europea) se recogieron en una finca experimental en dos etapas de su maduración: 60 y 135 días después de la floración. Las semillas de guisante (Pisum sativum) fueron adquiridas en una semillera local.

En la espinaca se seleccionaron las hojas más jóvenes, en las que la síntesis de lípidos es más intensa (Kannangara y col., 1973). Las patatas fueron cortadas en discos finos y colocadas en un cristizador con sulfato cálcico 0.1 mM, en donde fueron incubadas a 20°C durante toda la noche. Este tratamiento, llamado de envejecimiento, acelera la síntesis de lípidos en estos tubérculos (Abdelkader y col., 1973). Las aceitunas fueron deshuesadas previamente a su trituración. Las semillas de soja y cártamo fueron trituradas sin ningún tipo de tratamiento previo. Las semillas de girasol fueron peladas antes de incubarlas o de proceder a la extracción del sistema subcelular empleado en incubaciones, pero fueron trituradas sin quitarles la cáscara cuando se trataba de analizar la composición de ácidos grasos de los acilglicéridos. Las semillas de guisante se incubaron sin ningún tipo de tratamiento previo.

II.2.- OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES.

Se han realizado incubaciones con un extracto enzimático obtenido de las semillas de girasol en formación y con cloroplastos aislados de hojas de espinaca. A continuación se describe el procedimiento de obtención de estos dos sistemas.

II.2.1.- Obtención del extracto enzimático de girasol.

Se tomaron 7,5 gramos de semillas peladas, recogidas unos 30 días después de la floración, y se trituraron en un Omnimixer con 15 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,2. El homogenado obtenido se centrifugó a 20.000 g durante 10 min en una centrifuga Sorvall RC-2B. Todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4°C. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se filtró sobre papel para eliminar la capa flotante, y el líquido resultante, conteniendo unos 10 mg/ml de proteína, determinado por el método de Lowry y col. (1951) (pag. 66), fue inmediatamente utilizado en incubaciones.

El sistema aislado contenía, teóricamente, las fracciones celulares soluble y microsómica, estando libre de orgánulos de mayor densidad, tales como plastidios, mitocondrias, glioxisomas.

II.2.2.- Aislamiento de cloroplastos de espinaca.

Para la obtención de cloroplastos de espinaca se seleccionaron hojas jóvenes, de menos de 5 cm de longitud. De 10 a 50 g de tales hojas se tomaron en cada ocasión y, después de lavarlas concienzudamente bajo el grifo, fueron trituradas suavemente en una batidora doméstica, a base de pulsaciones breves, en el seno del siguiente tampón: tricina 0,1 M, sorbitol, 0,6 M, CO_3HNa 60 mM, PO_4HK_2 10 mM, Cl_2Mg 1mM y ascorbato al 0,1 %; el pH se ajustó a 7,9 con KOH 8 M (Kannangara y col., 1973). El homogenado resultante fue filtrado por cuatro capas de gasa y centrifugado a 3000g durante 45 seg. Los utensilios y medios de aislamiento habían sido enfriados a 0°C antes de su uso, y todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4°C. El sedimento obtenido después de la centrifugación, consistente en cloroplastos intactos en una alta proporción, se resuspendió en el mismo medio de extracción y se utilizó, tal cual, en algunas incubaciones.

Antes de su utilización, en algunos experimentos, estos cloroplastos fueron purificados por el procedimiento descrito por Hawke y col. (1975). Este método consiste en someter los cloroplastos obtenidos por centrifugación diferencial a una nueva centrifugación a través de un medio de sacarosa de mayor densidad. Así que los cloroplastos suspendidos en el medio sorbitol-tricina que se había utilizado para la trituración de las hojas, fueron depositados suavemente sobre un tubo de centrifuga que contenía un lecho de 6 cm del mismo medio de aislamiento en el que el sorbitol había sido sustituido por sacarosa 0,6 M. Después de centrifugar a 440 g durante 15 min en la centrifuga Sorvall RC-2B, los cloroplastos intactos aparecían en el fondo del tubo. Estos cloroplastos fueron resuspendidos en un volumen mínimo del mismo medio de trituración y utilizados inmediatamente en incubaciones.

En cierta experiencia, que requería la utilización de cloroplastos conteniendo lípidos radioactivos, se introdujo una modificación en el procedimiento de aislamiento de cloroplastos. Se tomaron 10 g de hojas jóvenes que habían sido incubadas con ^{14}C -acetato (pag. 45) y fueron trituradas en un mortero de vidrio con 15 ml de tampón tricina-sorbitol pH 7,9, y el extracto conteniendo los cloroplastos fue filtrado a través de cuatro capas de gasa. La operación se repitió otras tres veces, de modo que se obtuvieron unos 60 ml de extracto foliar. Tanto el mortero como el tampón habían sido enfriados a 0°C, y todas las operaciones se realizaron en un recipiente con hielo. El extracto obtenido fue tratado como se indica en los párrafos anteriores para la obtención de cloroplastos purificados.

II.3.- OBTENCION PREPARATIVA DE ACP DE ESPINACA.

Para la obtención de ACP de hojas de espinaca se siguió el procedimiento de Simoni y col. (1967) con algunas modificaciones. Se partió de una masa de

12 Kg de hojas de espinaca jóvenes, a las que previamente se les había quitado el peciolo y el nervio principal. El conjunto de las hojas se dividió en tres lotes que fueron tratados separadamente en las primeras etapas.

Cada uno de estos lotes se sometió a un calentamiento de 80°C en el seno de tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 con mercaptoetanol 10 mM. La operación se realizó en pasos sucesivos, utilizándose en total 2 litros de tampón, que fueron reciclados hasta finalizar el lote de hojas. Con esta operación se pretendía coagular la mayor parte de las proteínas, sin afectar al ACP que es termoestable, inactivando los enzimas proteolíticos; además se conseguía reblandecer las hojas y reducir su volumen, facilitándose así su trituración. Esta modificación en relación con el método original, en el cual el calentamiento se realiza después de la trituración, facilita el tratamiento de grandes masas de hojas.

A continuación las hojas fueron trituradas con una batidora doméstica, utilizando el mismo tampón que se había empleado en la cocción, y que fue reciclado tantas veces como fueron necesarias, filtrando sucesivamente el homogenado resultante, para no aumentar el volumen.

La filtración se realizó sobre papel en embudos convencionales, después de haberse comprobado que la filtración a presión en un embudo Büchner era difícil por problemas de entrapamiento. Como final de la operación, el residuo sólido se centrifugó para extraer la mayor cantidad posible del líquido.

El líquido filtrado, unos 4 litros por lote, fue llevado a pH 3,6, punto isoeléctrico del ACP (Simoni y col., 1967), con ClH 6 N, para precipitar el ACP. El conjunto se agitó durante 1 h y se dejó en reposo toda la noche. Entonces el sedimento proteínico se recogió después de centrifugar y se suspendió en una cantidad mínima de tampón fosfato 10 mM con mercaptoetanol 1 mM, ajustándose el pH a 7,5. Se volvió a centrifugar entonces para eliminar el material insoluble.

En este punto se juntaron las soluciones proteínicas procedentes de cada uno de los tres lotes, lo que supuso un volumen total de 2.260 ml. Se agregó a continuación sulfato amónico sólido hasta el 80 % de saturación (560 g/l), manteniendo el pH a 7,5. Entonces se centrifugó a 10.000 g durante 15 min, eliminandose el sedimento. El sobrenadante se llevó a saturación con sulfato amónico, agregandole 200 g/l, y se ajustó a pH 3,6; después de centrifugar en las mismas condiciones se recogió el precipitado y se disolvió en un volumen mínimo de tampón. La solución se llevó nuevamente a pH 3,6 con ClH y, después de centrifugar, el sedimento se disolvió en 50 ml de tampón fosfato 10 mM con mercaptoetanol 1 mM, resultando un pH final de 6,5.

Esta solución proteica se pasó a continuación por una columna de DEAE-celulosa (2 x 30 cm). Después de lavar la columna abundantemente con tampón fosfato se pasaron sucesivamente soluciones de ClNa en tampón de las siguientes molaridades: 0,10, 0,15, 0,20, 0,30 y 0,40, en un volumen de 100 ml. Cada paso de una de estas soluciones se recogió como una fracción separada, y cada una de ellas se ajustó seguidamente a pH 3,6 para precipitar la proteína. Solo las fracciones 0,15, 0,20 y 0,30 M contenían cantidad apreciable de proteína, así que solo en ellas se midió la actividad, de la forma que se describe más adelante. Finalmente las tres fracciones se juntaron dando un volumen total de 10 ml, que se ajustó a pH 6,5 y se guardó a -20°C.

La solución de ACP de espinaca así obtenida presentaba una concentración proteica de 14 mg/ml, determinada por el método de Lowry y col, (1951), utilizandose albúmina bovina como patrón (pag. 66).

II.4.- INCUBACIONES.

En este apartado se describen las incubaciones llevadas a cabo con precursores radioactivos en diversos tejidos intactos y sistemas subcelulares.

II.4.1.- Incubación de tejidos intactos.

Se han realizado incubaciones con tejidos intactos de semillas de girasol en formación, de guisante en germinación y hojas de espinaca inmaduras. Las condiciones de incubación en cada caso se especifica a continuación.

a) Semilla de guisante.- Las semillas de guisante fueron colocadas para su germinación en tubos de ensayo conteniendo 20 μ Ci de ^{14}C -acetato en 0,3 ml de agua destilada que contenía en solución 10 μ g de cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano en el transcurso de la incubación. La incubación se llevó a cabo a 30°C y durante 40 h. Al final de dicho tiempo las semillas habían absorbido el agua en su totalidad, y aparecían turgentes.

b) Semillas de girasol.- Para estudiar la síntesis de lípidos en semillas intactas de girasol se incubaron 3 gramos de dichas semillas, desprovistas de cáscara, con 3 μ Ci de ^{14}C -oleato amónico disuelto en 2 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,3, en un vaso de precipitado de 50 ml a 30°C, durante 20 h y con agitación constante.

c) Hojas de espinaca.- Se tomaron 10 g de hojas de espinaca jóvenes y se incubaron con 50 μ Ci de ^{14}C -acetato, que fueron aplicados sobre ellas con ayuda de un pequeño atomizador de los empleados para pulverizar reveladores cromatográficos. La incubación se llevó a cabo en un recipiente de vidrio amplio que contenía un pequeño volumen, aproximadamente 1 mm de espesor, de agua destilada, que fue situado en un baño termoestático a 24°C, con iluminación artificial y durante 2 h.

II.4.2.- Incubación del extracto enzimático de girasol.

Las incubaciones con el extracto subcelular de semilla de girasol se llevaron a cabo en tubos de vidrio. La mezcla de reacción típica contenía: ATP, 4 mM; CoA, 2 mM; NADH, 2 mM; Cl_2Mg 0,1 M, 0,01 ml; precursor radioactivo, en forma de sal amónica, 2 μCi ; y con estos cofactores 1,5 ml de extracto celular, para hacer un volumen final de 2,5 ml. Además de esto, en algunos experimentos se añadió también 0,5 ml de solución de ACP de espinaca, obtenido según el procedimiento descrito por Simoni y col. (1967) y que contenía 14 mg de proteína por ml de solución (pag.43), y NADPH, 2 mM. Como precursores marcados se utilizaron los ácidos ^{14}C -laúrico, ^{14}C -palmítico, ^{14}C -esteárico y ^{14}C -oleico, aplicados al medio de incubación en forma de sales amónicas, las cuales se prepararon disolviendo los ácidos en 1 ml de etanol, y a esta solución se le agregó 0,1 ml de hidróxido amónico 6 N; a continuación se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno.

En todos los casos la incubación tuvo lugar a 30°C, durante 2 h y con agitación constante.

II.4.3.- Incubación de cloroplastos de espinaca.

a) Cinética de incorporación de radioactividad en relación con la presencia de cofactores en el medio.- Para ensayar la capacidad de incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos por parte de los cloroplastos aislados en ausencia de cofactores exógenos, se incubó una suspensión de cloroplastos intactos, equivalente a 200 $\mu\text{g/ml}$ de clorofila, con el precursor radioactivo. La incubación se llevó a cabo en un tubo abierto que contenía un volumen inicial de 2,5 ml de suspensión y 5 μCi de ^{14}C -acetato. Dicho tubo fue colocado en un baño de agitación a 20°C con iluminación artificial. Se tomaron muestras de 0,25 ml a los 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45 y 65 min del inicio de la incubación.

También se examinó la capacidad de incorporación de radioactividad en ácidos grasos, a partir de ^{14}C -acetato, en cloroplastos intactos en presencia de cofactores exógenos, ATP y CoA, en el medio de incubación. Para ello se incubaron cloroplastos, aislados de hojas jóvenes y de hojas maduras, en un volumen inicial de 5 ml con una concentración de clorofila de 50 $\mu\text{g/ml}$, con 25 μCi de ^{14}C -acetato, ATP (2 mM) y CoA (1 mM). Ambas incubaciones se realizaron en matraces erlenmeyer de 50 ml a 20°C con luz y agitación constante. Se tomaron muestras de 1 ml a los 10, 20, 30 y 40 min.

b) El efecto de las concentraciones de ATP y CoA.— Para examinar el efecto de la adición de ATP y CoA sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos, se llevó a cabo un experimento bifactorial en el que las concentraciones de ATP fueron 0, 1, 2 y 4 mM, y las de CoA 0,0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 y 3,2 mM. Resultaron, por tanto, 24 tratamientos distintos. En todos ellos, además de las correspondientes concentraciones de los nucleótidos, se pusieron 1 μCi de ^{14}C -acetato y suspensión de cloroplastos equivalente a una concentración final de clorofila de 125 $\mu\text{g/ml}$. El volumen de reacción fue de 0,2 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de vidrio abiertos, a 20°C, con luz y agitación constante, durante 1 h.

c) Incubación de cloroplastos en relación con la luz.— Los cloroplastos aislados y resuspendidos en un volumen total de 3,5 ml fueron incubados con 10 μCi de ^{14}C -acetato a 20°C con luz y agitación, durante 15 min. A continuación el volumen inicial se dividió en dos partes de 1,5 ml. A una de ellas se le añadió 2 μmoles de ATP y 2 μmoles de CoA, y a la otra 8 μmoles de ATP y 2 μmoles de CoA, en ambos casos los cofactores estaban disueltos en 0,25 ml del mismo medio de incubación (tampón tricina-sorbitol pH 7,9). Los dos conjuntos así constituidos se repartieron en muestras de 0,25 ml que fueron colocadas en tubos separados. Estos tubos fueron incubados seguidamente en las mismas condiciones pero en la oscuridad. A partir de ese momento se to-

maron muestras a 5, 10, 20, 40 y 80 min.

d) Incubación de cloroplastos aislados de hojas que habían sido preincubadas con ^{14}C -acetato.— Las hojas de espinaca que habían sido incubadas con ^{14}C -acetato (pag 45) fueron lavadas abundantemente bajo el grifo, una vez finalizada la incubación y se procedió al aislamiento de sus cloroplastos triturando las hojas en un mortero de vidrio según el procedimiento que hemos descrito (pag. 42). Los cloroplastos aislados fueron resuspendidos en 2,5 ml del mismo tampón utilizado en la trituración de las hojas, y la suspensión resultante se dividió en dos partes de 1,2 ml. A una de ellas se le agregó 2 μmoles de ATP y 2 μmoles de CoA, disueltos en 0,25 ml del mismo tampón; a la otra se le añadió el mismo volumen de tampón sin cofactores. Después de agitar suavemente, estas suspensiones se repartieron en tubos a razón de 0,25 ml cada uno, y se incubaron a 20°C con luz y agitación. Se tomaron muestras a 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min.

e) Examen del efecto del Triton X-100 y del cloruro amónico en relación con la presencia de cofactores en el medio.— Para estudiar el efecto del Triton X-100 y del cloruro amónico sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos, se incubaron cloroplastos, equivalentes a 70 $\mu\text{g/ml}$ de clorofila, en un volumen total de 0,5 ml que contenía 0,5 μCi de ^{14}C -acetato y distintas cantidades de Triton y de sal amónica. Una temperatura de 21°C , luz, agitación y una hora de tiempo fueron las condiciones de la incubación. Las concentraciones de Triton ensayadas fueron (μM): 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, y 500; y las de ClNH_4 (mM): 0, 1, 2, 4 y 8.

También se examinó el efecto del Triton X-100 en presencia de cofactores exógenos. Para ello los cloroplastos se incubaron en un volumen total de 1 ml conteniendo 120 μg de clorofila, 5 μCi de ^{14}C -acetato, 0,1 ml de solución de ACP de espinaca y las siguientes adiciones (mM): 4 ATP, 0,4 CoA,

1 NADPH, 1NADH, 2DMT, y las correspondientes cantidades de Triton equivalentes a las siguientes concentraciones (μM): 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700. La reacción tuvo lugar a 20°C , con luz y agitación durante 1 h.

Para seguir la incorporación de ^{14}C -acetato con el tiempo en presencia de Triton se incubaron 5 ml de suspensión cloroplástica, conteniendo 100 μg de clorofila por ml y 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de acetato radioactivo, con los cofactores indicados, y una concentración fija de Triton, 525 μM . Se tomaron muestras de 1 ml a 30, 60, 180 y 300 min.

En las mismas condiciones, pero con un volumen de reacción de 1 ml y 1 h de incubación, se ensayó el efecto de la temperatura; estas fueron 20, 25, 30 y 35°C .

El efecto de la concentración de clorofila se examinó incubando cloroplastos con 5 μCi de ^{14}C -acetato, Triton X-100, 525 μM , y los cofactores enumerados anteriormente, en un volumen total de 1 ml. Las concentraciones de clorofila ensayadas fueron ($\mu\text{g/ml}$): 100, 150, 200 y 250. Las incubaciones se realizaron a 20°C con luz y agitación, durante 30 min.

Finalmente se examinó la cinética de incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos en relación con la adición de Triton X-100, ClNH_4 y cofactores en el medio de reacción durante el transcurso de la incubación. Las incubaciones se iniciaron con un volumen de 2 ml conteniendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de clorofila y 10 μCi de ^{14}C -acetato. Se tomaron tres muestras de 0,25 ml a los 5, 10 y 15 min de incubación. Entonces se añadió Triton X-100, 450 nmoles, o cloruro amónico, 15 μmoles , disueltos en 0,25 ml de tampón tricina-sorbitol pH 7,9. Se tomaron otras dos muestras de 0,25 ml a los 5 y 10 min después de las adiciones. Finalmente se añadió a cada incubación 1,5 μmoles de CoA y 7,5 μmoles de ATP, disueltos en 0,25 ml de tampón, y se prosiguió la incubación tomándose muestras a los 5, 10, 20 y 40 min después de estas últimas adiciones. Las dos incubaciones se realizaron simultáneamente, a 20°C con luz y agitación.

f) Ensayo de la actividad del ACP de espinaca.- La actividad de la solución de ACP de espinaca, obtenida como se describe en el apartado II.3 (pag. 42), se ensayó utilizando la sintetasa de ácidos grasos de cloroplastos de espinaca. Los cloroplastos de espinaca fueron obtenidos por centrifugación diferencial como se describe en II.2.2 (pag. 41) y, sin someterlos a purificación, se homogenizaron en un Potter-

La suspensión de cloroplastos rotos así obtenida fue incubada en las siguientes condiciones: 1 μ mol NADH, 1 μ mol NADPH, 4 μ moles ATP, 0,4 μ mol CoA, 2 μ moles DTT, 0,13 μ moles Triton X-100; 0,9 ml de suspensión de cloroplastos rotos en tampón tricina-sorbitol pH 7,9 (pag. 41); 2 μ Ci de 14 C-malonato y 0,1 ml de las soluciones de ACP correspondientes a las fracciones eluidas a 0,15, 0,20 y 0,30 M de ClNa. Volumen final, 1,2 ml. La incubación se llevó a cabo en el baño de agitación a 30°C durante 1 h.

II.5.- PROCEDIMIENTO ANALITICO.

II.5.1.- Descripción del método de separación de aciltioésteres.

En todos los trabajos que constituyen esta Tesis se ha utilizado el método de separación de aciltioésteres descrito por Mancha y col. (1975). Por ello vamos a empezar describiendolo, en líneas generales antes de pasar a los detalles analíticos de cada experimento.

Como se indica en la figura 6, la mezcla problema se encuentra suspendida en isopropanol-tampón (1:1). La naturaleza del tampón varía según la naturaleza del material biológico bajo examen. Dicha mezcla se acidifica con ácido acético glacial y se lava tres veces con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), de forma que se extraen la mayor parte de los lípidos de la mezcla, pero no los aciltioésteres. La mezcla delipidada, que contiene los aciltioésteres y una pequeña fracción de los aciloxiésteres mas polares,

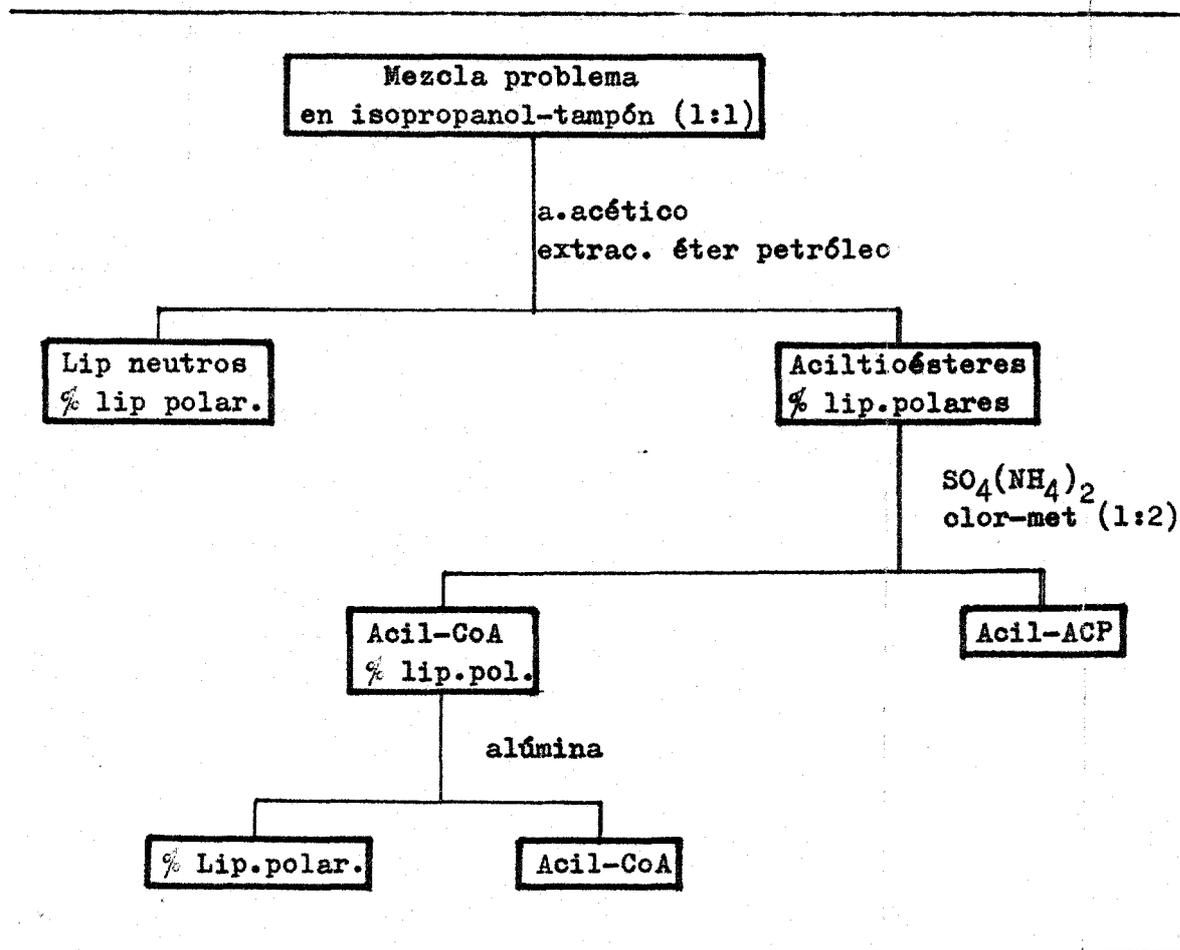


FIG. 6. Diagrama de flujo que resume el procedimiento analítico para la separación de los acilglicésteres y lípidos de una mezcla. (Mancha y col., 1975).

principalmente fosfolípidos, se le añade 25 l/ml de solución saturada de sulfato amónico, y 4 ml/ml de cloroformo-metanol (1:2). Así que, después de dejar la mezcla en reposo durante no menos de 20 min y de centrifugar a continuación, se obtiene un sobrenadante que contiene los acil-CoAs, contaminados por los lípidos no extraídos con éter de petróleo, y un sedimento que contiene los acil-ACPs

Para aislar los acil-CoAs, el sobrenadante obtenido se pasa por una columna de alúmina conteniendo 0,075 g de dicho adsorbente por mililitro de sobrenadante. La alúmina retiene a los acil-CoAs, en razón a la gran polaridad que presentan, y los lípidos contaminantes son eluidos lavando con cloroformo-metanol (1:2).

Los acil-CoAs así separados se someten a hidrólisis alcalina para separar los ácidos grasos correspondientes. El sedimento conteniendo los acil-ACPs se resuspende en isopropanol-agua (1:2) y la suspensión resultante puede ser sometida a hidrólisis alcalina para separar los ácidos grasos en orden a determinar su composición. Alternativamente, los acil-ACPs, así obtenidos, pueden ser purificados para su utilización, como sustratos, en reacciones enzimáticas.

Por otra parte, los acil-CoAs adsorbidos en el gel de alúmina, después de que los lípidos contaminantes son eluidos con cloroformo-metanol (1:2), pueden ser sometidos a saponificación directamente. Para ello se lava la columna con un pequeño volumen de éter etílico, y se seca seguidamente bajo corriente de nitrógeno. El gel seco puede entonces sacarse de la columna para colocarlo en un tubo, en donde se realizará la hidrólisis alcalina.

Otra alternativa es eluir los acil-CoAs de la columna lavando con 25 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 - metanol (1:1) por cada gramo de alúmina. Se aíslan así los acil-CoAs intactos, los cuales pueden ser sometidos a sa-

ponificación a fin de analizar su composición de ácidos grasos, o bien ser utilizados como sustratos en reacciones enzimáticas.

La fracción lipídica, extraída de la mezcla original con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), puede ser separada en las distintas clases de lípidos por cromatografía en capa fina. Alternativamente, estos lípidos pueden ser sometidos a metilación para analizar su composición de ácidos grasos.

Finalmente, los ésteres metílicos obtenidos de las distintas fracciones aisladas pueden ser analizados por cromatografía de gases, para establecer la composición de ácidos grasos.

II.5.2.- Separación de los aciltioésteres y lípidos de los diversos sistemas estudiados.

La metódica seguida para separar aciltioésteres y glicerolípidos de los distintos sistemas ensayados fue la de Mancha y col. (1975) comentada en el apartado anterior. Se introdujeron, no obstante, modificaciones sustanciales en algunos de los casos, que para mayor claridad se describen en los cuatro apartados que siguen.

a) Análisis químico de los aciltioésteres de diversos tejidos.- Cuando se trataba de analizar la composición de ácidos grasos de los aciltioésteres se hacía preciso tratar una gran masa de tejido, entre 100 y 1000 g según los casos. El material de partida se trituró en un Omnimixer a máximo voltaje, utilizando un volumen igual (en el caso de la espinaca y de la patata) o doble (en la aceituna, soja, cártamo y girasol) de mezcla isopropanol-tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 (1:1). La masa obtenida se filtró por gasa y se centrifugó a baja velocidad para eliminar las partículas groseras. A la mez-

cla resultante se le midió el volumen y se le agregaron 12,5 ml/l de ácido acético glacial, y a continuación se lavó tres veces con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), empleando un volumen de alrededor del 25 % del de la mezcla en cada ocasión.

Por otra parte, los restos de tejido retenidos en la gasa después de la filtración, fueron triturados en el Omnimixer con cloroformo-metanol (2:1), para una completa extracción de los lípidos (Folch y col., 1957) (pag. 56). Después de evaporar el disolvente los lípidos extraídos se juntaron con los procedentes de los lavados realizados con éter de petróleo antes reseñados, constituyendo en conjunto lo que llamaremos fracción de lípidos totales.

A la solución delipidada, obtenida después de lavar con éter de petróleo, se le agregaron 25 ml/l de solución saturada de sulfato amónico, y 4 l/l de cloroformo-metanol (1:2). Después de agitar se dejó en reposo durante 20 min para permitir la completa precipitación de las proteínas. Seguidamente se centrifugó a baja velocidad durante unos 10 min, así que los acil-ACPs se obtuvieron en el sedimento junto con las demás proteínas de la mezcla, en tanto que los acil-CoAs permanecían en el sobrenadante junto con los lípidos polares contaminantes. Este sobrenadante se pasó por una columna conteniendo 100 g de alúmina neutra por cada litro de solución delipidada, mientras que el precipitado se resuspendió en cloroformo-metanol (1:2) para repetir la centrifugación; el nuevo sobrenadante se pasó también por la columna de alúmina. La columna fue lavada a continuación con cloroformo-metanol (1:2), en un volumen de unas 10 veces el volumen de lecho de la columna, y finalmente los acil-CoAs fueron eluidos pasando mezcla metanol-tampón fosfato 0,05 M pH 7,2 (1:1), en un volumen de 5 ml por gramo de alúmina de la columna.

Así pues, en este punto tenemos separadas tres fracciones: los lípidos totales, los acil-ACPs (en el sedimento proteínico) y los acil-CoAs (en solución hidroalcohólica).

b) Semilla de guisante.-- Las semillas de guisante obtenidas después de la incubación (pag. 45), fueron trituradas con un homogenizador Ultra-Turrax en un volumen de 20 ml de mezcla isopropanol-tampón fosfato 0,05 M pH 7,2 (1:1). La masa resultante se filtró por gasa, y el líquido filtrado se centrifugó a baja velocidad para eliminar los restos tisulares de mayor tamaño. Dichos restos, y los retenidos en la gasa, fueron triturados seguidamente con cloroformo-metanol (2:1), según Folch y col. (1957), para una completa extracción de los lípidos de la muestra. El sobrenadante de la centrifugación, por su parte, fue tratado según el método de Mancha y col. (1975) en las condiciones ya descritas (pag. 50). Los acilglucósidos, una vez separados, fueron sometidos a hidrólisis alcalina para determinar su composición de ácidos grasos. La fracción lipídica fue separada en clases por cromatografía en capa fina (pag. 57).

c) Semilla de girasol.-- El tejido intacto, al final de la incubación, se lavó abundantemente con agua destilada, y se trituró en el Ultra-Turrax con 5 ml de mezcla isopropanol-tampón fosfato 0,1 M pH 7,3 (1:1). A continuación la mezcla fue tratada de acuerdo con el método de Mancha y col. (pag. 50).

Quando se ensayó el homogenado, la reacción fue detenida agregando 2,5 ml de isopropanol y 0,1 ml de ácido acético glacial, procediéndose a continuación según Mancha y col. (pag. 50).

d) Cloroplastos de espinaca.-- En los experimentos de tiempo en relación con el papel de los cofactores en la síntesis de lípidos en los cloroplastos, descritos en el apartado II.4.3 (pag. 46), se llevó a cabo una sustancial simplificación del método de Mancha y col. (1975), en base a que el contenido de acil-ACPs es prácticamente despreciable y a que la casi totalidad de los lípidos se extraen con éter de petróleo. Las reacciones eran detenidas agregando al medio 1 ml de ácido acético al 10 % en isopropanol por cada mililitro de muestra.

A continuación se procedía a la extracción de los lípidos, para la cual se lavaba tres veces con un volumen de éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1) igual al de la mezcla que contenía la suspensión de cloroplastos y el isopropanol añadido, generalmente 0,5 ml. Los sucesivos lavados eran colocados en pequeños tubos de vidrio.

La mezcla hidroalcohólica delipidada, conteniendo los acilglicéridos prácticamente exentos de contaminación lipídica, fue sometida a hidrólisis alcalina para la liberación de los restos acilo de los acilglicéridos y posterior extracción.

Una parte alícuota de la fracción lipídica, obtenida en los sucesivos lavados con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), fue utilizada para la determinación de la radioactividad por centelleo líquido. El resto fue cromatografiado en placa de sílice para su separación en clases de lípidos, en las condiciones que se describen más adelante (pag. 57).

En las experiencias en relación con el efecto de las distintas concentraciones de Triton X-100 en presencia de cofactores exógenos (pag. 48) se siguió el procedimiento original sin modificación (pag. 50).

II.5.3.- Extracción de lípidos totales.

Cuando se trataba de extraer exhaustivamente los lípidos de un tejido se procedió según Folch y col. (1957). El procedimiento consiste en triturar el tejido en un volumen adecuado de mezcla cloroformo-metanol (2:1), digamos 10 ml de mezcla por gramo de tejido. La mezcla, después de la trituración, se filtra sobre papel, se coloca en un embudo de decantación y se le añade un 20 % de agua. Después de agitar, se deja el embudo en reposo para permitir la decantación de la mezcla en dos fases; la fase inferior es la que contiene los lípidos disueltos en cloroformo. La solución de los lípi-

dos en cloroformo se saca del embudo y se coloca en un matraz, para proceder a la evaporación del disolvente en un evaporador rotatorio.

II.5.4.- Separación de la fracción lipídica por cromatografía en capa fina.

Los lípidos totales aislados siguiendo el método rutinario, constituidos por el extracto clorofórmico obtenido por el método de Folch y por los sucesivos lavados realizados en la mezcla original con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), fueron cromatografiados en placa de sílice, de 0,25 mm de espesor, desarrollando con éter de petróleo-éter etílico-ácido fórmico (90:30:1). El revelado se hizo exponiendo el borde de la placa a vapores de yodo, de forma que se detectaron y rasparon cuatro fracciones: lípidos polares (origen), diglicéridos, ácidos grasos libres y triglicéridos.

En ciertos experimentos realizados con cloroplastos, una parte de los lípidos totales fue separada en placa de sílice desarrollando con cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1). El frente se dejó avanzar hasta 10 cm de altura y entonces se retiró la placa del tanque de desarrollo. Una vez evaporado el disolvente, la placa se dividió en tres partes de 3,5, 3,0 y 3,5 cm, del frente al origen, que fueron raspadas, y la sílice correspondiente a cada banda se colocó en pequeñas columnas de vidrio sobre las que se procedió a la elución de los lípidos adsorbidos sobre el gel, para lo cual se lavó con 1,5 ml de metanol. Los eluatos fueron depositados en sendos viales de centelleo líquido. El revelado se realizó pulverizando una placa testigo con ácido sulfúrico al 50 % y calentando sobre una plancha eléctrica a 300°C. Se puso de manifiesto que la banda del frente, de 3,5 cm, contenía los ácidos grasos libres, ácido fosfatídico y, probablemente, los diglicéridos, así como los pigmentos cloroplásticos; la banda del medio, de 3 cm, contenía los monogalactosildiglicéridos; la banda del origen, 3,5 cm, contenía los digalactosildiglicéridos y los restantes fosfolípidos.

II.5.5.- Análisis posicional de los glicerolípidos.

Los lípidos polares fueron tratados con fosfolipasa A (EC 3.1.1.4) de Crotalus adamanteus, según el método de Christie y Moore (1969). Este enzima hidroliza específicamente los restos acilo que esterifican la posición 2 de los fosfolípidos. Los LP fueron colocados en un tubo provisto de tapón de rosca y se les agregó 1 mg de enzima, 0,2 ml de tampón Tris-ClH pH 7,5, conteniendo cloruro cálcico 4 mM, y 1 ml de éter etílico; el conjunto se agitó durante 1 h en un Mixo-Tub a máxima velocidad, y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Los productos de la hidrólisis fueron extraídos con cloroformo-metanol (2:1), y se separaron en placa de sílice con éter de petróleo-éter etílico-ácido fórmico (60:30:2). Exponiendo el borde de la placa a vapores de yodo se detectaron las bandas correspondientes a los ácidos grasos libres y a los lisofosfolípidos, que fueron raspadas y metiladas según el procedimiento que se describe mas adelante (II.5.7).

Los triglicéridos y diglicéridos fueron hidrolizados con lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) según la técnica de Luddy y col. (1964). Este enzima separa específicamente los restos acilo esterificados en los grupos hidroxilo primarios de TG, DG y MG. La muestra fue colocada en un tubo y se le añadieron 10 mg de polvo de lipasa pancreática de cerdo, 1 ml de tampón Tris-ClH pH 8, 0,1 ml de cloruro cálcico al 22 % y 0,25 ml de colato sódico 0,1 %. El tubo se agitó en un Mixo-Tub durante 2 min a temperatura ambiente. La reacción fue detenida agregando 0,5 ml de ClH 6 N, y los productos de la reacción extraídos con éter etílico y separados, previa evaporación del disolvente, en la placa de sílice en las condiciones indicadas arriba. Los ácidos grasos libres y los 2-monoglicéridos obtenidos se metilaron para su análisis por cromatografía de gases.

II.5.6.- Hidrólisis alcalina de lípidos y aciltioésteres.

Los acil-ACPs, resuspendidos en una cantidad mínima de isopropanol-tampón fosfato 0,05 M pH 7,2 (1:2), fueron saponificados rutinariamente agregando 1 ml de KOH al 40 % por cada 3 ml de suspensión. La reacción se llevó a cabo calentando a 80°C durante 30 min.

Con los acil-CoAs se procedió de dos formas distintas según los casos. Cuando eran eluidos de la columna de alúmina con metanol-tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 (1:1) la saponificación se realizaba agregando al eluato, recogido en un matraz, potasa suficiente para que se alcanzara una concentración final del 10 %. A continuación se calentaba a 80°C durante 30 min.

En otras ocasiones los acil-CoAs fueron saponificados sobre el mismo gel de alúmina sobre el que estaban adsorbidos, y después de que se hubieran eluido los lípidos contaminantes. Para ello el gel fue secado bajo corriente de nitrógeno después de pasar por la columna un pequeño volumen de éter etílico; el gel seco fue sacado de la columna y colocado en un tubo provisto de tapón de rosca, en el que se agregaron 4 ml de KOH al 25 % en metanol-agua (1:1) y 2,5 ml de Triton X-100 al 10 % en isopropanol-agua (1:1) por cada gramo de alúmina presente. La reacción se llevó a cabo calentando a 80°C, 30 min y con el tubo cerrado.

En los ensayos con cloroplastos en los que no se llevó a cabo la separación de los dos tipos de aciltioésteres, la hidrólisis alcalina de éstos, contenidos en la mezcla hidroalcohólica delipidada, se realizó agregando un volumen igual de KOH al 20 % en metanol-agua (1:1), y calentando a 80°C, 30 min.

Cuando se trataba de saponificar lípidos la reacción se llevaba a cabo en tubos cerrados provistos de tapón de rosca y con una cantidad discreta, entre 2 y 5 ml, de KOH al 10 % en metanol-agua (1:1), y calentando en las condiciones indicadas.

En todos los casos, despues de los 30 min de reacci3n se procedi3 a enfriar el medio de reacci3n para acidificar seguidamente con ClH 6 N. Los 3cidos grasos liberados de los jabones despues de la acidificaci3n, fueron extraidos con 3ter de petr3leo en tres lavados sucesivos.

II.5.7.- Preparaci3n de los 3steres metilicos de 3cidos grasos.

La metilaci3n de los 3cidos grasos libres obtenidos mediante hidr3lisis alcalina, seg3n se ha descrito en el apartado anterior, se llev3 a cabo agregando a dichos 3cidos grsos, despues de la evaporaci3n del disolvente, un volumen discreto, entre 2 y 5 ml, de metanol-ClH al 4 %. La reacci3n de trans esterificaci3n se realiz3 en tubos provistos de tap3n de rosca, cerrados, y calentando a 80°C durante 5 min.

Cuando se trata de metilar glicerolpidos la reacci3n ha de hacerse en medio alcalino, por ello se utiliza un agente metilante distinto: metilato s3dico 0,2 N. T3picamente se agregaban 2 ml de metilato s3dico 0,2 N a la muestra lip3dica, que en muchos casos estaba adsorbida sobre el gel de sili-ce por proceder de una separaci3n cromatogr3fica en capa fina. El conjunto se calentaba, en tubo cerrado, a 80°C durante 5 min. Al final de ese tiempo el tubo se enfriaba bajo el grifo y se le a3ad3a 2,5 ml de metanol-ClH 4 %, para conseguir la metilaci3n total de la muestra, y se volvi3 a calentar a 80°C durante 5 min.

Al final de la reacci3n, en todos los casos, se a3ad3a un volumen de agua igual al volumen de reacci3n, y se extra3an los 3steres metilicos lavando con 3ter de petr3leo tres veces.

II.5.8.- Determinación de la radioactividad.

En muchas de las experiencias realizadas la radioactividad asociada a cada una de las fracciones aisladas se determinó disolviendo los ésteres metílicos correspondientes en heptano, e inyectando una parte alícuota de dicha solución en un equipo de contaje Perkin-Elmer RGC-170 (Fig. 7). La muestra inyectada en este equipo es conducida, mediante un gas portador, a un horno de CuO, que se encuentra a elevada temperatura, donde la muestra se descompone para dar CO₂ y H₂O; estos productos pasan a través de una trampa de perclorato magnésico, que retiene el agua, y finalmente el dióxido de carbono pasa a un tubo contador proporcional que detecta las radiaciones emitidas por las moléculas de ¹⁴CO₂. Las condiciones de trabajo del equipo de contaje se indican en el apartado siguiente.

Por otra parte, la radioactividad asociada a los acilglucolípidos de las experiencias llevadas a cabo con cloroplastos se determinó en los ácidos grasos obtenidos después de la hidrólisis alcalina. Los sucesivos lavados con éter de petróleo, efectuados después de acidificar el medio al final de la reacción, fueron colocados en un vial de centelleo líquido en donde se permitió que se evaporara el disolvente. Asimismo, una parte alícuota de la fracción lipídica se puso en un vial de centelleo líquido, y se dejó evaporar el disolvente dejando el vial destapado durante toda la noche. Entonces a cada uno de los viales se le agregó 10 ml de líquido centelleador, que estaba constituido por 3,5 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0,1 g de 1,4-dimetil-2(4-metil-5-feniloxalozil)benceno (dimetil-POPOP) disueltos en un litro de tolueno-Triton X-100 (95:5).

El contaje de las muestras se realizó en un contador de centelleo líquido LKB Ultrabeta, instalado en el departamento de Medicina Nuclear de la Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío (Sevilla), o bien en otro de la casa Intertechnic instalado en el Centro de Edafología de Cuarto (Sevilla).

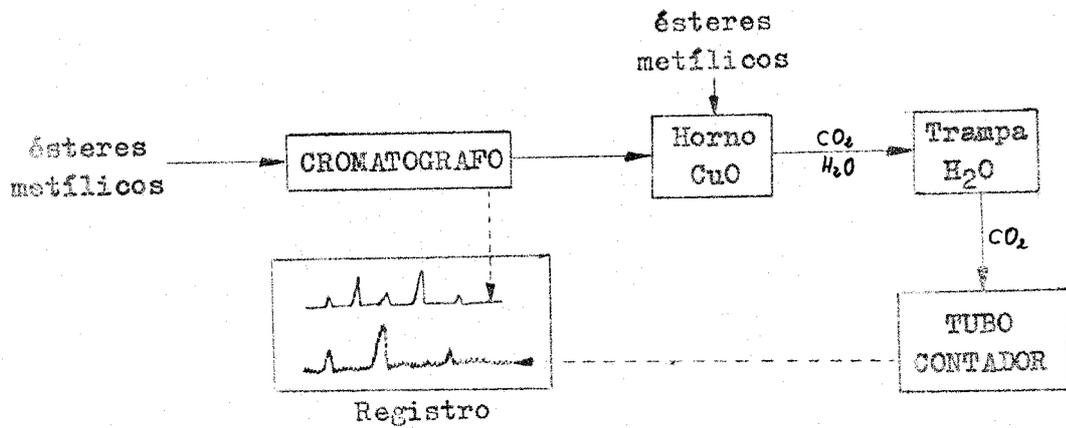


FIG. 7. Esquema del equipo de radiocromatografía de gases. Está constituido por un cromatógrafo Perkin-Elmer F-17 y por un equipo de contaje Perkin-Elmer RGC-170.

II.5.9.- Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía o radiocromatografía de gases.

Cuando se llevó a cabo en análisis químico de los aciltioésteres de diversos tejidos los ésteres metílicos procedentes de las distintas fracciones aisladas fueron analizados por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Perkin-Elmer F-17 provisto de detector de ionización de llama de hidrógeno. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: columna de 2 m x 2,7 mm ϕ empaquetada con etilenglicol succinato (EGS) al 5 % sobre Chromosorb W 80-100 mallas; temperatura del horno, 170°C; temperatura del inyector, 220°C; gas portador, nitrógeno a un flujo constante de 40 ml/min; flujo de hidrógeno en el detector, 25 ml/min; flujo de aire en el detector, 300 ml/min.

Los ésteres metílicos procedentes de las semillas de cártamo y girasol fueron analizados, además, sobre una columna de butiliendiol succinato (BDS) al 8 % sobre Supelcoport 80-100 mallas, en el mismo aparato y condiciones. Esta columna tiene la cualidad de separar los pares críticos (ver apartado siguiente) por lo que resulta muy útil para verificar la existencia de ácido linolénico, que aparece emmascarado por el 20:1 en la columna de EGS.

En las experiencias que implicaban incubación con precursores radioactivos, los ésteres metílicos de las distintas fracciones fueron analizados por radiocromatografía de gases, para establecer la composición de ácidos grasos radioactivos.

Como se ve en la Fig. 7, el equipo de radiocromatografía de gases utilizado por nosotros está constituido por un cromatógrafo de gases, un Perkin-Elmer F-17, conectado en serie con el contador de radioactividad Perkin-Elmer RGC-170, que hemos descrito en el apartado anterior, y que funciona como detector de radioactividad de las especies moleculares separadas en el cromatógrafo. Con este equipo se obtiene un cromatograma con un registro doble; por un lado se registra la masa correspondiente a cada especie química sepa-

rada, mediante una señal que viene del cromatógrafo, y por otro la radioactividad asociada a cada uno de los componentes de la muestra, gracias a una señal debidamente amplificada que procede del tubo contador (Fig. 7).

Las condiciones de trabajo del equipo de radiocromatografía de gases fueron las siguientes: Cromatógrafo Perkin-Elmer F-17 provisto de detector de hilo caliente; columna de 2 m x 2,5 mm ϕ empaquetada con EGS al 5 % sobre Chromosorb W 80-100 mallas; gas portador, helio a 40 ml/min; temperatura de la columna, 170°C; temperatura del inyector, 225°C. El cromatógrafo va conectado en serie con un detector de radioactividad Perkin-Elmer RGC-170; gas acelerador en el tubo contador, metano a 20 ml/min; temperatura del horno de CuO 680°C; voltaje del hilo del tubo, 2400 voltios.

II.5.10.- Separación de los ésteres metílicos por cromatografía en placa de sílice-nitrato de plata.

Los ésteres metílicos correspondientes a muchas de las fracciones aisladas fueron cromatografiados sobre placa de sílice impregnada de nitrato de plata al 10 %. Esta técnica permite la separación de las especies moleculares según el grado de insaturación, de modo que en caso de los ésteres metílicos permite la separación de las distintas series homólogas, es decir, familias de ácidos grasos que presentan el mismo grado de insaturación, variando en la longitud de cadena.

La técnica es muy útil para confirmar la naturaleza de los distintos productos separados por cromatografía de gases, e imprescindible cuando en cromatografía de gases se utilizan determinadas fases estacionarias, como EGS, que no separan ciertas parejas de ésteres metílicos, tales como 16:3-18:1 o 18:3-20:1, llamadas pares críticos.

El desarrollo utilizado fue éter de petróleo-éter etílico (92:8), y la visualización se hizo bajo luz ultravioleta después de pulverizar la placa con fluoresceína. Las bandas correspondientes a los ésteres metílicos saturados, mono, di y triinsaturados fueron raspadas y colocadas en pequeñas columnas de vidrio, en donde se eluyeron con éter etílico. Los ésteres metílicos así separados fueron analizados a continuación por cromatografía de gases.

II.5.11.- Determinación de la clorofila.

Para la determinación de la clorofila contenida en las suspensiones cloro-plásticas utilizadas en incubaciones, se tomaron volúmenes de 0,1 y 0,2 ml de dichas suspensiones y se les agregaron 0,9 y 0,8 ml de agua respectivamente, y 4 ml de acetona. La mezcla resultante se agitó en el Mixo-Tub y se filtró sobre papel. Inmediatamente se procedió a medir la absorbancia a 652 nm, en cubetas de 1 cm de paso de luz y utilizando la mezcla acetona-agua (80:20) como blanco. Para la medida se utilizó un espectrofotómetro Coleman 55 de Perkin-Elmer.

La concentración de clorofila se calculó de la siguiente expresión (Bruinsma, 1961)

$$\text{Clorofila (mg/l)} = \frac{1000 \times A_{652}}{36}$$

II.5.12.- Determinación de proteína.

El contenido proteínico de los extractos utilizados en las incubaciones fue determinado por el procedimiento de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina bobina como patrón. La determinación de la absorbancia a 660 nm se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 55.

II.5.- PROCEDENCIA DE LOS PRODUCTOS EMPLEADOS.

II.5.1.- Precursores radioactivos.-

Los precursores radioactivos utilizados, ^{14}C -1-acetato (57 Ci/mol), ^{14}C -1-laurato (32 Ci/mol), ^{14}C -1-palmitato (57 Ci/mol), ^{14}C -1-estearato (58 Ci/mol) y ^{14}C -1-oleato (56 Ci/mol), fueron adquiridos de Radiochemical Centre, Amesham, Inglaterra.

II.5.2.- Disolventes.

Eter de petróleo (Pe 65-70°C) de la casa Shell, EEUU; éter etílico, cloroformo, metanol y acetona, de PanReac, Barcelona. Todos estos disolventes fueron redestilados antes de su uso. El isopropanol y el etanol procedían así mismo de PanReac. Tolueno y Heptano de Mallinckrodt, EEUU.

II.5.3.- Inorgánicos.

Cloruro amónico, fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, sulfato amónico, cloruro sódico, bicarbonato sódico, ácido clorhídrico y potasa, de PanReac; Los ácidos acético y fórmico, de Probus. El cloruro magnésico procedía de la casa Merck, Alemania.

II.5.4.- Adsorventes y soportes para cromatografía.

Silicagel 60 G, para cromatografía en capa fina, de Merck; alúmina neutra 507 C, de Fluka, Suiza; etilenglicol succinato (EGS), fase líquida para cromatografía de gases, suministrado por Perkin-Elmer, EEUU; la otra fase líquida utilizada en cromatografía de gases, butilendiol succinato (BDS), procedía de Alltech, EEUU. Los soportes inertes para cromatografía de gases fueron Chromosorb 80-100 mallas de Johns-Manville, EEUU, y Supelcoport 80-100 mallas de la casa Supelco, EEUU. DEAE-celulosa, para cromatografía de

intercambio iónico, de Sigma, EEUU.

II.5.5.- Cofactores.

CoA, ATP, NADH, NADPH, DTT y ácido L-ascórbico fueron adquiridos de la casa Sigma.

II.5.6.- Otros.

Fosfolipasa A de Crotalus adamanteus, sorbitol, tricina, sacarosa, β -mercaptoetanol y albúmina bobina fueron adquiridos de Sigma. El Triton X-100 procedía de la casa Serva, Alemania. La lipasa pancreática de cerdo fue obtenida y purificada en el Instituto de la Grasa, Sevilla. Los centelleadores PPO y dimetil-POPOP, para contaje de radioactividad por centelleo líquido, fueron adquiridos de Sigma.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. ANÁLISIS DE LOS ACILTIOESTERES DE DIVERSOS ORIGENES.

Como se ha indicado, y siguiendo la metódica descrita en la sección correspondiente de Material y Métodos (pp. 63-64), se ha llevado a cabo la separación y análisis de los aciltioésteres y lípidos extraídos de seis tejidos distintos: hojas de espinaca, pulpa de aceituna, tubérculo de patata y semillas en formación de soja, cártamo y girasol. La composición de ácidos grasos de las distintas fracciones aisladas, determinadas por cromatografía gaseosa, se exponen y se discuten a continuación.

Pero antes de proseguir, es oportuno comentar brevemente la forma en que se interpretaron y cuantificaron los cromatogramas obtenidos, y a ello vamos a dedicar el siguiente apartado.

III.1.1.- Interpretación de los cromatogramas.

Los resultados de un análisis por cromatografía gaseosa aparecen en el conocido cromatograma de picos, en el que cada pico representa un compuesto, y su tamaño es proporcional a la cantidad de dicho compuesto presente en la muestra analizada. La distancia de cada pico al origen, tiempo de retención, es característico de cada sustancia en unas condiciones de trabajo determinadas, y constituye, por tanto, un criterio de identificación. Modernamente, los cromatógrafos suelen ir equipados con integradores que registran automáticamente el tiempo de retención de cada pico y su correspondiente porcentaje. No ha sido este nuestro caso, de modo que hemos procedido a la usanza tradicional de medir distancias y alturas de picos.

En la Fig. 8 aparece un cromatograma típico de ésteres metílicos de ácidos grasos, se trata concretamente del obtenido a partir de los ésteres metílicos procedentes de los lípidos totales de la hoja de espinaca. Los

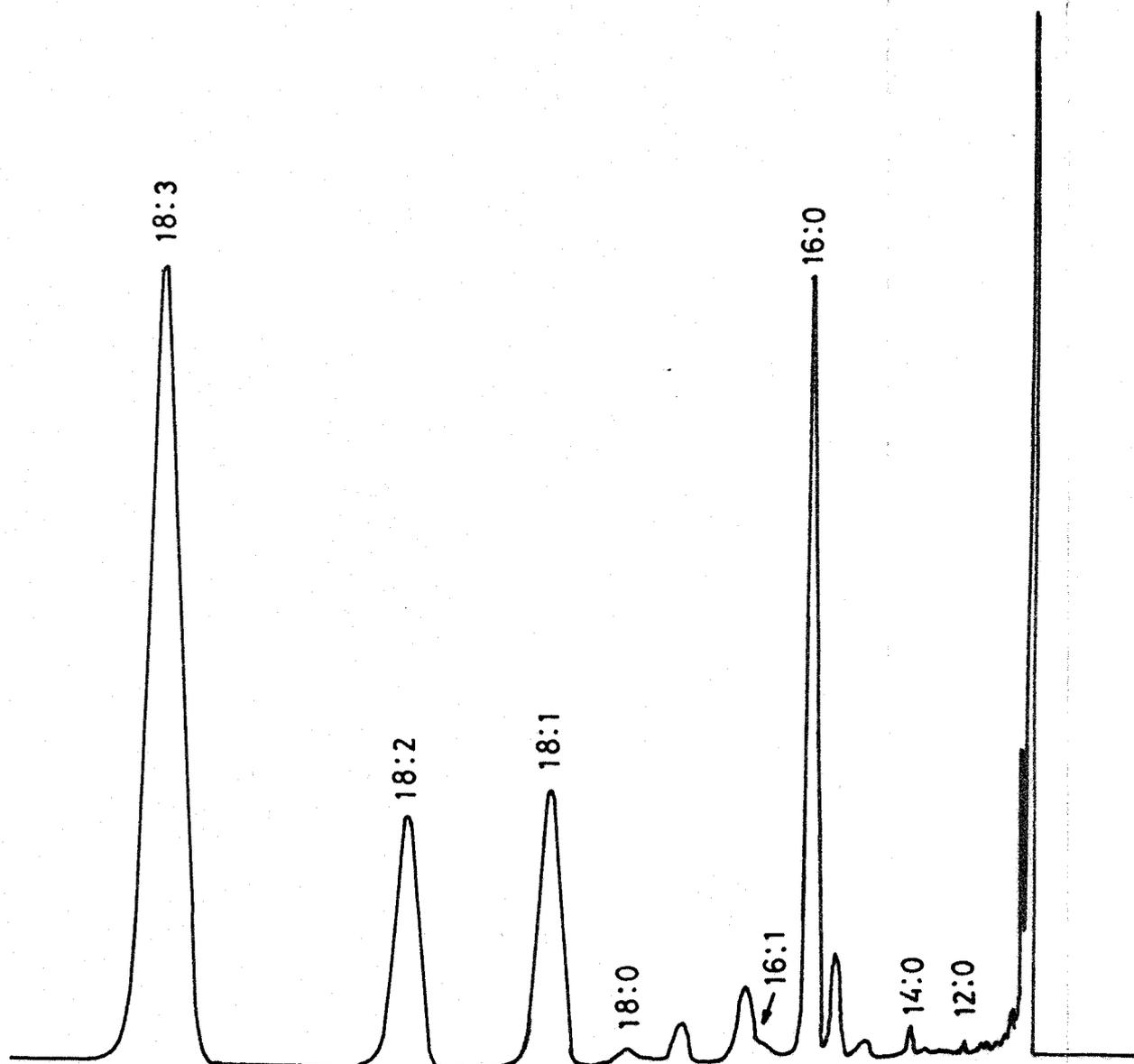


FIGURA 1.- Cromatograma general de los ésteres metílicos procedentes de los ácidos grasos de los lípidos de la hoja de espinaca. En un cromatograma de picos los parámetros a medir son la distancia al origen, característica para cada ácido, y la altura, que multiplicada por la distancia al origen nos sirve para calcular los porcentajes.

parámetros a medir en cada pico son dos: la distancia del pico al origen (d) y la altura del pico (h). La distancia al origen permite la identificación de cada pico por comparación con patrones. Nosotros utilizamos como patrón los ésteres metílicos obtenidos de un aceite de semilla comercial, en el que todos los componentes importantes son sobradamente conocidos; así, los ácidos 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3 son identificados inmediatamente. La representación del número de átomos de carbono de los ésteres metílicos de ácido grasos frente al logaritmo de sus distancias al origen da lugar a una línea recta para cada una de las series homólogas, esto es, familias de ácidos grasos con el mismo número de dobles enlaces; además las rectas correspondientes a cada serie son paralelas entre sí. Así que esta representación permite identificar aquellos picos para los que no se dispone de patrón. La Fig. 9 muestra la representación de las series homólogas de los ésteres metílicos procedentes de los lípidos totales de la hoja de espinaca, representativa de lo que hemos comentado.

Para cuantificar un pico en un cromatograma generalmente se multiplica su anchura por su semialtura, asumiendo que el pico es triangular. Nosotros hemos utilizado otro procedimiento que estimamos más exacto. Consiste en multiplicar la altura del pico por su distancia al origen, dicho producto es proporcional al área del pico y sirve, por tanto, para calcular los porcentajes correspondientes a cada componente.

FIG. 29

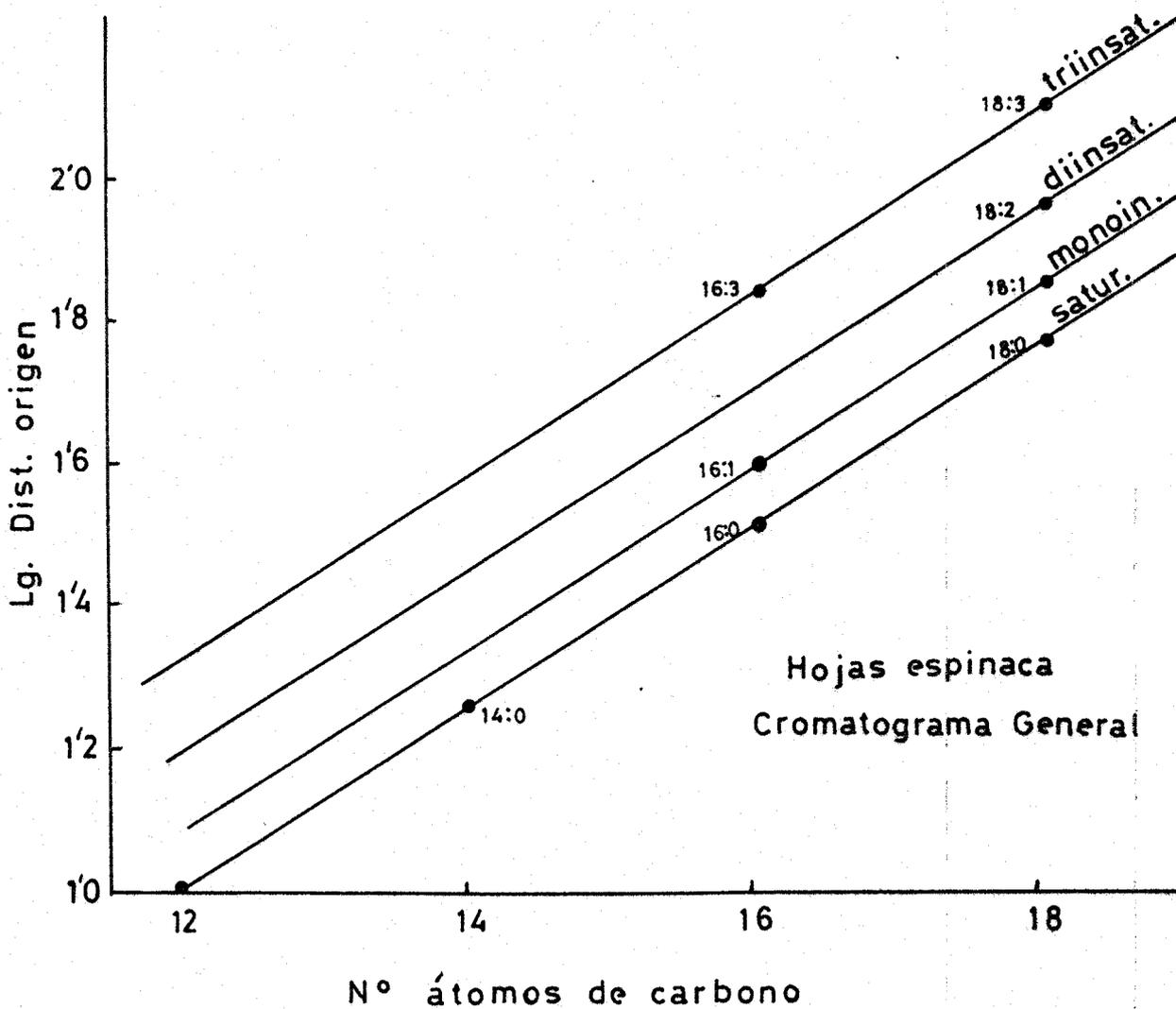


FIGURA 29.- Representación gráfica del cromatograma general de los ácidos grasos correspondientes a los lípidos de la hoja de espinaca. Las cuatro series homólogas corresponden a los datos obtenidos del mismo cromatograma, realizado a 165°C. Obsérvese que los puntos correspondientes a los ácidos 18:1 y 16:3 tienen la misma ordenada, corresponden al mismo pico del cromatograma. La separación e identificación de ambos se lograría por cromatografía en placa de sílice-nitrato de plata.

III.1.2.- Resultados.

Los resultados obtenidos de los seis tejidos analizados se muestran en las Tablas IV - IX (pp. 75-80).

Del examen de estos resultados se hace evidente que la composición de ácidos grasos de los acilglicéridos es, en todos los casos, muy distinta de la que presentan los lípidos correspondientes. Así, en la aceituna (Tabla IV) el ácido oleico, que representa casi el 75 % de los TG y es, por lo tanto, el ácido graso más importante del tejido, en los acilglicéridos solo se presenta en un 40 %; en tanto que el palmítico, escasamente representado en los lípidos, da cuenta de alrededor de la tercera parte de los ácidos grasos de los dos tipos de acilglicéridos. Diferencias menores se aprecian entre la composición de los dos tipos de acilglicéridos, y de estas la más notable es la que se refiere al ácido linoleico, 18:2, que presenta considerables diferencias entre los dos tipos de acilglicéridos en las dos fechas en las que se realizó el análisis, y mayores aun entre los acil-AGPs de las dos fechas (2,9 y 18,5 %).

Diferencias más acusadas se aprecian en la patata y en la espinaca. En el tubérculo de patata (Tabla V) el ácido linoleico, que supone aproximadamente el 50 % de los ácidos presentes en los lípidos, en los acilglicéridos no alcanza el 10 % del total de ácidos grasos, mientras que el segundo ácido cuantitativamente importante en los lípidos, linolénico, no aparece, en absoluto, en los acilglicéridos. Por el contrario, el ácido oleico, que representa más de la mitad de los ácidos grasos totales en los dos tipos de lípidos, aparece escasamente representado en los lípidos.

En la hoja de espinaca (Tabla VI) también se observan, como se ha dicho, importantes diferencias de composición entre lípidos y acilglicéridos. De forma que el ácido linolénico, 18:3, absolutamente mayoritario en los lípidos de la hoja, no aparece en los acilglicéridos, en tanto que

el ácido oleico, siendo el mas abundante en los aciltioésteres, solo aparece en los lípidos en pequeña cantidad.

Las tres semillas analizadas, soja, cártamo y girasol, mostraron resultados bien distintos, aunque confirmando la disparidad de composición de lípidos y aciltioésteres antes apuntada.

La semilla de soja , Tabla VII, nos muestra como los ácidos insaturados representan el 85 % del total de ácidos grasos en los lípidos, y solo aparecen en un pequeño porcentaje en los aciltioésteres, y unicamente como oleico. Por el contrario, el ácido palmítico es absolutamente mayoritario en los aciltioésteres y apenas representa un 10 % en los lípidos.

La semilla de girasol, Tabla VIII, muestra el predominio de los ácidos insaturados, oleico y linoleico, en los lípidos, como es típico de las semillas oleaginosas, mientras que en los aciltioésteres son mas abundantes los ácidos saturados, especialmente palmítico.

Finalmente, la semilla de cártamo (Tabla IX) muestra resultados anómalos dentro del conjunto de materiales analizados. Existen importantes diferencias entre los dos tipos de aciltioésteres, pero los acil-CoAs muestran una composición muy parecida a la de los TG, apareciendo el ácido linoleico en una proporción muy alta, casi el 75 %.

| ácido | 60 DDF | | | | 135 DDF | | | |
|-------|-----------|-----------|------|------|-----------|-----------|------|------|
| | acil-CoAs | acil-ACPs | LP | TG | acil-CoAs | acil-ACPs | LP | TG |
| 12:0 | 0,8 | 1,3 | 1,4 | t | 1,1 | 0,5 | 0,2 | - |
| 14:0 | 3,1 | 5,5 | 1,1 | t | 3,3 | 1,9 | 0,3 | - |
| 15:0 | 1,0 | 2,7 | - | - | 1,4 | 0,8 | 0,2 | - |
| 16:0 | 27,7 | 38,9 | 16,6 | 15,6 | 26,9 | 29,4 | 12,0 | 13,8 |
| 16:1 | 2,0 | 5,9 | 1,3 | 1,5 | 3,9 | 2,1 | 0,7 | - |
| 17:0 | 0,7 | 1,2 | - | - | 0,6 | 0,6 | 0,7 | - |
| 17:1 | 0,3 | 1,0 | - | - | t | t | t | - |
| 18:0 | 10,8 | 12,8 | 3,8 | 1,5 | 7,6 | 7,8 | 2,2 | 2,0 |
| 18:1 | 36,0 | 26,4 | 49,5 | 74,0 | 42,6 | 35,8 | 66,3 | 74,8 |
| 18:2 | 15,7 | 2,9 | 10,7 | 5,5 | 8,5 | 18,5 | 15,5 | 9,4 |
| 20:0 | 1,0 | 0,6 | - | - | 1,1 | 1,1 | t | - |
| 20:1 | 0,9 | 0,7 | - | - | 2,2 | 0,8 | - | - |
| 18:3 | - | - | 13,6 | 1,9 | - | - | 1,6 | 0,9 |

TABLA IV. Composición de ácidos grasos de los acilglucolípidos y lípidos de la aceituna (*Olea europea*) en dos etapas de su maduración. Las cifras expresan porcentajes de cada ácido en cada una de las fracciones.

DDF: días después de la floración.

| <u>ácido</u> | <u>acil-CoAs</u> | <u>acil-ACPs</u> | <u>LP</u> | <u>TG</u> |
|--------------|------------------|------------------|-----------|-----------|
| 12:0 | 0,7 | 0,7 | t | 0,2 |
| 14:0 | 2,3 | 2,1 | 0,3 | 0,7 |
| 15:0 | 0,8 | 0,8 | 0,2 | 0,2 |
| 16:0 | 20,9 | 18,9 | 18,9 | 12,4 |
| 16:1 | 3,9 | 5,8 | t | 0,6 |
| 17:0 | 0,7 | 0,3 | t | t |
| 17:1 | 0,7 | 0,5 | - | - |
| 18:0 | 5,1 | 4,5 | 3,2 | 2,6 |
| 18:1 | 53,6 | 56,9 | 1,9 | 6,1 |
| 18:2 | 8,3 | 7,1 | 52,7 | 49,2 |
| 20:0 | 0,4 | t | - | - |
| 18:3 | - | - | 22,7 | 27,9 |
| 20:1 | 1,4 | 0,8 | - | - |
| 20:2 | 1,2 | 1,6 | - | - |

TABLA V. Composición de ácidos grasos de los acil-
tioésteres y lípidos de patata (Solanum
tuberosum).

| <u>ácido</u> | <u>acil-CoAs</u> | <u>acil-ACPs</u> | <u>lípidos</u> |
|--------------|------------------|------------------|----------------|
| 12:0 | 1,8 | 1,1 | 0,1 |
| 14:0 | 4,6 | 3,1 | 0,3 |
| 14:1 | 0,3 | 0,4 | - |
| 15:0 | 1,7 | 0,9 | t |
| 16:0 | 25,9 | 21,2 | 14,2 |
| 16:1 | 3,9 | 4,2 | 0,4 |
| 17:0 | 1,3 | 0,5 | t |
| 16:2 | 0,8 | 0,7 | t |
| 18:0 | 10,3 | 7,8 | 0,7 |
| 18:1 | 38,4 | 47,7 | 6,7 |
| 16:3 | - | - | 4,2 |
| 18:2 | 7,7 | 9,7 | 12,7 |
| 20:0 | 1,2 | 0,2 | t |
| 20:1 | 3,8 | 1,8 | - |
| 18:3 | - | - | 56,2 |

TABLA VI. Composición de ácidos grasos de los acil-tioésteres y lípidos de la hoja de espinaca (Spinacea oleracea).

| <u>ácido</u> | <u>acil-CoAs</u> | <u>acil-ACPs</u> | <u>lípidos</u> |
|--------------|------------------|------------------|----------------|
| 12:0 | 3,6 | 1,8 | - |
| 13:0 | 0,4 | 0,6 | - |
| 14:0 | 9,8 | 7,8 | 0,1 |
| 15:0 | 3,3 | 3,1 | - |
| 16:0 | 63,7 | 55,1 | 10,8 |
| 16:1 | - | - | 0,2 |
| 17:0 | 1,7 | 1,5 | 0,2 |
| 18:0 | 18,3 | 23,4 | 4,5 |
| 18:1 | 1,0 | 7,2 | 25,9 |
| 18:2 | - | - | 49,6 |
| 20:0 | - | - | 0,4 |
| 18:3 | - | - | 8,3 |

TABLA VII. Composición de los aciltioésteres y lípidos de la semilla de soja (Glycine max) en formación.

| <u>ácido</u> | <u>acil-CoAs</u> | <u>acil-ACPs</u> | <u>LP</u> | <u>TG</u> |
|--------------|------------------|------------------|-----------|-----------|
| 14:0 | 4,1 | 7,5 | 0,8 | 0,2 |
| 15:0 | - | - | 3,0 | - |
| 16:0 | 43,4 | 35,3 | 27,8 | 12,3 |
| 16:1 | - | 8,1 | - | - |
| 17:0 | - | 4,0 | 0,6 | - |
| 18:0 | 7,4 | 13,8 | 8,4 | 10,9 |
| 18:1 | 11,5 | 21,6 | 22,3 | 41,6 |
| 18:2 | 26,1 | 9,6 | 34,3 | 32,2 |
| 18:3 | 2,5 | - | 2,8 | 2,8 |

TABLA VIII. Composición de ácidos grasos de los aciltioésteres y lípidos de la semilla de girasol (Helianthus annuus) en desarrollo.

| <u>ácido</u> | <u>acil-CoAs</u> | <u>acil-ACPs</u> | <u>LP</u> | <u>TG</u> |
|--------------|------------------|------------------|-----------|-----------|
| 12:0 | 0,2 | 1,6 | t | - |
| 14:0 | 0,7 | 4,7 | 1,5 | 0,3 |
| 15:0 | 0,3 | 1,9 | 0,5 | - |
| 16:0 | 14,9 | 31,8 | 33,1 | 11,5 |
| 18:0 | 2,5 | 12,8 | 12,7 | 4,5 |
| 18:1 | 7,1 | 36,3 | 12,4 | 17,7 |
| 18:2 | 74,3 | 10,9 | 39,7 | 66,1 |

TABLA IX. Composición de los aciltoésteres y lípidos de la semilla de cártamo (Carthamus tinctorius) en formación.

III.1.3.- Discusión.

Desde el punto de vista analítico, la disparidad observada en composición de ácidos grasos de los lípidos y aciltioésteres de una misma procedencia, representa un apoyo experimental sobre la eficacia del método de Mancha y col. (1975) utilizado en el análisis, pues, en particular, la ausencia en los aciltioésteres de ácidos que son absolutamente mayoritarios en los lípidos (linolénico en la espinaca, linoleico en la soja) indica que no ha habido interferencia de estos últimos, que son cuantitativamente mucho más importantes. Con respecto a la similitud entre los TG y acil-CoAs observada en la semilla de cártamo (Tabla IX) hay que indicar que la contaminación en los acil-CoAs debe esperarse, en todo caso, por parte de los lípidos polares, pues en las condiciones del método la casi totalidad de los lípidos neutros se extraen en los sucesivos lavados con éter de petróleo saturado de isopropanol-agua (1:1), y los que no lo fueran serían rápidamente eluidos en la columna de alúmina (ver Fig 6, pag. 54).

En general, puede apreciarse que existen considerables diferencias entre la composición de ácidos grasos de los aciltioésteres de distinta procedencia, de la misma forma que existen diferencias en la composición de los lípidos de distintos tejidos vegetales. Sin embargo, en todos los acil-ACPs están bien representados los intermediarios de lo que Shine y col. (1976) llamaron ruta del ACP (Fig. 3, pag. 28), esto es: síntesis de novo, alargamiento a esteárico y desaturación de este a oleico. Así, todos los acil-ACPs estudiados muestran la serie de ácidos saturados de 12 a 18 átomos de carbono, incluyendo algunos de número impar de átomos de carbono, y también el ácido oleico.

Por otra parte, la presencia de ácidos grasos saturados y oleico en los acil-CoAs también es coherente con el esquema propuesto por Shine y col. (1976) según el cual el cambio de protador se efectúa por mediación de una aciltio-

esterasa, que actúa sobre los acil-ACPs liberando el ácido graso, y una aciltioquinasa, que une el ácido liberado a la CoA; ambas enzimas, actuando en serie, constituyen lo que estos autores llaman el sistema de conexión entre la ruta del ACP y la ruta del CoA (pag. 27).

Con respecto a los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, y sus correspondientes monocinsaturados, probablemente se comportan según el mismo esquema general, por lo que es aplicable también a ellos lo expuesto en el párrafo anterior.

La existencia de 18:2-CoA en casi todos los tejidos examinados requiere una discusión algo más extensa. La evidencia acumulada sobre la síntesis de 18:2 a partir de 18:1 es contradictoria en lo que se refiere a la naturaleza del sustrato y el producto de la reacción (ver pp. 23-26). Así, Gurr y col. (1969) y posteriormente Gurr (1971), sugirieron que el verdadero sustrato de la reacción de desaturación en Chlorella vulgaris es β -oleil-PC, y el producto final β -linoleil-PC, hipótesis que se vio apoyada posteriormente por diversos autores (Slack y col., 1976; Stymne y Appelqvist, 1978; Slack y col., 1978).

La teoría sustentada por estos autores es que el 18:1 se transfiere desde el CoA a la PC, para dar β -oleil-PC, que actúa de sustrato para la desaturación a β -18:2-PC. Según esto, la existencia de 18:2-CoA en los tejidos exigiría la acción de una fosfolipasa que libere el 18:2 y una tiquinasa que lo una al CoA; ambas enzimas están ampliamente distribuidas por los tejidos vegetales.

Sin embargo, Vijay y Stumpf (1971), utilizando la fracción microsómica de semillas de cártamo en formación, encontraron que el 18:1-CoA es el sustrato específico de la oleato desaturasa, y el 18:2-CoA el producto de la reacción. Si esto fuera realmente así, quedaría perfectamente justificada la existencia de 18:2-CoA en los tejidos analizados.

Lo que resulta sorprendente es la presencia de 18:2 en los acil-ACPs. Para justificarla habría que demostrar alguna de estas alternativas: a) una reacción de desaturación completamente inusual, en la que el sustrato fuera 18:1-ACP y el producto 18:2-ACP; b) partiendo de 18:2-CoA, su transformación en 18:2-ACP podría realizarse con la intervención de una linoleil-CoA:ACP transacilasa análoga a la que interviene a nivel de acetato o malonato (Fig. 2, pag. 18), que no ha sido detectada en ningún sistema, o bien mediante un sistema tioesterasa-tioquinasa análogo al propuesto por Shine y col. (1976a) pero funcionando al revés: $18:2\text{-CoA} \rightarrow 18:2 \rightarrow 18:2\text{-ACP}$; c) si el verdadero producto de la desaturación es un 18:2-PL, el paso de 18:2 al ACP debería implicar la intervención de una fosfolipasa y una tioquinasa específica para el ACP, acil-ACP sintetasa, tal como la demostrada por Ray y Cronan (1976) en E.coli.

Otro punto interesante es el que se refiere a la ausencia de 18:3 en los aciltioésteres, con la única excepción del girasol, que lo presenta en un pequeño porcentaje en los acil-CoAs (Tabla VIII). La síntesis de este ácido, componente mayoritario de los lípidos de membrana de los cloroplastos, ha sido tema de discusión en los últimos años (pag. 26). Por una parte Stumpf y sus colaboradores aportaron evidencias que sugerían que el 18:3 de los tejidos fotosintéticos no procedía directamente del 18:2, y propusieron que las desaturaciones se verifican a la altura de los ácidos grasos de 12 átomos de carbono, y que el alargamiento se producía con posterioridad a la formación de 12:3 (Jacobson y col., 1973; Kannangara y col., 1973b). Por otro lado Cherif y col. (1975) aportaron evidencia de que la síntesis de 18:3 en tejidos foliares se realiza por desaturaciones sucesivas a nivel de los ácidos de 18 átomos de carbono. No obstante, en ninguno de los trabajos citados se alude a la naturaleza del portador implicado. En un trabajo muy reciente (Roughan y col. 1979) se ha aportado nueva evidencia de que la desaturación de 18:2 a 18:3 en los cloroplastos de espinaca se efectúa

con el sustrato unido al MGDG, concretamente en posición 1, apoyando así la sugerencia publicada hace unos años por Nichols y Moorhouse (1969). Los resultados aquí presentados tienden a apoyar la idea de que la síntesis de 18:3 tiene lugar, como un nuevo, paso de desaturación, sobre el 18:2 unido a un lípido, bien a la PC, como sugirieron Gurr y col. (1969), o al MGDG, como indican los últimos resultados (Roughan y col., 1979), con lo que queda excluida la intervención de cualquiera de los portadores; aunque desde luego no se descarta la posibilidad de que el 18:3 se forme por desaturación de un linoleiltilioéster, y que el linoleniltilioéster formado tenga una vida breve por existir una alta actividad linolenil transferasa.

En resumen, aunque los datos analíticos sobre la composición de ácidos grasos de los aciltilioésteres de un tejido no permite, en absoluto, extraer conclusiones acerca del papel de los portadores en el metabolismo de los ácidos grasos, sí que constituye un telón de fondo sobre el que hay que encajar los distintos resultados parciales, en el sentido de que los mecanismos propuestos deben estar de acuerdo con los resultados del análisis.

III.2.- BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN LA SEMILLA DE GUISANTE EN GERMINACION.

El empleo de semillas oleaginosas con bajo contenido en lípidos de reserva, tal como el guisante, en estudios de biosíntesis de lípidos se produjo,

| <u>Clase</u> | <u>% incorporación</u> | <u>Actividad especif.total</u> |
|--------------|------------------------|--------------------------------|
| LP | 68 | 0,94 |
| DG | 9 | 0,67 |
| TG | 23 | 0,50 |
| AG | nd | 0,32 |
| Acil-CoAs | nd | 0,24 |

TABLA X. Incorporación de ^{14}C -acetato a las distintas clases de lípidos de la semilla de guisante en germinación.
nd: no determinado.

je de incorporación a cada una de las fracciones se determinó contando la radioactividad asociada a cada una después de separar los lípidos totales, aislados tras la correspondiente incubación, por cromatografía en capa fina (pag. 57). La actividad específica total, que se calcula a partir de los resultados del análisis de los ésteres metílicos por radiocromatografía de gases, expresa el cociente entre la suma de las áreas de todos los picos de radioactividad y la suma de las áreas de los picos de masa, calculadas según se indicó antes (pag. 71).

La determinación directa de la radioactividad asociada a los distintos lípidos muestra que la mayor parte de los ácidos grasos recientemente sintetizados se incorporan a los lípidos polares. Son estos también los que presentan una mayor actividad específica total. Es notable el caso de los DG que, presentando un escaso porcentaje de la radioactividad total, poseen una radioactividad específica total alta. No se ha determinado el porcentaje de radioactividad incorporada a AG y acilglicolípidos, aunque puede asegurarse que son pequeños.

III.2.2.- Composición de ácidos grasos de las distintas fracciones.

Los resultados del análisis cromatográfico de los ésteres metílicos obtenidos de las distintas fracciones aisladas se muestran en la Tabla XI. Hay que hacer notar que no se realizó análisis cromatográfico de los acil-ACPs debido a que mostraban una actividad muy escasa. Las cuatro fracciones separadas de los lípidos totales muestran notables puntos de coincidencia. En todas ellas el ácido esteárico resulta ser el más importante en cuanto a radioactividad, ello unido a que es un componente de escasa cantidad en cuanto a masa, motiva que sea el ácido de mayor actividad específica en todas las fracciones (conviene subrayar que la actividad específica

| Clase | | % de ácidos grasos | | | | | | | |
|--------------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 20:0 | 18:3 |
| TG | rad. | t | 1 | 11 | 41 | 22 | - | 24 | - |
| | masa | 1 | 1 | 11 | 4 | 33 | 41 | - | 9 |
| | Ae | 0,3 | 0,7 | 0,5 | 5,8 | 0,3 | - | alta | - |
| LP | rad. | - | - | 23 | 34 | 31 | 12 | - | - |
| | masa | - | - | 14 | 3 | 27 | 55 | - | - |
| | Ae | - | - | 1,4 | 8,5 | 1,0 | 0,2 | - | - |
| DG | rad. | - | - | 18 | 53 | 29 | t | - | - |
| | masa | - | - | 31 | 7 | 27 | 35 | - | - |
| | Ae | - | - | 0,9 | 5,5 | 0,7 | - | - | - |
| AG | rad. | - | - | 9 | 55 | 26 | - | 10 | - |
| | masa | - | - | 24 | 7 | 36 | 33 | - | - |
| | Ae | - | - | 0,1 | 2,5 | 0,2 | - | alta | - |
| Acil CoAs | rad. | - | - | 70 | 30 | - | - | - | - |
| | masa | - | 3 | 30 | 7 | 49 | 11 | - | - |
| | Ae | - | - | 0,6 | 1,0 | - | - | - | - |

TABLA XI. Composición de ácidos grasos en las distintas clases de lípidos de la semilla de guisante. Las cifras correspondientes a actividad específica (Ae) expresan el cociente entre las alturas de los picos de radioactividad y masa del ácido correspondiente.

de un ácido expresa la relación de alturas de los picos de radioactividad y masa). Otros ácidos cuantitativamente importantes y ubicuos son el oleico y el palmítico. Los tres juntos suponen el 80 % o más de cada una de las fracciones. Solo se ha detectado un ácido de cadena muy larga, el 20:0, que curiosamente se localiza exclusivamente en los TG, en los cuales representa un importante porcentaje, 22 %; de la misma forma, el único ácido poliinsaturado que pudimos detectar, el linoleico, aparece únicamente en la fracción de los LP, en la que representa un 11 %. Es en esta fracción, LP, en la única en la que los ácidos insaturados, 18:1 y 18:2, dan cuenta de un porcentaje de radioactividad comparable al de los saturados; en las demás fracciones los ácidos saturados suponen no menos del 70 % de la radioactividad total asociada a los restos acilo.

Los acil-CoAs se apartan considerablemente, en cuanto a composición, de las demás fracciones. Solo se detectaron dos ácidos grasos marcados, palmítico y esteárico, siendo el 16:0 el más abundante. Por su parte, el ácido oleico, que representa casi el 50 % de la masa de los acil-CoAs y que, como ya hemos visto, representa una fracción importante de los ácidos de nueva síntesis en los lípidos, no fue detectado como ácido marcado en los acil-CoAs.

III.2.3.- Análisis posicional.

El resultado del análisis de los ácidos grasos unidos a las distintas posiciones del esqueleto glicerídico de los TG, DG y LP se exponen en la Tabla XII. En las tres clases de lípidos se aprecia una preferencia de los ácidos grasos saturados por las posiciones α (1-3 para los TG y 1 para los DG y LP), y ello tanto para los ácidos endógenos como para los de nueva síntesis. Resulta absolutamente significativo que el ácido 20:0 sintetizado a partir de ^{14}C -acetato que, como decíamos en el apartado anterior, se ubica exclu-

% y activ. espec. de los ácidos grasos

| <u>Fracción</u> | <u>12:0</u> | <u>14:0</u> | <u>16:0</u> | <u>18:0</u> | <u>18:1</u> | <u>18:2</u> | <u>20:0</u> | <u>18:3</u> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| TG-1,3 rad. | - | - | 12 | 55 | 19 | - | 15 | - |
| masa | - | - | 16 | 3 | 29 | 37 | - | 14 |
| Ae | - | - | 0,6 | 11,8 | 0,4 | - | alta | - |
| TG-2 rad. | - | - | 21 | 33 | 46 | - | - | - |
| masa | - | - | 4 | 2 | 38 | 48 | - | 8 |
| Ae | - | - | 0,7 | 2,5 | 0,2 | - | - | - |
| LP-1 rad. | t | t | 28 | 47 | 21 | - | - | - |
| masa | t | t | 25 | 9 | 28 | 39 | - | - |
| Ae | - | - | 0,9 | 4,5 | 0,6 | - | - | - |
| LP-2 rad. | - | - | 13 | 10 | 47 | 30 | - | - |
| masa | - | - | 5 | 1 | 33 | 61 | - | - |
| Ae | - | - | 0,9 | 2,7 | 0,5 | 0,2 | - | - |
| DG-1 rad. | - | - | 30 | 70 | - | - | - | - |
| masa | 5 | 7 | 59 | - | 29 | - | - | - |
| Ae | - | - | 0,5 | alta | - | - | - | - |
| DG-2 rad. | - | - | 16 | 30 | 54 | - | - | - |
| masa | - | - | 14 | 7 | 39 | 40 | - | - |
| Ae | - | - | 0,3 | 1,0 | 0,3 | - | - | - |

TABLA XII. Análisis posicional de los lípidos de la semilla de guisante. El análisis se llevó a cabo con lipasa pancreática (TG y DG) o fosfolipasa A (LP) en las condiciones descritas en II.2.3 (pag. 50). Ae: actividad específica (ver Tabla XI).

sivamente en los TG, aparece exclusivamente en posición α . En tanto que el único ácido poliinsaturado radioactivo, linoleico, se localiza exclusivamente en la posición 2 de los LP.

El ácido esteárico da cuenta de la mayor parte de la radioactividad de las posiciones α , representando además las mayores actividades específicas. Por otra parte, el ácido oleico es el ácido marcado mas importante en la posición 2 de las tres clases de lípidos. La actividad específica total de las posiciones se muestra en la Tabla XIII. Puede apreciarse que las posiciones α presentan una mayor actividad específica en todos los casos.

III.2.4.- Separación de series homólogas.

Se llevó a cabo la separación en placa de sílice-nitrato de plata de los ésteres metílicos procedentes de los TG y de la posición 1 de los LP (pag. 64). Esta técnica, como ya se indicó, permite la separación de los ésteres metílicos según el grado de insaturación, independientemente de la longitud de cadena. Su utilización ofrece una confirmación acerca de la identidad de los compuestos detectados en el cromatograma general. La Tabla XIV muestra los resultados de las fracciones analizadas mediante esta técnica, que confirman la naturaleza de los ácidos grasos reseñados en las tablas anteriores.

III.2.5.- Discusión.

De los resultados obtenidos se desprende que la semilla de guisante utiliza el ^{14}C -acetato para la síntesis de sus lípidos durante las etapas iniciales de su germinación. Como es habitual en las semillas en germinación, la ma-

| | |
|-----------------|------|
| TRIGLICERIDOS | |
| Posición 1,3 | 0,71 |
| Posición 2 | 0,21 |
| LIPIDOS POLARES | |
| Posición 1 | 1,34 |
| Posición 2 | 0,55 |
| DIGLICERIDOS | |
| Posición 1 | 1,06 |
| Posición 2 | 0,24 |

TABLA XIII. Actividad específica total en las posiciones de los glicerolípidos de la semilla de guisante.

| ácido | TG | | LP posición 1 | |
|-------|--------|--------|---------------|--------|
| | % rad. | % masa | % rad. | % masa |
| 12:0 | t | t | - | - |
| 14:0 | t | 1 | - | - |
| 16:0 | 18 | 64 | 31 | 73 |
| 18:0 | 55 | 29 | 69 | 27 |
| 20:0 | 27 | 6 | - | - |
| 16:1 | - | 11 | t | 35 |
| 18:1 | 100 | 89 | 100 | 65 |

TABLA XIV. Análisis de las series homólogas de ácidos grasos por cromatografía en placa de sílice-nitrato de plata.

por incorporación tiene lugar en los LP (Harwood y Stumpf, 1970; Harwood, 1975; Stumpf, 1977), tanto en lo que se refiere a porcentaje de radioactividad incorporada como a actividad específica (Tabla X). La incorporación a los DG y TG también es intensa, siendo mayor, en valor absoluto, la de los TG; sin embargo, la diferencia de masa entre unos y otros hace que los DG presenten una actividad específica más alta.

En cuanto a la distribución de los ácidos grasos en las distintas posiciones de los lípidos se observa que, en todos los casos, la posición 2 presenta una actividad menor (Tabla XIII). En el caso de los TG no se ha podido diferenciar la posición 1 de la 3, debido a que estas posiciones no son reconocidas por la lipasa pancreática. El análisis estereoespecífico que hubiera resuelto esta duda, requiere una cantidad mínima de TG marcados que no ha sido posible obtener en ninguna de nuestras incubaciones. No obstante, teniendo en cuenta que el mecanismo aceptado para la síntesis de TG supone la acilación de los 1,2-DG en la posición 3 por un acil-CoA o acil-ACP (Shine y col., 1976b), puede suponerse que la posición 3 debe estar ocupada en parte por ácidos grasos procedentes del ^{14}C -acetato.

En cuanto al análisis de ácidos grasos podemos admitir que los datos relativos a masa representan fundamentalmente los ácidos constituyentes de los lípidos de la semilla en reposo, mientras que los porcentajes de radioactividad representan los ácidos formados a partir del precursor marcado en el transcurso de la incubación. Los ácidos grasos radioactivos más importantes son 16:0, 18:0 y 18:1. El 18:0, como es frecuente en muchos tejidos, presenta una actividad específica anormalmente alta, lo que indica una cierta inhibición de la desaturación a 18:1 todavía no explicada. En contra de los resultados de otros autores (Harwood y Stumpf, 1970 y 1971) hemos podido detectar la presencia de ácidos insaturados de nueva síntesis: 18:1 y 18:2. Tanto uno como otro se localizan preferentemente en la posi-

ción 2. Por otra parte, el 18:3 no ha sido detectado entre los ácidos grasos recientemente sintetizados, lo que es frecuente en la mayoría de los tejidos. En cuanto al 20:0, que los autores antes citados (Harwood y Stumpf, 1970) detectaron como componente muy activo de las ceras de la cutícula, solo lo hemos encontrado en la posición 1-3 de los TG, mientras que en la fracción de ceras no encontramos prácticamente actividad alguna.

Es de destacar la gran diferencia que se aprecia entre la composición de ácidos grasos marcados y no marcados de los acil-CoAs. No se encontraron ácidos insaturados marcados, en tanto que los porcentajes de masa arrojan un 60 % de dichos ácidos. La ausencia de 18:1 marcado es tanto mas sorprendente por cuanto que aparece, en buena proporción, en todas las demás fracciones analizadas, y es un hecho comprobado que los acil-CoAs son donadores de restos acilo en la síntesis de lípidos (pag. 30). Los datos obtenidos parecen indicar la existencia de dos rutas separadas de formación de acil-CoAs. Una de ellas tendría su origen en el ^{14}C -acetato administrado durante la incubación, y la otra en la degradación de los lípidos de reserva de la semilla. La primera, que comienza en el ^{14}C -acetato, termina con la secuencia acil-ACP \rightarrow AG \rightarrow acil-CoA por efecto de la pareja de enzimas tioesterasa-tioquinasa (Shine y col., 1976a). Tanto los acil-ACPs como los acil-CoAs transfieren sus restos acilo a los lípidos por acción de las transferasa (pag. 28). La actividad de estas tres enzimas para los diversos sustratos regula la composición de los lípidos sintetizados y, de rechazo, los niveles de los diferentes aciltioésteres. En efecto, el 16:0 pasa mas eficazmente que el 18:0 y el 18:1 desde el ACP al CoA; el 18:1-ACP y el 18:0-ACP se transfieren mas eficazmente a los lípidos que el 16:0-ACP; y por último el 18:1-CoA es transferido muy rapidamente a los lípidos (Shine y col., 1976b). Estos hechos explican que en la fracción de los acil-CoAs radioactivos el 16:0 supere en porcentaje al 18:0, y que el 18:1 esté completamente ausente. La segunda ruta produce acil-CoAs por efecto de las

tioquinasas sobre los ácidos grasos liberados en la hidrólisis de los lípidos de reserva, que no son radioactivos. Esta ruta aporta continuamente ácidos grasos, preferentemente insaturados, justificando la composición de los acil-CoAs no radioactivos.

En la Fig. 10 puede verse el esquema general de la síntesis de lípidos en la semilla de guisante incubada con ^{14}C -acetato. La activación de éste a ^{14}C -acetil-CoA por acción de la acetiltioquinasa permite su entrada en la ruta de síntesis de novo. Pero al mismo tiempo los azúcares de reserva de la semilla se movilizan a través de la glucólisis para originar también acetil-CoA. Si bien la mayor parte de éste entra en el ciclo de Krebs para producir la energía necesaria para la germinación, una parte puede utilizarse en la síntesis de novo. De este "pool" de acetil-CoA, unos marcados y otros no, se forman ácidos grasos saturados de hasta 16 átomos de carbono como ésteres del ACP. El posterior alargamiento y la primera desaturación originan 18:0-ACP y 18:1-ACP. Todos ellos pueden pasar a los correspondientes acil-CoAs según se ha indicado. De manera que el resultado final es un conjunto de aciltioésteres, radioactivos y no radioactivos, disponibles para la síntesis de lípidos. Los más importantes son los 1,2-DG, que se acilan en la posición 3 para dar TG, y los 1-liso-PL, que se acilan en la posición 2 originando PL. Así pues, al comienzo de la incubación los glicéridos parciales no radioactivos son acilados por aciltioésteres radioactivos y no radioactivos. En el curso de la incubación, cuando ya se han formado glicéridos parciales radioactivos, estos también deben ser acilados a partir del conjunto de aciltioésteres antes indicado. Como consecuencia, los lípidos que se obtienen al final de la incubación presentan una distribución de los ácidos grasos marcados que es difícil de interpretar aun disponiendo de los valores de radioactividad y masa de cada ácido en las distintas posiciones.

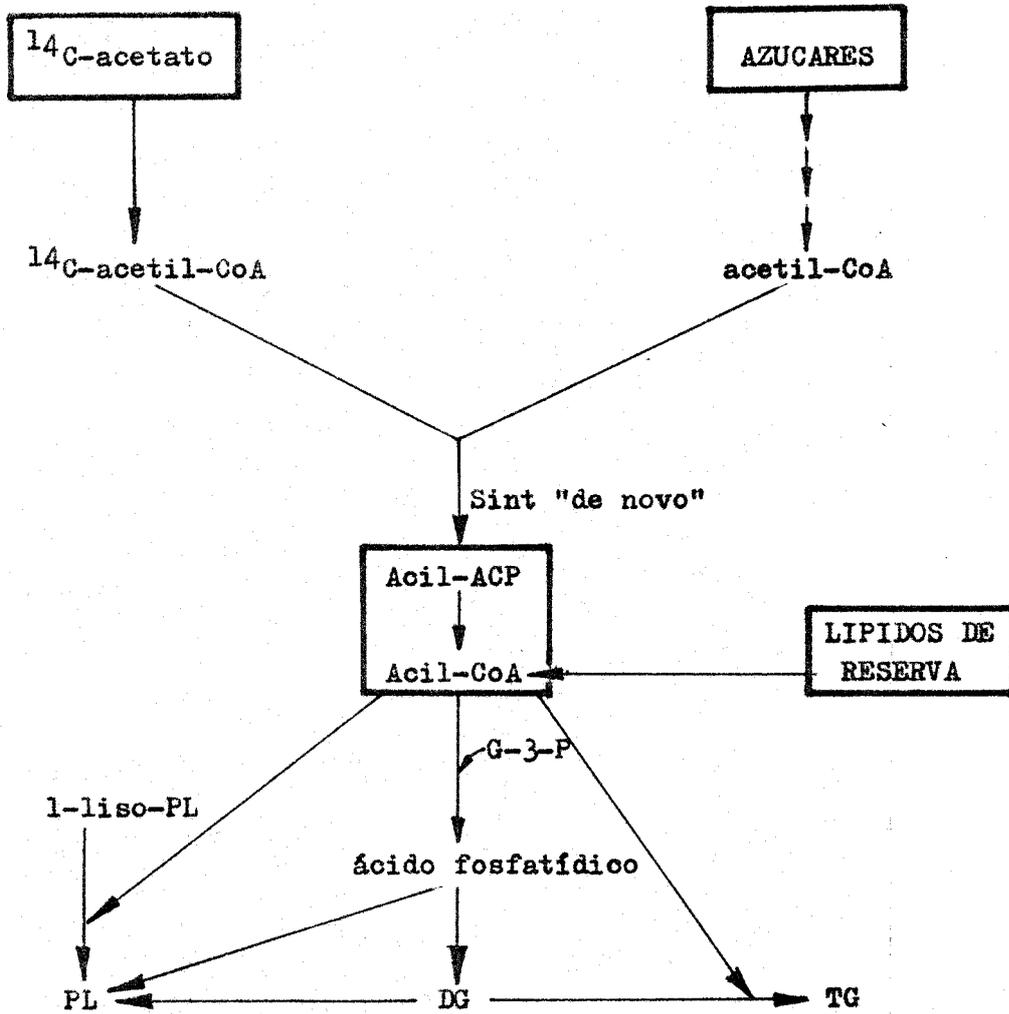


FIG. 10. Esquema propuesto para explicar la participación de los aciltioésteres en el metabolismo lipídico de la semilla de guisante en germinación incubada con ^{14}C -acetato.

III.3.- BIOSINTESIS DE LIPIDOS EN LA SEMILLA DE GIRASOL EN FORMACION.

Indudablemente las semillas oleaginosas, materia prima para la extracción de los aceites vegetales de mayor consumo para la alimentación humana, tienen una importancia económica de primer orden, por lo que el conocimiento de los mecanismos de síntesis y acumulación de lípidos en estas semillas es tema de gran interés. Sin embargo, como dice Appelqvist en una reciente revisión (Appelqvist, 1975), los bioquímicos han dedicado una atención mas bien escasa al tema, a pesar de su interés práctico. El motivo de esta escasa dedicación quizás estribe en los problemas técnicos que plantea la disponibilidad de semillas oleaginosas en formación, pues hay que considerar que la acumulación de lípidos de reserva se produce durante un periodo breve, cuestión de dias, en el curso de la maduración de estas semillas, razón por la que su utilización está sujeta a un régimen estacional o, en otro caso, al cultivo de estas plantas en invernaderos, lo cual no siempre es sencillo, sobre todo en el caso de plantas de mediano porte, como es el girasol. No es de extrañar, por tanto, que los investigadores prefieran materiales biológicos mas facilmente asequibles, digamos hojas, frutos, tubérculos, semillas en germinación.

En el trabajo que a continuación se describe se abordó el estudio de la síntesis de lípidos en semillas de girasol recogidas en campos de cultivo de los alrededores de Sevilla unos 30 dias despues de la floración. El estudio tenia especial interés por tratarse de un material casi desconocido en estudios de biosíntesis de lípidos. Se ha probado la capacidad de síntesis, a partir de diversos precursores radioactivos, en el tejido intacto y en un extracto subcelular conteniendo las fracciones microsómica y soluble.

III.3.1.- Incorporación y desaturación del ^{14}C -oleato en el tejido intacto.

Como experiencia preliminar nos propusimos examinar la actividad oleato desaturasa en semillas intactas de girasol en formación, así como su capacidad para incorporar precursores marcados en las diferentes clases de lípidos.

Los resultados obtenidos, Tabla XV, nos muestra como la mayor parte de la radioactividad del ^{14}C -oleato se incorpora a los TG, lo que resulta completamente coherente con el estado fisiológico del material ensayado: semilla oleaginosa en la etapa de acumulación de lípidos de reserva. Por otra parte, el análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de las distintas fracciones glicéridicas nos demuestra que el tejido presenta una considerable actividad oleato desaturasa, y que el ^{14}C -linoleato formado tiende a acumularse en los TG, en tanto que la composición de ácidos grasos marcados en LP y DG resulta muy similar.

Los acil-CoAs representan únicamente un pequeño porcentaje de la radioactividad total incorporada, como es habitual en los tejidos intactos.

III.3.2.- Incorporación de precursores marcados en diferentes clases de lípidos y acilglucolípidos en extractos libres de células.

Como se ha indicado en el apartado anterior, la semilla de girasol en desarrollo es capaz de incorporar y desaturar ^{14}C -oleato, cuando se ensaya el tejido intacto. Sin embargo la experimentación con tejido intacto presenta el inconveniente de no permitir la adición de determinados cofactores que son habituales en el metabolismo lipídico, ya que no pueden atravesar las paredes celulares. De forma que es imposible estudiar el efecto de tales cofactores. Nosotros estábamos particularmente interesados en estudiar el papel de las moléculas portadoras de acilo, ACP y CoA, así que decidimos

| <u>Fracción</u> | <u>Cuentas</u> | <u>%</u> | <u>%18:1</u> | <u>%18:2</u> |
|-----------------|----------------|----------|--------------|--------------|
| Acil-CoAs | 4.860 | 0,8 | | |
| LP | 124.260 | 22,1 | 81 | 19 |
| DG | 74.900 | 13,3 | 77 | 23 |
| TG | 325.740 | 57,8 | 47 | 53 |
| AG | 33.680 | 6,0 | | |

TABLA XV. Distribución de la radioactividad entre las distintas clases de lípidos de la semilla de girasol incubada con ^{14}C -oleato. La incubación se realizó utilizando la semilla intacta, a 30°C y durante 20 h.

ensayar la capacidad de incorporar y transformar ácidos grasos radioactivos en extractos enzimáticos obtenidos de la semilla de girasol. Nuestro extracto enzimático, sobrenadante obtenido después de la centrifugación del extracto bruto a 10.000 g, contenía las fracciones celulares soluble y microsómica, y fue incubado con los siguientes sustratos radioactivos: ^{14}C -laurato, ^{14}C -palmitato, ^{14}C -estearato y ^{14}C -oleato. Todos ellos fueron ensayados en presencia de ATP y CoA exógenos, y dos de ellos, laurato y palmitato, fueron examinados en presencia de ACP de espinaca, además de los cofactores antes citados.

La radioactividad incorporada a partir de los distintos precursores en las diferentes clases de lípidos aparece en la Tabla XV. Puede apreciarse una buena incorporación de radioactividad en lípidos a partir de todos los precursores ensayados. El porcentaje de precursor radioactivo que resultó metabolizado se calculó, en cada caso, a partir de la radioactividad detectada en la fracción de ácidos grasos libres, AG, suponiendo que esta cifra representa la cantidad de precursor que no resultó metabolizado. Independientemente del precursor utilizado, los TG constituyen la fracción lipídica que acumula el mayor porcentaje de radioactividad, lo mismo que ocurre en el tejido intacto, lo que indica que nuestro extracto enzimático retiene al menos una parte importante de la capacidad de síntesis de TG.

Los acil-ACPs incorporan solo una pequeña parte de la radioactividad total correspondiente al precursor metabolizado, excepto en el caso del ácido laúrico cuando se incubaba en presencia de ACP exógeno; mas adelante se discute el significado de este dato. Por su parte, los acil-CoAs en todos los casos acumula una importante fracción de la radioactividad total, indicando una intensa actividad aciltioquinasa. Solo en la experiencia realizada con ^{14}C -oleato se encontró un bajo porcentaje de radioactividad en los acil-CoAs, y ello se debe, probablemente, al agotamiento del precursor

| | 12:0 | 16:0 | 18:0 | 18,1 | 12:0 (ACP) | 16:0 (ACP) |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Acil-ACPS | 0,77 (1,9) | 0,17 (0,4) | 0,16 (0,3) | 0,24 (0,2) | 5,32 (19,4) | 0,40 (1,8) |
| Acil-CoAs | 7,45 (18,2) | 7,96 (16,5) | 8,29 (15,9) | 5,30 (4,6) | 6,92 (25,2) | 5,98 (26,7) |
| DG | 2,85 (6,9) | 5,43 (11,2) | 4,88 (9,3) | 12,30 (10,6) | 3,12 (11,3) | 6,95 (31,0) |
| TG | 23,04 (56,2) | 20,72 (42,9) | 26,74 (51,2) | 52,20 (45,0) | 8,98 (32,7) | 4,04 (18,0) |
| LP | 6,91 (16,8) | 14,04 (29,1) | 12,11 (23,2) | 36,00 (31,0) | 3,14 (11,4) | 5,04 (22,5) |
| AG | 81,39 | 111,82 | 73,24 | 6,10 | 65,63 | 103,96 |
| TOTAL | 122,41 | 160,14 | 125,42 | 122,15 | 93,11 | 126,37 |
| % Metabol. | 34,6 | 30,2 | 41,6 | 95,0 | 29,5 | 17,7 |

TABLA XVI. Actividad total en las distintas fracciones. Los ácidos grasos libres se toman como fracción de isótopo no incorporado, sustrayéndolo al total permite calcular el porcentaje de precursor metabolizado. Los porcentajes que aparecen junto al número de cuentas se refieren a la fracción de isótopo metabolizado, de ahí que no incluya a los AG.

radioactivo agregado, habida cuenta de la pequeña fracción de radioactividad detectada en los AG correspondientes.

III.3.3.- Análisis posicional de los glicerolípidos.

En los glicéridos naturales se aprecia una tendencia de ciertos ácidos grasos por localizarse en determinadas posiciones de la molécula glicerídica; así, es bien conocido el hecho de que los TG vegetales presentan una escasa proporción de ácidos grasos saturados en la posición 2 (Hitchcock y Nichols, 1971).

El análisis posicional, realizado con lipasa pancreática o fosfolipasa A, según se describió en II.2.3 (pag. 58), de los TG, DG y LP (Tabla XVI) nos muestra que los ácidos grasos radioactivos ocupan preferentemente las posiciones α de los glicerolípidos, excepto el ácido oleico, que aparece en mayor proporción en la posición β de DG y LP.

III.3.4.- Composición de ácidos grasos de diferentes fracciones aisladas.

Los resultados del análisis, por radiocromatografía de gases, de los ésteres metílicos radioactivos obtenidos de distintas fracciones se muestran en la Tabla XVII. Intencionadamente hemos omitido los datos de ciertos cromatogramas que solo mostraban el pico correspondiente al precursor, por no alargar la tabla con datos carentes de interés. por otra parte, como en los resultantes de los experimentos realizados empleando palmitato y estearato como precursor, de los que solo hemos incluido, como muestra, los análisis de los ésteres metílicos derivados de los acil-CoAs.

En la composición de ácidos grasos de los acil-CoAs se aprecia que solo el laurato y el oleato resultan transformados en el curso de la incu-

| Fracción | Precursor utilizado | | | | | |
|----------------|---------------------|--------|--------|---------|-----------|-----------|
| | 12:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 12:0(ACP) | 16:0(ACP) |
| TG-1,3 | 48.300 | 57.230 | 44.280 | 46.440 | 34.070 | 13.070 |
| TG-2 | 3.000 | 3.750 | 2.970 | 29.220 | 1.320 | 1.740 |
| α/β | 16,1 | 15,3 | 14,9 | 1,6 | 25,8 | 7,5 |
| DG-1 | 9.820 | 25.370 | 12.280 | 39.050 | 12.860 | 39.620 |
| DG-2 | 1.690 | 4.090 | 3.970 | 43.010 | 2.030 | 6.220 |
| 1 / 2 | 5,8 | 6,2 | 3,1 | 0,9 | 6,3 | 6,4 |
| LP-1 | 5.140 | 34.780 | 16.620 | 50.250 | nd | nd |
| LP-2 | 900 | 6.830 | 9.190 | 100.680 | nd | nd |
| 1/2 | 5,7 | 5,1 | 1,8 | 0,5 | - | - |

TABLA XVII. Resultados del análisis posicional de los glicerolípidos de la semilla de girasol. Las incubaciones se llevaron a cabo utilizando el extracto celular y los diferentes precursores indicados (condiciones experimentales en II.3.1, pag. 54). El análisis enzimático se realizó con lipasa pancreática o fosfolipasa A (pag. 50).

| Fracción | Precursor | Composición de ácidos grasos (%) | | | | | |
|----------|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 |
| Acil-CoA | 12:0 | 70 | 4 | 16 | 10 | -- | -- |
| | 12:0(ACP) | 63 | 3 | 12 | 22 | -- | -- |
| | 16:0 | -- | - | 100 | --- | -- | -- |
| | 16:0(ACP) | -- | - | 100 | -- | -- | -- |
| | 18:0 | -- | - | -- | 100 | -- | -- |
| | 18:1 | -- | - | -- | -- | 85 | 15 |
| Acil-ACP | 12:0 | 14 | 12 | 74 | -- | -- | -- |
| | 12:0(ACP) | 4 | 3 | 41 | 52 | -- | --- |
| LP | 18:1 | - | - | - | - | 85 | 15 |
| TG | 18:1 | - | - | - | - | 80 | 20 |

TABLA XVIII Composición de ácidos grasos marcados en diferentes fracciones aisladas.

bación, en tanto que palmitato y estearato permanecen sin modificar. Nuestro sistema se muestra capaz de alargar el laurato hasta 18:0, pero no de desaturar éste a 18:1. Por otra parte, se aprecia una importante capacidad de desaturación de 18:1 a 18:2, encontrándose un 15 % de este último en los acil-CoAs correspondientes. Similares porcentajes de linoleato se detectaron en los LP y TG.

III.3.5.- Discusión.

Los cotiledones de la semilla de girasol en formación muestran una notable capacidad para incorporar y desaturar el ^{14}C -oleato, como se muestra en la Tabla XV. La mayor parte de la radioactividad incorporada se acumula en los TG, lo que concuerda perfectamente, como ya se dijo, con el estado fisiológico de las semillas. Por el contrario, las semillas en germinación, en las que predomina la síntesis de lípidos de membrana, los ácidos grasos marcados tienden a acumularse en los LP, Tanto en las semillas oleaginosas en germinación (Harwood, 1975b) como en semillas con bajo contenido en lípidos de reserva (Tabla X; Bolton y Harwood, 1977a).

Los TG son también los que acumulan mayor cantidad de ^{14}C -linoleato formado en el transcurso de la incubación. Si aceptamos que los TG se sintetizan por acilación de los DG (Hitchcock y Nichols, 1971) nuestros resultados apoyan la hipótesis recientemente enunciada por Slack y col. (1978), ya que sugieren que los DG proceden de los PL, por acción de una fosfolipasa, en razón a la similitud de composición que presentan. Entonces, el aumento en la proporción de 18:2 que se observa en los TG indica que la acilación en la posición 3 de los DG, etapa final de la ruta de síntesis de TG, se realiza preferentemente a partir de 18:2-CoA. Esta suposición es coherente con el hecho experimental de que el oleil-CoA es rápidamente incorporado en la PC, que es donde tiene lugar la desaturación a 18:2 (Gurr,

1971; Stymne y Appelqvist, 1978), de forma que el ^{14}C -linoleil-CoA tiene una mayor oportunidad de acilar a los DG, incrementando así la proporción de 18:2 en los TG.

Cuando se ensayó el extracto enzimático, conteniendo las fracciones celulares microsómica y soluble, con diversos ácidos grasos radioactivos siempre se encontró una importante incorporación del precursor. Ya que los ácidos grasos han de ser activados, a los correspondientes aciltioésteres, para poder penetrar en las rutas metabólicas (pag. 14), los resultados indican que el sistema posee una notable actividad aciltioquinasa, y efectivamente los acil-CoAs en todos los casos dan cuenta de una fracción apreciable de la radioactividad incorporada (Tabla XVI).

El ácido láurico, al contrario de los demás precursores, dá lugar a un aumento de la radioactividad asociada a los acil-ACPs cuando el ACP de espinaca está presente en el medio de incubación. El otro ácido ensayado en presencia de ACP, el ácido palmítico, origina un aumento menos pronunciado en la radioactividad incorporada en esta fracción. Los resultados concuerdan con el hecho demostrado de que solo los ácidos grasos de cadena corta pueden ser activados a ésteres del ACP; es decir, las plantas poseen acil-ACP sintetasas que son activas únicamente con ácidos grasos de cadena corta (Ohlrogge y col. 1978), mientras que los ácidos grasos de cadena larga, de 14 átomos de carbono en adelante, no pueden unirse al ACP, aunque sí al CoA.

Los resultados del análisis posicional muestran la preferencia de los ácidos grasos saturados por las posiciones α en las tres clases de glicero-lípidos (Tabla XVII), en consonancia con los resultados analíticos previos (Hitchcock y Nichols, 1971). El aumento observado en la relación α/β en la experiencia en la que se utilizó ^{14}C -laurato en presencia de ACP (Tabla XVII), posiblemente está en relación con el aumento del "pool" de acil-

ACPs radioactivos, en cuyo caso constituiría una evidencia, si bien indirecta, de la capacidad de los acil-ACPs para acilar la posición 3 de los DG y formar TG; evidencia mas directa sobre esta capacidad ya fue presentada por Shine y col. (1976b). Los ácidos insaturados presentan una menor afinidad por las posiciones α de los TG, mientras que en los LP muestran una clara preferencia por la posición 2. En general, y de acuerdo con los resultados obtenidos en la experiencia con tejido intacto (Tabla XV), los DG y LP se muestran mas similares entre si que con los TG, lo que apoya la relación de procedencia PL \longrightarrow DG que comentabamos en las líneas precedentes (Slack y col., 1978).

Hemos indicado anteriormente que solo el ácido laúrico puede ser activado al correspondiente tioéster del ACP. Resultados previos indican claramente que para que un ácido graso pueda intervenir en una determinada reacción ha de estar unido al portador adecuado. Así, las reacciones de alargamiento hasta ácidos grasos de 16, 18 y 20 átomos de carbono tienen lugar con el concurso del ACP como portador (pp. 17-22). Efectivamente nuestro sistema es capaz de alargar el lauril-ACP hasta estearil-ACP (Tabla XVIII), y en una extensión tal que solo el 4 % de los ácidos grasos encontrados en los acil-ACPs era 12:0, cuando el ACP estaba presente en el medio de reacción. Estos resultados concuerdan con los de Ohlogge y col. (1978) quienes demostraron que la semilla de jojoba (Simmondsia chinensis) podía alargar los ácidos 10:0 y 12:0 agregados exogenamente, y en poca extensión (4 %) el 14:0, pero no los ácidos grasos de cadena mas larga. Por el contrario, Oo y Stumpf (1979) han demostrado que los ácidos 10:0 y 12:0, aunque son incorporados en los TG del mesocarpo de coco (Cocos nucifera), no son modificados en absoluto, quizás porque dicho tejido carece de acil-ACP sintetasa o posee algún inhibidor específico de la reacción.

Por otra parte, la presencia de los ácidos 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0 en

los acil-CoAs de las experiencias en las que el ^{14}C -laurato fue usado como precursor, se justifica plenamente por la existencia del sistema de conexión, tioesterasa-tioquinasa, entre las ratas del ACP y el CoA, propuesto por Shine y col. (1976a) y descrito anteriormente (pag. 28).

Los ácidos palmítico y esteárico permanecen inalterados en el curso de la incubación, debido a que las plantas no poseen una acil-ACP sintetasa activa para ácidos grasos de cadena larga, tal como la demostrada por Ray y Cronan (1976) en E.coli.

La existencia de una fracción estimable de 18:2 en los acil-CoAs trae de nuevo a colación la polémica en torno a la síntesis de linoleato en plantas (pag. 23). Nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis de Vijay y Stumpf (1971) de que la desaturación tiene lugar sobre el oleil-CoA para originar linoleil-CoA; aunque no contradicen, en modo alguno, la hipótesis alternativa de Gurr y col. (1969), defendida por numerosos autores (Stymne y Appelqvist, 1978; Slack y col., 1978), de que la reacción de desaturación se realiza utilizando oleil-PC como sustrato, ya que el linoleato presente en los acil-CoAs puede provenir de la PC de donde podría haber sido liberado por una fosfolipasa, y el ácido grasos libre sería unido al CoA por la acción de la linoleil-CoA tioquinasa.

Resumiendo podemos decir que las semillas de girasol en desarrollo tienen una considerable capacidad para sintetizar TG a partir de ácidos grasos preformados. Además presentan una notable actividad oleatodesaturasa. Estas capacidades fueron preservadas en un extracto enzimático conteniendo las fracciones celulares soluble y microsómica. Este extracto se mostró capaz de alargar el ácido láurico agregado exogenamente indicando que la ruta de síntesis de novo es operativa en este sistema.

Por todo ello, podemos concluir que las semillas de girasol en formación constituyen un excelente material para el estudio de la biosíntesis de TG, así como de linoleato, en plantas superiores.

III.4.- SINTESIS DE LIPIDOS EN CLOROPLASTOS DE ESPINACA AISLADOS.

La capacidad de síntesis de ácidos grasos y lípidos, a partir de acetato, por parte de los cloroplastos aislados se conoce desde hace 20 años, en que el ruso Smirnov (1960) demostró tal capacidad en cloroplastos de espinaca en presencia de luz. Desde entonces los trabajos sobre biosíntesis de lípidos en estos orgánulos se han multiplicado, hasta llegar a constituir uno de los materiales biológicos habituales en este área de investigación.

Los plastidios son orgánulos dotados de una gran capacidad biosintética, y desde luego constituyen en principal sitio de síntesis de ácidos grasos, si no el único, en la célula vegetal (Roughan y col., 1976; Roughan y col., 1979a). Como además poseen autonomía energética, cuando se aíslan en buenas condiciones, no es de extrañar el favoritismo dispensado a este orgánulo por parte de los investigadores implicados en nuestro campo. Sin embargo, frente a estas ventajas indudables, los cloroplastos presentan el inconveniente de poseer una envuelta que los hace impermeables a muchos cofactores habitualmente utilizados. En relación con esto es necesario tener presente el grado de integridad de los cloroplastos aislados, así como la contaminación por parte de otros orgánulos celulares, pues la falta de control sobre estos factores puede conducir a una errónea interpretación de los resultados (Leech, 1977).

Nosotros hemos estudiado la capacidad de síntesis de lípidos y aciltoésteres, a partir de ^{14}C -acetato, en cloroplastos aislados y purificados de hojas de espinaca, y los resultados obtenidos se exponen y se discuten a continuación.

III.4.1.- Incorporación de ^{14}C -acetato en cloroplastos intactos en ausencia de cofactores exógenos.

Los cloroplastos de espinaca aislados incorporan activamente ^{14}C -acetato en sus lípidos durante la primera hora de incubación, según se aprecia en la Fig. 11. La cinética parabólica observada en la incorporación de ^{14}C -acetato, análoga a la registrada por otros autores (Nakamura y Yamada, 1975a), probablemente es reflejo de una pérdida de actividad de los cloroplastos con el tiempo, ya que la concentración del precursor radioactivo permanece prácticamente constante, pues se puso en exceso. Los acilglucolípidos incorporan un escaso porcentaje del precursor marcado en estas condiciones.

III.4.2.- Ensayo de la actividad del ACP de espinaca.

La actividad de la solución de ACP de hojas de espinaca, obtenida por el método de Simoni y col. (1.967) según se describe en el apartado II.3. (pag. 42), fue ensayado en las condiciones indicadas en II.4.3 (pag. 50). Los resultados obtenidos, Tabla XIX, nos muestran que las fracciones eluidas de la columna de DEAE-celulosa con soluciones salinas 0,20 y 0,30 M son las que muestran un efecto estimulador significativo sobre la síntesis de acilglucolípidos a partir de ^{14}C -acetato.

Las fracciones 0,20 y 0,30 M fueron juntadas y se determinó la actividad de esta solución final en las mismas condiciones, para definir la concentración de ACP que produce una estimulación máxima de la síntesis de lípidos. Los resultados, mostrados en la Tabla XX, nos indican que 0,3 ml de la solución de ACP obtenida (4,2 mg de proteína) por mililitro de medio de incubación, son suficientes para saturar el sistema.

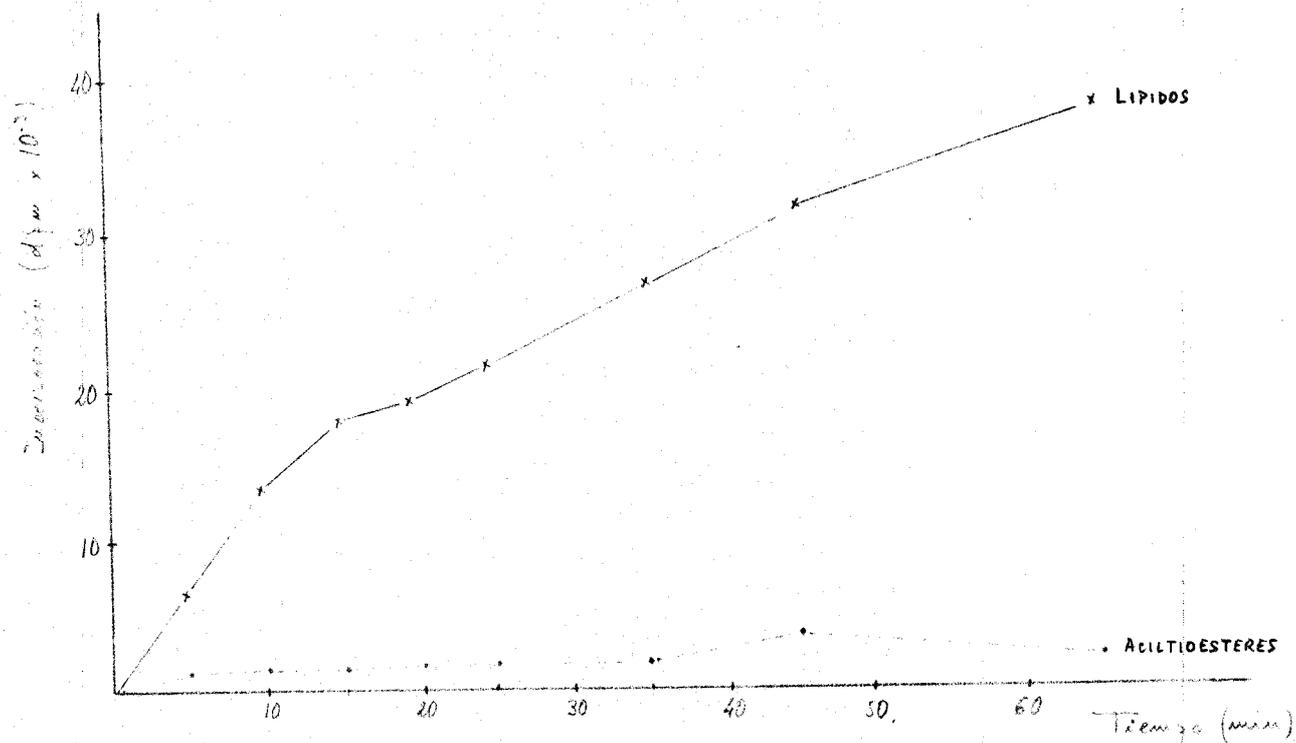


FIG 11. Incorporación de ^{14}C -acetato en los lípidos y acilglicéridos de cloroplastos de espinaca incubados en la luz y en ausencia de cofactores exógenos. El medio de incubación contenía cloroplastos equivalentes a 200 μg clorofila/ml y 5 μCi ^{14}C -acetato/ml. Condiciones de la incubación: 20°C, luz y agitación constante. Se tomaron muestras de 0,25 ml a los tiempos indicados.

| <u>Fracción</u> | <u>Incorporación (cuentas)</u> | |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------|
| | <u>Lípidos</u> | <u>Aciltioésteres</u> |
| blanco | 7.033 | 2.733 |
| 0,15 M | 7.533 | 2.990 |
| 0,20 M | 10.332 | 7.800 |
| 0,30 M | 12.265 | 9.566 |

TABLA XIX. Actividad de las distintas fracciones eluidas de la columna de DEAE-celulosa en el procedimiento de aislamiento de ACP de espinaca (II.4.2; pag. 59). La actividad se ensayó con cloroplastos rotos según se describe en ~~XXXXXX~~ (pag. 50).

| <u>ACP (ml)</u> | <u>Proteína (mg)</u> | <u>Incorporación (cuentas)</u> |
|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| 0,0 | 0,0 | 7.833 |
| 0,1 | 1,4 | 13.165 |
| 0,3 | 4,2 | 18.531 |
| 0,6 | 8,4 | 17.165 |

TABLA XX. Ensayo de la actividad de la solución final de ACP de espinaca obtenida por el método de Simoni y col. (1967). La solución contenía 14 mg de proteína/ml.

III.4.3.- Síntesis de lípidos y acil tioésteres en presencia de cofactores exógenos.

Cuando los cloroplastos de espinaca se incuban con ^{14}C -acetato en presencia de ATP y CoA exógenos, la cinética de incorporación de radioactividad en lípidos y acil tioésteres es muy distinta a la mostrada por dichos cloroplastos en ausencia de cofactores (Fig. 11). Se realizaron ensayos con cloroplastos aislados de hojas jóvenes y en los obtenidos de hojas maduras, y en la Fig. 12 se muestran los resultados obtenidos.

Los acil-ACPs incorporan siempre una fracción pequeña de la radioactividad, que se mantiene prácticamente constante con el tiempo. Los acil-CoAs, por otra parte, siempre dan cuenta de porcentajes notables del precursor incorporado, y llegan a constituir, con el tiempo, la fracción más importante. Los lípidos, por su parte, siguen una cinética de incorporación prácticamente lineal durante todo el tiempo ensayado.

Puede observarse como, y de acuerdo con resultados previos (Kannangara y Stumpf, 1971), las hojas jóvenes muestran una mayor capacidad de incorporación en sus cloroplastos en todas las fracciones aisladas en los distintos tiempos.

También se ha determinado la composición de ácidos grasos de los lípidos y acil tioésteres de los cloroplastos incubados con ^{14}C -acetato en presencia de cofactores exógenos. Los resultados (Tabla XXI) nos muestran como la composición de ácidos grasos no marcados de los lípidos difiere considerablemente de la que presentan los acil tioésteres, como ocurría en la hoja de espinaca intacta (Tabla VI, pag. 79). El ácido linolénico, 18:3, representa 2/3 de los ácidos grasos totales presentes en los lípidos, y en los acil tioésteres no aparece en absoluto, predominando en estos últimos el ácido palmítico. Los porcentajes de ácidos grasos radioactivos concuerdan esencialmente con los resultados previos (Roughan y col., 1976), y en los acil tioésteres se observa, así mismo, la preponderancia de 18:1 y 16:0.

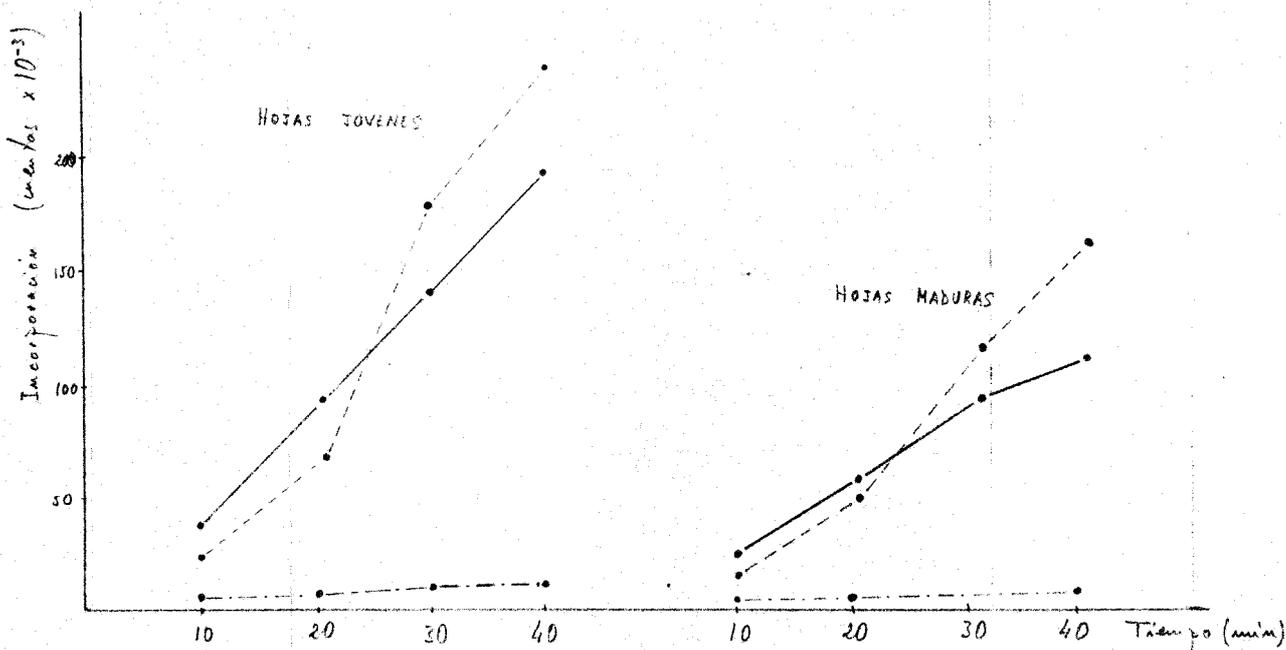


FIG. 12. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos (—), acil-CoAs (----) y acil-ACPs en cloroplastos de espinaca aislados de hojas jóvenes (a la izquierda) y de hojas maduras (a la derecha). La mezcla de incubación contenía cloroplastos equivalentes a $45\ \mu\text{g}$ de clorofila por mililitro, $5\ \mu\text{Ci}$ de ^{14}C -acetato/ml, ATP 2 mM y CoA 1 mM. El volumen inicial fue de 5 ml y se tomaron muestras de 1 ml a los tiempos indicados. La incubación se llevó a cabo a 20°C , con luz y agitación constante.

| a. graso | LIPIDOS | | Acil-CoAs | | Acil-ACPs | |
|--------------------|---------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | %masa | %rad. | %masa | %rad. | %masa | %rad. |
| 12:0 | 0,5 | t | 2,9 | 2 | - | - |
| 14:0 | 1,1 | 1 | 4,3 | 5 | 6,7 | - |
| 16:0 | 9,9 | 21 | 48,7 | 16 | 43,7 | 11 |
| 16:1 | 1,9 | - | 6,5 | - | - | - |
| 18:0 | 0,7 | 3 | 20,2 | 4 | 14,9 | 13 |
| 18:1 | 14,7 | 68 | 17,3 | 47 | 34,7 | 58 |
| 18:2 | 5,6 | 4 | - | - | - | - |
| 18:3 | 65,5 | - | - | - | - | - |
| Otros ¹ | - | - | t | 26 | t | 18 |

TABLA XXI. Composición de ácidos grasos de los lípidos y acil-tioésteres de los cloroplastos de espinaca. Los cloroplastos de espinaca, 100 μ g clorofila/ml, fueron incubados con 5 μ Ci 14 C-acetato/ml, a 25°C, durante 30 min con luz y cofactores (ATP 2 mM, CoA 0,5 mM, DTT 0,5 mM).

(1) Se incluyen ácidos grasos que presentan un tiempo de retención mayor que el 18:2.

III.4.4.- Efecto de las concentraciones de ATP y CoA sobre la incorporación de radioactividad en lípidos y aciltioésteres.

Para verificar y valorar el efecto de los cofactores ATP y CoA sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en los restos acilo de los lípidos y aciltioésteres, se llevó a cabo una experiencia bifactorial en la que las concentraciones de ATP se variaron de 0 a 4 mM, y las de CoA de 0 a 3,2 mM.

Los resultados obtenidos, Tabla XXII, nos muestran como la presencia de cofactores afecta de forma distinta a la incorporación de radioactividad en lípidos y aciltioésteres. Así, en los lípidos se aprecia una variación mas bien pequeña de la radioactividad incorporada en los distintos tratamientos. El CoA, en ausencia de ATP, produce un incremento en la incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos por un factor de 1,3 entre las dos concentraciones extremas utilizadas; mientras que el ATP, en ausencia de CoA, muestra un cierto efecto inhibitorio.

Diferencias mas acentuadas se observan en los aciltioésteres. En principio ninguno de los dos cofactores, actuando separadamente, produce diferencias considerables. Sin embargo, el CoA, en presencia de ATP, provoca una importante estimulación en la incorporación de radioactividad en los restos acilo de los aciltioésteres, por un factor de 4 aproximadamente. La concentración óptima de CoA se situa alrededor de 1,5 M, según se aprecia en la Fig. 13.

El ATP, por su parte, parece saturar el sistema a una concentración de 1 mM, pues las concentraciones superiores a estas no muestran efecto significativo.

En resumen, podemos decir que el CoA ejerce un efecto estimulador sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en los restos acilo de los aciltioésteres siempre que se ensaye en presencia de ATP.

| ATP (mM) | | CoA (mM) | | | | | |
|----------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 |
| 0,0 | Lipid. | 236.403 | 259.765 | 286.645 | 290.837 | 252.881 | 313.442 |
| | Tioest. | 28.643 | 32.954 | 34.009 | 34.200 | 29.952 | 34.390 |
| 1,0 | Lipid. | 231.633 | 196.509 | 203.385 | 200.897 | 200.622 | 182.988 |
| | Tioest. | 33.733 | 92.023 | 105.223 | 112.929 | 133.632 | 133.301 |
| 2,0 | Lipid. | 230.865 | 186.270 | 186.158 | 186.160 | 177.207 | 171.543 |
| | Tioest. | 25.772 | 80.112 | 99.940 | 101.914 | 81.405 | 115.149 |
| 4,0 | Lipid. | 207.144 | 200.604 | 178.401 | 183.272 | 165.341 | nd |
| | Tioest. | 32.268 | 99.484 | 86.196 | 112.616 | 125.147 | 117.898 |

TABLA XXII. Efecto de la concentración de ATP y CoA sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en los cloroplastos. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 0,2 ml conteniendo cloroplastos equivalentes a 120 μg clorofila/ml, 1 μCi de ^{14}C -acetato y las concentraciones indicadas de cofactores. Condiciones experimentales: 20°C, luz, 1h.

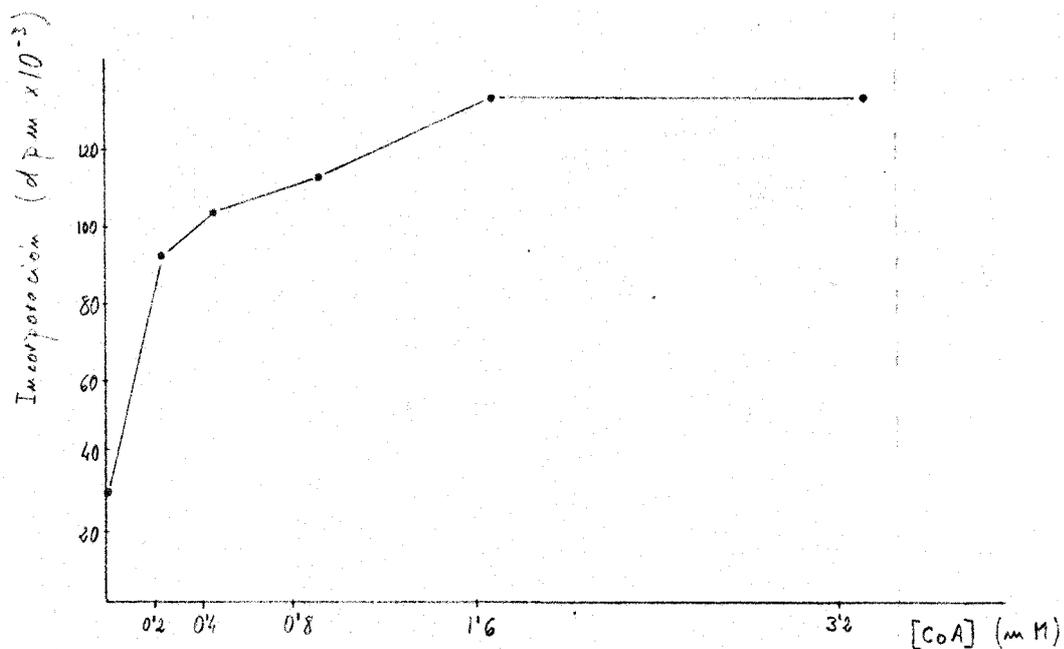


FIG. 13. Variación de la incorporación de radioactividad en los acil tioésteres de cloroplastos de espinaca en relación con la concentración de CoA. La concentración de ATP, constante, fue de 1 mM. Condiciones experimentales en la leyenda de la Tabla XXII.

III.4.5.- Variación de la radioactividad asociada a los acilglicéridos y lípidos de cloroplastos aislados de hojas preincubadas con ^{14}C -acetato.

Para estudiar el destino de los ácidos grasos sintetizados a partir de ^{14}C -acetato, en relación con la presencia de cofactores exógenos, una vez que hubiera cesado la síntesis de novo de ácidos grasos marcados, se diseñó un experimento en el que se incubaron hojas de espinaca con ^{14}C -acetato, y posteriormente se aislaron los cloroplastos de dichas hojas y se incubaron en presencia de ATP y CoA exógenos (ver apartado II.4.3, d; pag. 48). Con ello se intentaba eliminar el posible efecto de los cofactores sobre la síntesis de novo.

Los resultados obtenidos, que se exponen en la Tabla XXIII, muestran como todavía se produce un ligero aumento de la radioactividad total incorporada en restos acilo en el curso de la incubación de los cloroplastos aislados, lo que posiblemente se debe a la presencia de una pequeña cantidad de ^{14}C -acetato contaminando la preparación cloroplástica obtenida. Al margen de eso, lo que si se observa es un aumento constante de la radioactividad asociada a los acilglicéridos en las incubaciones realizadas en presencia de cofactores, aumento que no tiene paralelo en la fracción lipídica correspondiente, ni en las fracciones aisladas de las incubaciones llevadas a cabo en ausencia de cofactores. Por tanto estos resultados son coherentes con los obtenidos en la experiencia bifactorial descrita en el apartado anterior (Tabla XXII), pues apoyan la idea de que la presencia de cofactores estimula la incorporación de radioactividad en los acilglicéridos.

La fracción lipídica, de la que solo se había utilizado una parte alícuota para la medida de la radioactividad por centelleo líquido, fue sometida posteriormente a cromatografía en capa fina, para separar diferentes

| <u>Tiempo</u> | <u>Con cofactores(ATP,CoA)</u> | | <u>Sin cofactores</u> | |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | <u>Lípidos</u> | <u>Aciltioésteres</u> | <u>Lípidos</u> | <u>Aciltioésteres</u> |
| 0 | 13.120 | 4.447 | 12.605 | 4.486 |
| 5 | 14.574 | 5.003 | 15.462 | 4.967 |
| 10 | 15.102 | 5.563 | 15.282 | 5.074 |
| 20 | 16.008 | 5.445 | 15.738 | 5.453 |
| 30 | 14.838 | 5.815 | 14.856 | 4.904 |
| 60 | 16.176 | 5.858 | 15.396 | 5.134 |

TABLA XXIII. Radioactividad asociada a los lípidos y aciltioésteres de cloroplastos aislados a partir de hojas de espinaca preincubadas con ^{14}C -acetato e incubados con cofactores exógenos o sin ellos. Las incubaciones se realizaron con un volumen inicial de 2 ml conteniendo 50 μg clorofila/ml, ATP 1 mM y CoA 1 mM. Se tomaron muestras de 0,25 ml a los tiempos indicados.

| <u>Tiempo</u> | <u>Con cofactores (ATP y CoA)</u> | | | | <u>Sin cofactores</u> | | | |
|---------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|
| | <u>tiest.</u> | <u>A</u> | <u>B</u> | <u>C</u> | <u>tiest.</u> | <u>A</u> | <u>B</u> | <u>C</u> |
| 0 | 25,3 | nd | nd | nd | 26,2 | 40,0 | 13,3 | 20,4 |
| 5 | 25,6 | 46,3 | 9,9 | 18,2 | 24,3 | 44,1 | 12,0 | 19,6 |
| 10 | 26,9 | 42,4 | 9,4 | 21,3 | 24,9 | 46,1 | 10,8 | 18,2 |
| 20 | 25,7 | 51,9 | 7,7 | 14,6 | 25,7 | 35,7 | 15,4 | 23,2 |
| 30 | 28,1 | 46,5 | 9,9 | 15,4 | 24,8 | 46,0 | 11,0 | 18,2 |
| 60 | 26,6 | 44,8 | 9,4 | 19,2 | 25,0 | 48,4 | 12,1 | 14,5 |

TABLA XXIV. Porcentajes de radioactividad en las distintas fracciones separadas de cloroplastos de espinaca obtenidos de hojas preincubadas con ^{14}C -acetato e incubados en presencia, o ausencia, de cofactores. La fracción lipídica total fue separada por cromatografía en capa fina con cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1) y se rasparon tres bandas (pag. 57). La banda A incluye AG, DG y PA; la banda corresponde a los MGDG; la banda C contiene a los DGDG y al resto de los PL.

clases de lípidos y comprobar si se habían producido en ellos fluctuaciones importantes en el transcurso de la incubación. Se eligió un desarrollo que permitía la separación de las tres clases de lípidos más activos desde el punto de vista biosintético: ácidos grasos libres, MGDG y lípidos polares. La Tabla XXIV recoge los porcentajes de radioactividad asociada a las distintas fracciones aisladas de las muestras tomadas a los diferentes tiempos. No se observaron variaciones significativas a lo largo del tiempo.

III.4.6.- Incorporación de radioactividad en lípidos y acil tioésteres en relación con la fotofosforilación.

Otra forma de estudiar el destino de los ácidos grasos con posterioridad a su síntesis en los cloroplastos, y una vez que la ruta de síntesis de novo ha dejado de ser operativa, es tratar de inhibir dicha ruta cortando el suministro de ATP, ya que un aporte de energía es un requerimiento que se debe satisfacer en las reacciones de activación del acetato (ver I.2.2; pag. 14). El suministro de ATP fotosintético puede inhibirse mediante el uso de desacopladores de la fotofosforilación, o simplemente realizando las incubaciones en la oscuridad.

Nosotros hemos estudiado el efecto de la luz sobre la síntesis de lípidos y acil tioésteres en relación con el aporte de cofactores exógenos, y también el efecto de un desacoplador de la fotofosforilación, ClNH_4 , y de un detergente no iónico, que también ha demostrado efecto desacoplador a partir de ciertas concentraciones, Triton X-100. Los resultados de estas experiencias se presentan a continuación.

a) Papel de la luz en relación con los cofactores exógenos.- Cuando los cloroplastos de espinaca son incubados con ^{14}C -acetato en presencia de luz, y

sin cofactores, durante un cierto tiempo, estan en condiciones de sintetizar una cierta cantidad de lípidos radioactivos, según hemos visto anteriormente (Fig. 11; pag. 113). Si a continuación se agregan cofactores, ATP y CoA, y se continúa la incubación en la oscuridad, el aumento de radioactividad que se pueda producir en cualquiera de las fracciones separadas es atribuible, fundamentalmente, al efecto de los cofactores. Los resultados de una experiencia de este tipo, realizada en las condiciones descritas en el apartado II.4.3,c (pag. 47), se muestran en las figuras 14 y 15.

El efecto de las dos concentraciones de ATP ensayadas es mas acentuado en los acilglucolípidos (Fig. 14) que en los lípidos (Fig. 15). Además, en todos los casos se observa que el efecto de los cofactores solo se hace sentir despues de un cierto tiempo de incubación con posterioridad a la adición de los cofactores.

b) Efecto del Triton X-100.- El Triton X-100, entre otros detergentes, muestra actividad desacoplante, en los cloroplastos de espinaca, cuando se emplea a una determinada concentración, según demostraron Neumann y Jagendorf (1965), quienes atribuyeron tal efecto al cambio introducido por estos agentes en la permeabilidad de las membranas lamelares.

Para comprobar la conducta del sistema de síntesis de ácidos grasos con respecto a la concentración de Triton se realizó una experiencia en la que se incubaron cloroplastos de espinaca con ^{14}C -acetato y diferentes concentraciones de detergente, en las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos (II.4.3,c; pag. 48). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXV; en ellos puede apreciarse una estimulación de la incorporación de radioactividad en los restos acilo de los lípidos a bajas concentraciones de detergente, pero posteriormente se observa una considerable inhibición que hace bajar la radioactividad asociada a los lípidos hasta un 10 % de la obtenida en ausencia de detergente. Por el

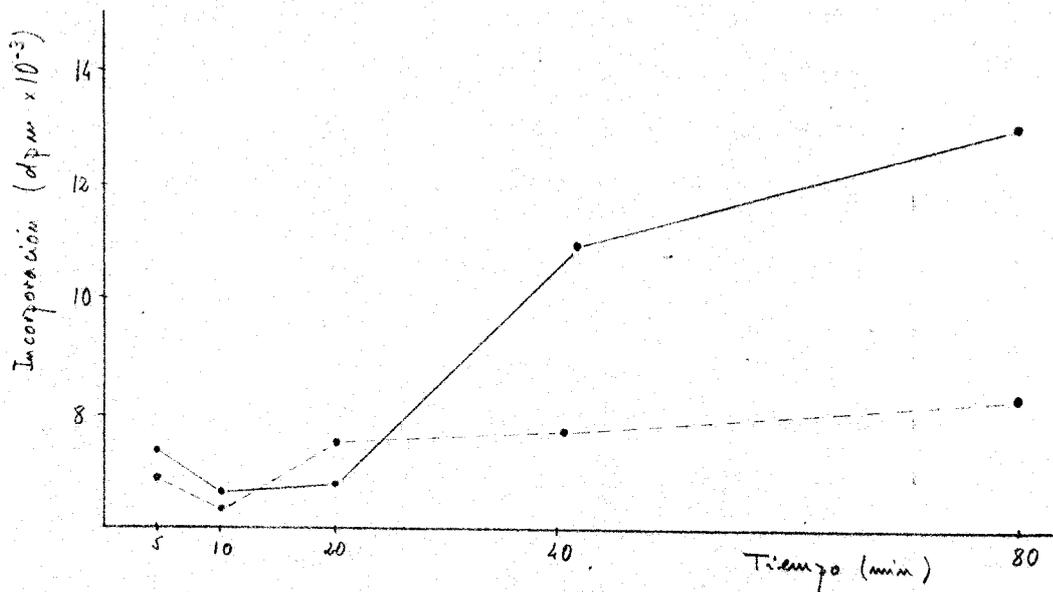


FIG. 14. Variación de la incorporación de radioactividad en los acil tioésteres de cloroplastos de espinaca incubados en la oscuridad en presencia de cofactores. Los cloroplastos habían sido preincubados en la luz durante 15 min. Las incubaciones se realizaron en tubos conteniendo 320 μ g clorofila/ml, 2,5 μ Ci 14 C-acetato/ml, CoA 1 mM y ATP 1 mM (----) o 4 mM (—). El volumen inicial fue de 1,75 ml y se tomaron muestras de 0,25 ml a los tiempos indicados.

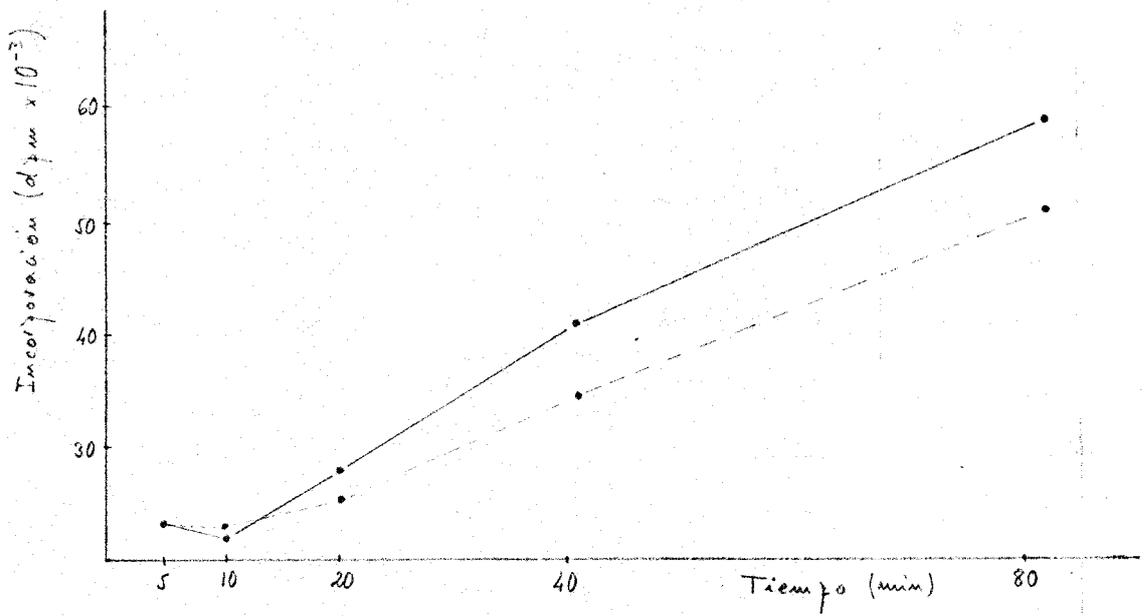


FIG. 15. Variación de la incorporación de radioactividad en los lípidos de los cloroplastos de espinaca incubados en la oscuridad en presencia de cofactores (ATP y CoA). Previamente los cloroplastos habían sido incubados en la luz sin cofactores. Condiciones experimentales en la Fig. 14.

el contrario, la radioactividad asociada a los acil tioésteres no se ve afectada de forma significativa.

También hemos examinado el efecto del Triton X-100 en presencia de cofactores exógenos. Los resultados, expuestos en la Tabla XXVI, demuestran que en estas condiciones el Triton afecta tanto a la incorporación de radioactividad en los lípidos como a la correspondiente a los acil tioésteres. Puede apreciarse que, de la misma forma que en la experiencia cuyos resultados se expusieron anteriormente (Tabla XXV), el Triton a bajas concentraciones estimula la incorporación de radioactividad en los lípidos, pero la presencia de cofactores exógenos hace que también se estimule marcadamente la incorporación de ^{14}C -acetato en los acil-CoAs. Altas concentraciones de detergente son inhibitorias para la incorporación de radioactividad en lípidos y en acil tioésteres. Los acil-ACPs, por su parte, no muestran variaciones significativas hasta que la concentración de Triton X-100 no alcanza valores elevados, apreciándose entonces un efecto estimulador: en la última concentración ensayada, $700\ \mu\text{M}$, los acil-ACPs dan cuenta de más del 20 % de la radioactividad total incorporada en restos acilo, y en otras experiencias realizadas, en las que la relación molar clorofila:Triton descendió hasta 0,20, los acil-ACPs llegaron a suponer más del 60 % de la radioactividad total incorporada a partir de ^{14}C -acetato, si bien era a costa, principalmente, de la disminución de las otras dos fracciones.

Los resultados de estas y otras experiencias, cuyos resultados no se muestran, indican que la incorporación total de ^{14}C -acetato en residuos acilo depende, mejor que de la concentración absoluta de Triton, de la relación molar clorofila:Triton (Stumpf y Boardman, 1970), encontrándose un máximo de incorporación cuando dicha relación vale aproximadamente 1 (Fig. 16).

| <u>Triton(μM)</u> | <u>Clorof.</u> | <u>Incorporación (cuentas)</u> | | | | <u>% control</u> |
|----------------------------------|----------------|--------------------------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
| | <u>Triton</u> | <u>Lípidos</u> | <u>Acil-CoAs</u> | <u>Acil-ACPs</u> | <u>Total</u> | |
| 0 | - | 159.820 | 78.180 | 9.150 | 247.150 | 100 |
| 100 | 3,45 | 198.180 | 92.980 | 11.900 | 303.060 | 123 |
| 200 | 1,72 | 251.663 | 93.524 | 9.640 | 354.797 | 144 |
| 300 | 1,15 | 288.600 | 98.790 | 11.050 | 398.440 | 161 |
| 400 | 0,86 | 277.933 | 76.659 | 10.950 | 365.542 | 148 |
| 500 | 0,69 | 217.266 | 58.027 | 10.940 | 286.233 | 116 |
| 600 | 0,57 | 107.266 | 29.080 | 13.760 | 150.106 | 61 |
| 700 | 0,49 | 42.200 | 11.040 | 14.350 | 67.590 | 27 |

TABLA XXVI. Efecto del Triton X-100 sobre la incorporación de radioactividad en los aciltioésteres y lípidos de los cloroplastos incubados en presencia de cofactores exógenos. El medio de incubación tenía un volumen de 1 ml y contenía cloroplastos equivalentes a 120 μ g de clorofila, 5 μ Ci de 14 C-acetato, 0,1 ml de ACP de espinaca y los siguientes cofactores (mM): 4 ATP, 1 NADPH, 1 NADH, 0,4 CoA, 2 DTT; además de las cantidades indicadas de Triton X-100.

| <u>Triton (μM)</u> | <u>Clorof.</u> | <u>Incorporación (dpm)</u> | | <u>% control</u> |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|------------------|
| | <u>Triton</u> | <u>Aciltioésteres</u> | <u>Lípidos</u> | |
| 0 | - | 45.731 | 27.285 | 100 |
| 50 | 1,61 | 44.950 | 67.025 | 245 |
| 100 | 0,80 | 36.046 | 73.000 | 268 |
| 150 | 0,54 | 37.325 | 13.580 | 50 |
| 200 | 0,40 | 45.023 | 8.255 | 30 |
| 300 | 0,27 | 42.039 | 4.250 | 16 |
| 400 | 0,20 | 43.531 | 3.620 | 13 |
| 500 | 0,16 | 36.471 | 2.815 | 10 |

TABLA XXV. Efecto del Triton X-100 sobre la incorporación de radioactividad en lípidos y aciltioésteres. Las incubaciones se realizaron en un volumen de 0,5 ml conteniendo 100 μ g de clorofila y 0,5 μ Ci de 14 C-acetato; a 20°C con luz y durante 1 h.

Los porcentajes respecto al control se refieren a la incorporación de radioactividad en la fracción lipídica.

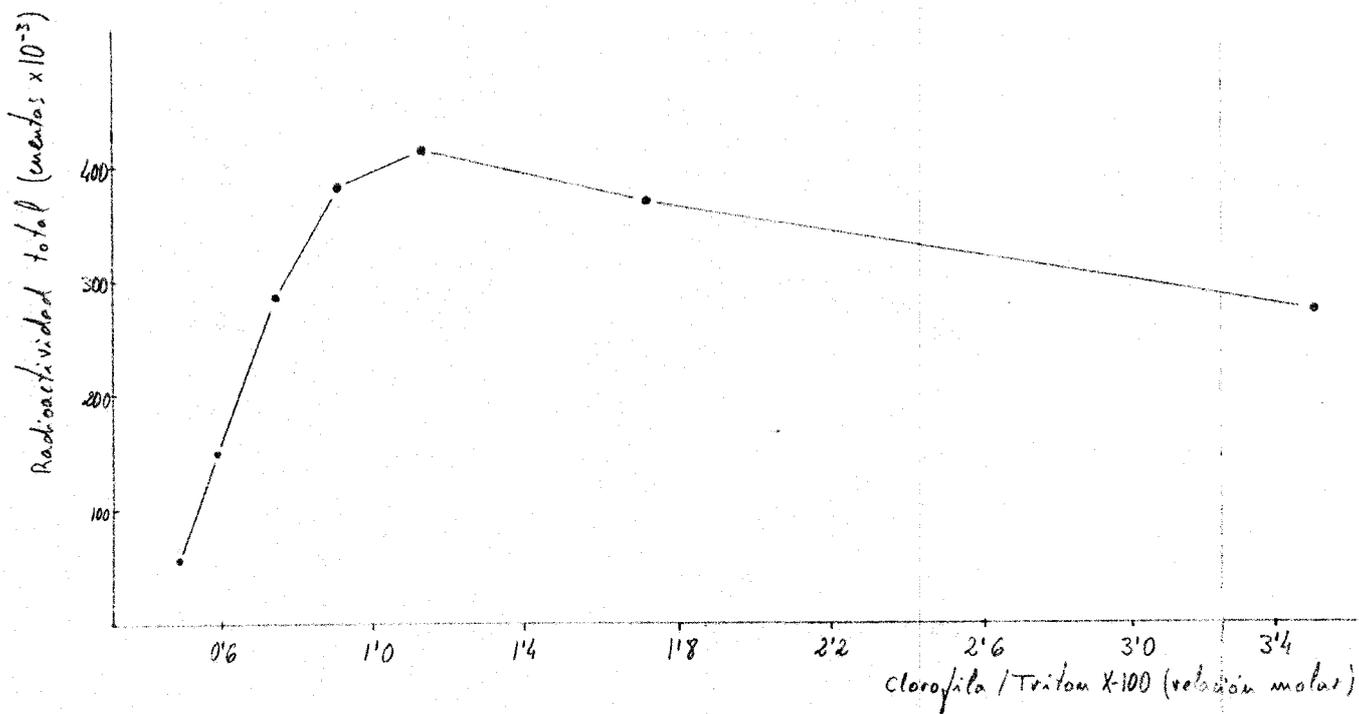


FIG. 16. Variación de la radioactividad total incorporada en restos acilo a partir de ^{14}C -acetato en función de la relación molar clorofila/Triton X-100. Condiciones experimentales en la Tabla XXVI.

También se estudió el efecto de las altas concentraciones de Triton en relación con el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos, Fig. 17, nos muestran como la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos muestra una cinética parabólica que probablemente refleja el proceso de envejecimiento y desorganización de los cloroplastos presentes en la incubación.

El efecto de la cantidad de cloroplastos presentes en el medio de incubación, medida como concentración de clorofila, se examinó en una experiencia cuyos resultados aparecen en la Fig. 18, y que ponen de manifiesto que la incorporación de radioactividad en los ácidos grasos aumenta con la concentración de clorofila presente en el medio de incubación.

Se examinó igualmente el efecto de la temperatura de incubación en relación con la presencia de Triton en el medio de reacción. Como se muestra en la Tabla XXVII, una temperatura de 20°C resultó ser la que permitía una incorporación máxima de radioactividad en ácidos grasos. Además se observó una notable variación en la composición de ácidos grasos radioactivos al aumentar la temperatura, consistente en un descenso de la incorporación de radioactividad en ácido oleico y un aumento paralelo en la de ácido esteárico. (Tabla XXVIII).

Finalmente, hemos analizado el efecto de la adición de Triton X-100 y de cofactores, ATP y CoA, a una incubación de cloroplastos, en una experiencia de tiempo realizada en las condiciones que se detallan en el apartado correspondiente de Material y Métodos (II.4.3,e; pag.48) y cuyos resultados se exponen en la Fig. 19. La gráfica nos muestra que la adición de Triton, a una concentración que inhibe sobre el 50 % de la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos, no ejerce efecto significativo sobre la incorporación de radioactividad en lípidos y acilglicósteres. La subsiguiente adición de ATP y CoA sí que muestra un efecto considerable sobre la incorporación en las dos fracciones, siendo más acentuado en los acilglicósteres.

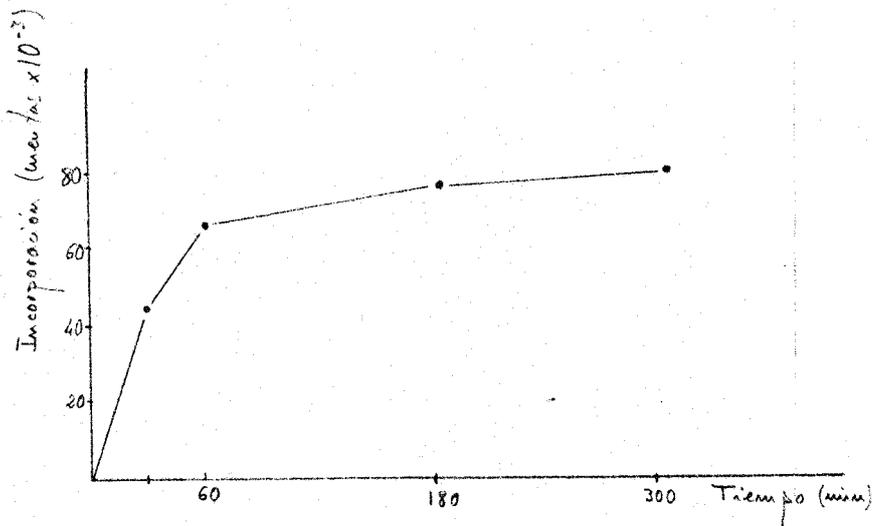


FIG. 17. Variación de la incorporación de radioactividad en ácidos grasos con el tiempo. Condiciones experimentales en II.4.9,e (pag. 49)

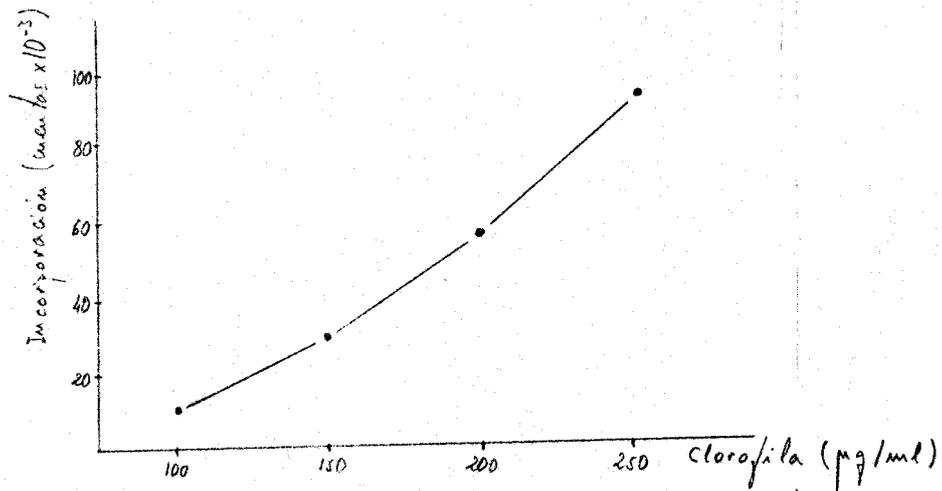


FIG. 18. Variación de la incorporación con la concentración de clorofila.

| <u>Temperatura (°C)</u> | <u>Incorporación (cuentas)</u> |
|-------------------------|--------------------------------|
| 20 | 255.141 |
| 25 | 151.184 |
| 30 | 110.989 |
| 35 | 133.453 |

TABLA XXVII. Incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos de los cloroplastos a distintas temperaturas. Condiciones experimentales en la Tabla XXVIII.

| <u>a. graso</u> | <u>20°C</u> | | <u>30°C</u> | | <u>35°C</u> | |
|-----------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| | <u>%</u> | <u>act. esp.</u> | <u>%</u> | <u>act. esp.</u> | <u>%</u> | <u>act. esp.</u> |
| 12:0 | 0,3 | 0,8 | 0,7 | 1,0 | 0,7 | 1,1 |
| 14:0 | 0,8 | 1,7 | 2,3 | 2,3 | 2,8 | 3,3 |
| 16:0 | 20,6 | 3,6 | 22,4 | 1,9 | 24,0 | 2,6 |
| 16:1 | 1,3 | 1,7 | 2,9 | 1,3 | 2,2 | 0,9 |
| 18:0 | 2,8 | 3,5 | 17,8 | 10,7 | 26,4 | 18,0 |
| 18:1 | 74,2 | 11,4 | 56,8 | 4,0 | 43,8 | 4,1 |

TABLA XXVIII. Variación de la composición de ácidos grasos radioactivos en relación con la temperatura de incubación. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 1 ml conteniendo 345 μg de clorofila, Triton 525 μM , y los cofactores y precursor detallados en la Tabla XXVI.

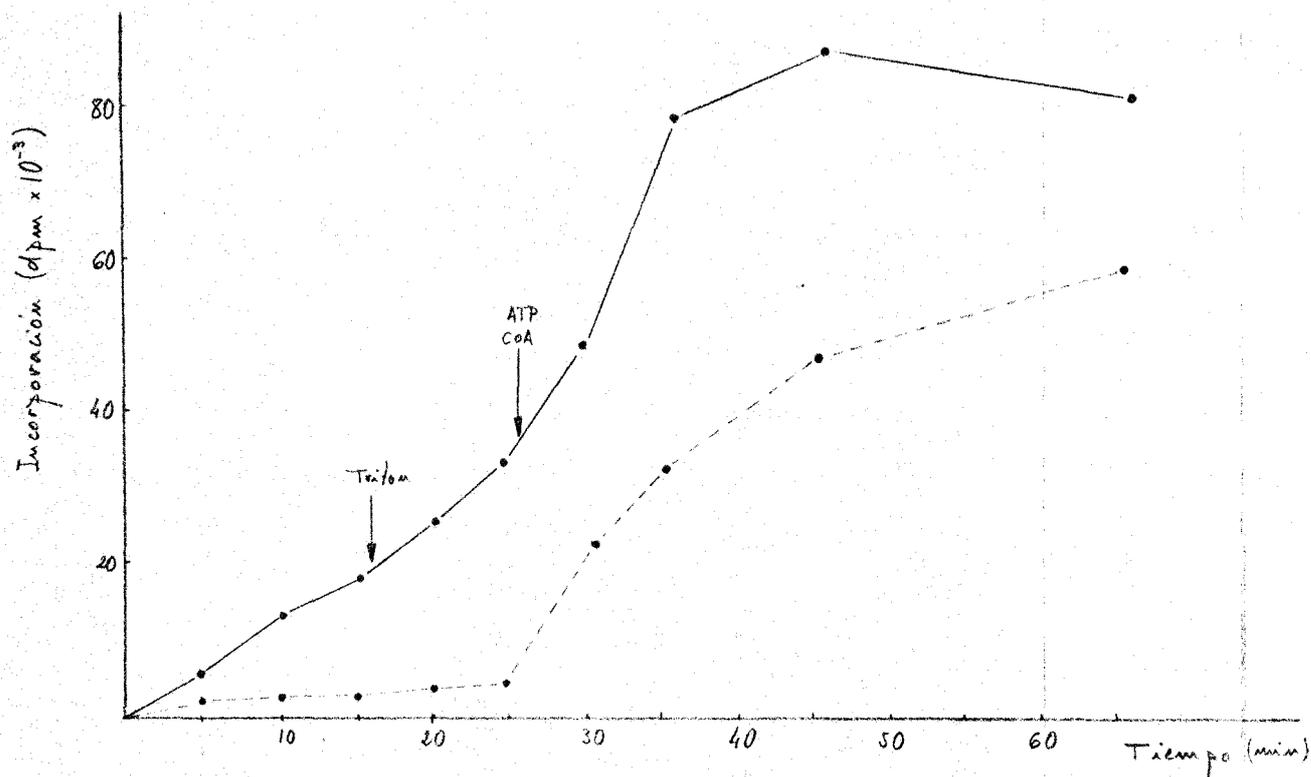


FIG. 19. Efecto de la adición de Triton X-100 y cofactores (ATP y CoA) sobre la incorporación de radioactividad en los lípidos (—) y acilolipídios (----) de los cloroplastos de espinaca. La incubación se llevó a cabo en un volumen inicial de 2 ml conteniendo 200 μg clorofila/ml y 10 μCi de ^{14}C -acetato. A los 15 min de incubación se agregó el Triton (450 μmoles) y a los 25 min los cofactores (1,5 μmol CoA y 7,5 μmol ATP). Se tomaron muestras de 0,25 ml a los tiempos indicados.

c) Efecto del cloruro amónico.- El ClNH_4 , un desacoplador de la fotofosforilación, fue ensayado en relación con la síntesis de ácidos grasos en cloroplastos de espinaca. En una primera aproximación investigamos el efecto de diferentes concentraciones de la sal sobre la incorporación de radioactividad en aciltioésteres y lípidos, a partir de ^{14}C -acetato, en cloroplastos incubados en la luz y en ausencia de cofactores. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla XXIX. El ClNH_4 , como puede apreciarse, inhibe fuertemente la incorporación de radioactividad en la fracción lipídica, sin afectar tanto a la incorporación en los aciltioésteres.

Posteriormente se analizó el efecto de la adición de cloruro amónico y cofactores a una incubación de cloroplastos, en las mismas condiciones que la realizada con el Triton X-100 y cuyos resultados se comentaron anteriormente. Los resultados de la experiencia se reflejan en la Fig. 20. Puede apreciarse como la adición de ClNH_4 , a una concentración que inhibe severamente la síntesis de ácidos grasos, en el transcurso de la incubación, hace descender la incorporación de radioactividad en la fracción lipídica, manteniendo aproximadamente constante la incorporación de radioactividad en los aciltioésteres. La posterior adición de cofactores incrementa sensiblemente la incorporación de radioactividad en las dos fracciones.

| ClNH_4 (mM) | Incorporación (dpm) | | % control |
|----------------------|---------------------|---------|-----------|
| | Aciltioésteres | Lípidos | |
| 0 | 45.731 | 27.285 | 100 |
| 1 | 42.543 | 7.740 | 28 |
| 2 | 41.084 | 5.110 | 19 |
| 4 | 45.493 | 5.140 | 19 |
| 8 | 30.999 | 4.145 | 15 |

TABLA XXIX. Efecto del ClNH_4 sobre la incorporación de radioactividad en los ácidos grasos y lípidos de los cloroplastos de espinaca incubados en ausencia de cofactores exógenos. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describen en la Tabla XXV.

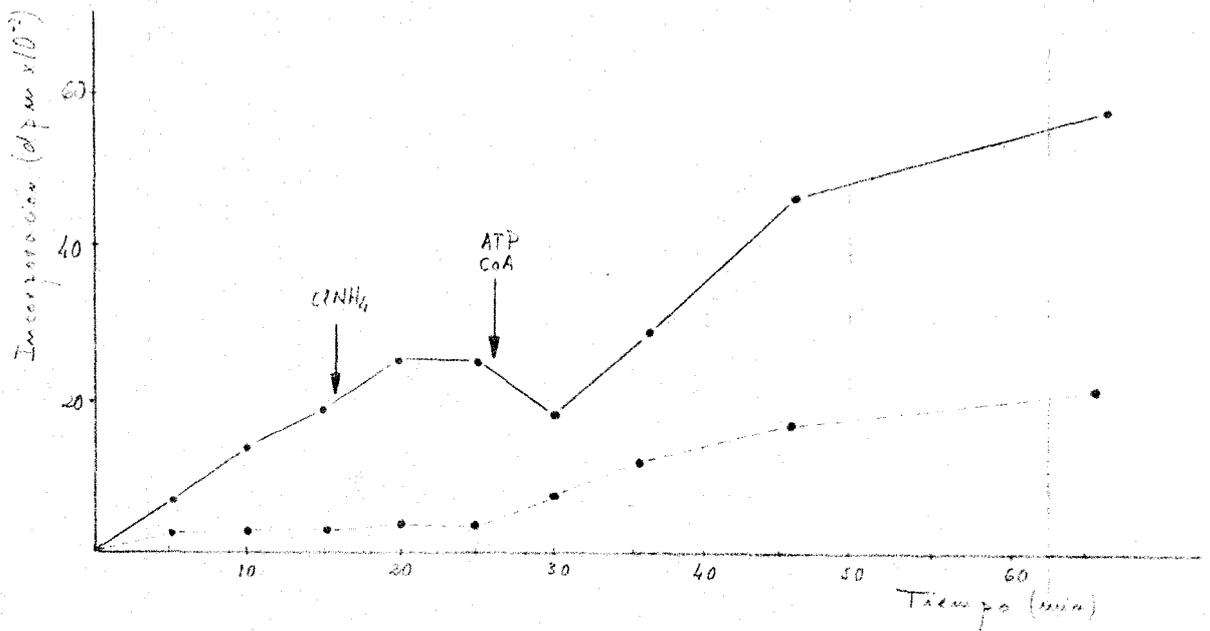


FIG. 20. Efecto de la adición de cloruro amónico (10 mM) y cofactores (ATP y CoA) sobre la incorporación de radioactividad en lípidos (—) y aciltioésteres (----). Condiciones experimentales en la leyenda de la Fig. 19.

III.4.7.- Discusión de los resultados.

Actualmente sabemos que los cloroplastos de espinaca aislados pueden sintetizar ^{14}C -palmitato cuando se incuban con ^{14}C -acetato en presencia de luz, además pueden alargar este ácido a estearato y desaturar este último a oleato (Stumpf, 1975). Con estos ácidos grasos, los cloroplastos pueden sintetizar DG y los distintos lípidos polares que constituyen las membranas cloroplásticas: PL, GL y SL (Harwood, 1977).

Hasta finales del pasado año, y motivado por los continuos fracasos en conseguir biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, a partir de precursores marcados, en cloroplastos in vitro, se pensaba que los cloroplastos aislados no poseen la capacidad de desaturar el ácido oleico, que es el ácido graso que acumula la mayor parte de la radioactividad incorporada a partir de ^{14}C -acetato cuando se incuban cloroplastos con este precursor radioactivo (Nakamura y Yamada, 1975; Slack y col., 1976; Harwood, 1977; Roughan y col., 1979a). Como además se sabía que la desaturación de oleato tiene lugar cuando dicho ácido se encuentra esterificando a la PC de las membranas del retículo endoplásmico (pag. 23), se suponía que los ácidos grasos sintetizados en el interior del cloroplasto, principalmente ácido oleico, deberían abandonar dicho orgánulo para pasar al retículo endoplásmico, en donde se produciría la desaturación a linoleato, y este último tendría que hacer entonces el viaje en sentido contrario para incorporarse a los lípidos de las membranas cloroplásticas (Roughan y col., 1976; Slack y col., 1977; Heinz y col., 1978). Como los ácidos grasos libres son insolubles en agua, la transferencia de restos acilo entre orgánulos celulares, a través del ambiente hidrófilo del citoplasma, debería implicar el concurso de un portador de acilos.

No obstante, en el último número de 1979 de Biochemical Journal apareció un trabajo que modifica sustancialmente el esquema descrito en las

líneas que preseden (Roughan y col., 1979b). En dicho artículo se aporta evidencia de que la biosíntesis de linoleato a linolenato puede tener lugar en los cloroplastos aislados siempre que se favorezca la síntesis de MGDG. En efecto, los cloroplastos de espinaca aislados, incubados con ^{14}C -acetato en presencia de glicerol-3-P y UDP-galactosa son capaces de sintetizar en una extensión considerable ^{14}C -linoleato y ^{14}C -linolenato. Los resultados sugieren que la desaturación del ácido oleico tiene lugar con posterioridad a su inserción en la posición 1 de los MGDG, coincidiendo con la propuesta de Nichols y Moorhouse (1969) de que la formación de linolenato en las células de Chlorella vulgaris se realiza por desaturación del linoleil-MGDG.

Si se confirman los resultados de Roughan y col. (1979b), tendremos base experimental suficiente para considerar al cloroplasto como un sistema para considerar al cloroplasto como un sistema autosuficiente en lo que se refiere a la síntesis de sus ácidos grasos, de los que predomina el 18:3, y de sus lípidos mas abundantes, los galactolípidos (pp. 35-38).

En todo caso, la evidencia disponible actualmente indica que la síntesis de otros importantes lípidos de membrana, tales como PC, PE, PG, tiene lugar principalmente en la fracción microsómica (Kates y Marshall, 1975), de modo que el trasiego de restos acilo entre cloroplasto y retículo endoplásmico todavía debe ser considerada como una hipótesis de trabajo pendiente de verificación.

Nosotros estamos interesados en averiguar la secuencia de acontecimientos que tiene lugar desde que los ácidos grasos son sintetizados en el estroma del cloroplasto hasta que se incorporan a los lípidos de sus membranas y, si dicha secuencia implica una transferencia entre orgánulos, tratar de identificar al portador implicado. La primera parte de nuestras investigaciones, relativa a los eventos que tienen lugar en el cloroplasto aislado, han dado

lugar a los resultados que se han expuesto en las páginas precedentes.

Los cloroplastos aislados de hojas de espinaca inmaduras, y purificados mediante una técnica que produce un alto porcentaje de cloroplastos intactos (Hawke y col., 1975), presentan una notable capacidad de síntesis a partir de ^{14}C -acetato cuando se incuban a la luz en ausencia de cofactores exógenos (Fig. 11), lo que indica que nuestra preparación cloroplástica realmente contiene una buena proporción de cloroplastos intactos, ya que, como se ha demostrado, los cloroplastos rotos presentan una escasa capacidad de incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos (Nakamura y Yamada, 1975a). En cambio la incorporación de radioactividad en los restos acilo de los aciltioésteres es muy pequeña, lo que concuerda con los resultados publicados previamente (Roughan y col., 1976), y se mantiene prácticamente constante a lo largo de la incubación.

La adición de cofactores exógenos, ATP y CoA, a la suspensión de cloroplastos provoca un notable incremento en la incorporación de ^{14}C -acetato, tanto en los lípidos como en los aciltioésteres (Fig. 12), efecto que ha sido previamente registrado por numerosos autores (Stumpf y Boardman, 1970; Roughan y col., 1976; Nakamura y Yamada, 1975a). Tal estimulación ha sido interpretada por Nakamura y Yamada (1975a) como indicativa de que la envuelta de los cloroplastos es permeable a los nucleótidos agregados. El gran aumento que se observa en la incorporación de radioactividad en los aciltioésteres había sido notificado anteriormente por Kannangar y Stumpf (1971), no obstante, sus resultados muestran diferencias más acentuadas, a favor de los aciltioésteres, a lo largo del tiempo, y es probable que tales diferencias sean debidas, en parte, al procedimiento analítico utilizado por dichos autores (Barron y Mooney, 1968), que, como se ha demostrado posteriormente (Nichols y Safford, 1973), presenta interferencia por parte de los aciloxiésteres más polares, particularmente fosfolípidos. La Fig. 12 nos muestra igualmente como los cloroplastos aislados de hojas jóvenes presentan una ma-

yor capacidad de incorporación que los obtenidos de hojas maduras, resultado que ya había sido observado anteriormente (Kannangara y Stumpf, 1971; Kannangara y col, 1973a).

La composición de ácidos grasos de las tres fracciones aisladas, Tabla XXI, nos muestra como los ácidos oleico y palmítico acumulan la mayor parte de la radioactividad del ^{14}C -acetato incorporado, de acuerdo con resultados previos de diversos laboratorios (Givan y Stumpf, 1971; Hawke y col., 1974; McKee y Hawke, 1979). Además la composición de ácidos grasos no marcados (% masa) nos presenta nuevamente la diferencia de composición entre los restos acilo asociados a los glicerolípidos y a los aciltioésteres, como se observó en la hoja entera (Tabla VI, pag. 77).

Una cinética de incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos y aciltioésteres tal como la que se observa en la Fig. 12 sugiere una secuencia de acontecimientos que comienza con la entrada del acetato en los cloroplastos, proceso que ha demostrado ser muy rápido (Jacobson y Stumpf, 1972), su posterior incorporación a los ácidos grasos, que tiene lugar en el estroma (Stumpf, 1975), y subsiguiente transferencia de estos últimos a los acil-CoAs, reacción que ha sido localizada en la envuelta de los cloroplastos (Roughan y Slack, 1977).

De cualquier forma, los altos porcentajes de incorporación detectados en los acil-CoAs, cuando los cloroplastos son incubados en presencia de ATP y CoA, indican una participación activa de los cofactores agregados. Los resultados de una experiencia bifactorial diseñada para valorar el efecto de la adición de cofactores, mostrados en la Tabla XXII, nos ponen de manifiesto que la presencia de los nucleótidos afecta principalmente a los acil-CoAs, siendo el CoA el que parece determinar la estimulación en la incorporación de radioactividad (Fig. 13). El efecto de los cofactores añadidos trae a colación la cuestión de si la envuelta de los cloroplastos es

permeable a los nucleótidos. Los japoneses Nakamura y Yamada (1975b) han analizado la cuestión, desde el punto de vista de la biosíntesis de ácidos grasos, en cloroplastos de espinaca aislados, utilizando diversos inhibidores de la síntesis de ATP, y en base a la estimulación de la síntesis que se aprecia mediante la adición de ATP, concluyeron que la envuelta cloroplástica es permeable a dicho nucleótido. Como prueba adicional presentaron evidencia de que la adición de ADP estimulaba el desprendimiento de O_2 en cloroplastos aislados e intactos. Esta opinión ha sido compartida por otros autores (Robinson y Stocking, 1968). Otros autores, por el contrario, indican que la envuelta de los cloroplastos no es libremente permeable al ATP (Huber, 1974; Roughan y Slack, 1977). Admitiendo que los nucleótidos no permean la membrana, que parece ser la opinión mas generalizada y fundamentada, los resultados mostrados en la Tabla XXII apoyan la secuencia de acontecimientos indicada anteriormente: acetato \rightarrow ácidos grasos \rightarrow acil-tioésteres, y son coherentes con los resultados de Roughan y Slack (1977) acerca de que la acil-CoA sintetasa está ubicada en la envuelta de los cloroplastos, mientras que en el estroma dicha actividad es casi nula, y es perfectamente asequible a los cofactores agregados.

Si las cosas se desarrollan realmente según la secuencia propuesta, habría que esperar un incremento en la radioactividad asociada a los acil-tioésteres una vez que la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetato hubiera cesado. Los resultados mostrados en la Tabla XXIII apoyan, en cierta medida, la hipótesis que comentamos, pues nos muestra un incremento, aunque no muy grande, en la radioactividad incorporada por los acil-tioésteres en los cloroplastos aislados de hojas de espinaca que habían sido incubadas previamente con ^{14}C -acetato. La separación de la fracción lipídica en clases de lípidos, por cromatografía en capa fina, nos indicó (Tabla XXIV) que la radioactividad asociada a las distintas clases de lípidos no muestra fluctuaciones significativas, lo que nos lleva a sugerir que no se produce un

intercambio notable de restos acilo marcados entre las distintas fracciones lipídicas durante el tiempo del ensayo.

La misma esperanza nos animó en el diseño de la experiencia cuyos resultados se exponen en las figuras 14 y 15. En los cloroplastos incubados en la oscuridad en presencia de cofactores exógenos, y que anteriormente habían sido incubados en la luz y en ausencia de cofactores, se aprecia un incremento considerable en la radioactividad de los aciltioésteres, incremento que es tanto mayor cuanto mayor es la concentración del ATP añadido (Fig. 14). Sin embargo en los lípidos también se aprecia un aumento notable en la radioactividad que es achacable a la presencia de ATP. Por supuesto que estos resultados tienden a contradecir la tesis de partida, impermeabilidad de la envuelta cloroplástica a los cofactores exógenos, sin embargo lo que resulta más evidente en la experiencia realizada es que la presencia de ATP exógeno afecta más significativamente a la síntesis de aciltioésteres, y que, desde luego, la síntesis de lípidos en la oscuridad, aunque notable, es muy inferior a la que se observa en los cloroplastos incubados en la luz (ver Fig. 12). Por todo ello estimamos que, en todo caso, el ATP no penetra libremente en el interior del cloroplasto, de ahí que no se observen grandes diferencias entre las dos concentraciones de ATP empleadas, y si se aprecien en los aciltioésteres.

Otra forma de interferir la fotofosforilación, y con ello la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetato en los cloroplastos, es mediante el uso de desacopladores de la fotofosforilación. Diversos desacopladores han sido empleados en estudios de biosíntesis de ácidos grasos (Givan y Stumpf, 1971; Nakamura y Yamada, 1975b). Por otra parte, Nakamura y Yamada (1975b) demostraron que algunos de estos inhibidores (DCMU, FCCP, ClNH_4) no interfieren con los enzimas de la síntesis de ácidos grasos. Así que el uso de desacopladores fue otra de las estrategias puestas en práctica para seguir la cinética de síntesis de aciltioésteres en relación con la presencia de cofactores exógenos.

El Triton X-100 se muestra como un activador de la síntesis de lípidos cuando se ensaya a bajas concentraciones, efecto que ha sido ratificado por diversos autores (Stumpf y Boardman, 1970; Givan y Stumpf, 1971; Roughan y col., 1976; McKee y Hawke, 1979). Roughan y col. (1979a) han reexaminado el problema recientemente, y encontraron evidencia que sugiere que este efecto puede ser debido a una estimulación específica del detergente sobre el enzima acil-ACP:glicerol-3-P aciltransferasa, que se localiza en la envuelta del cloroplasto, lo que provoca un reciclaje más activo del ACP del cloroplasto, con lo cual se acelera la ruta de síntesis de ácidos grasos, que según vimos (pag. 18) es dependiente de ACP. Pero a partir de cierta concentración la incorporación de ^{14}C -acetato en los lípidos decae de forma considerable, lo que se debe probablemente a la acción desacoplante del detergente (Neumann y Jagendorf, 1965), que inhibe la síntesis de ATP, y también a la desorganización de las membranas cloroplásticas, habida cuenta de que un cierto grado de integridad estructural es necesaria para que la síntesis de ácidos grasos proceda con normalidad.

Este doble efecto del Triton ha sido confirmado por nosotros insistentemente (Tablas XXV y XXVI, Fig. 16). Por otra parte, Stumpf y Boardman (1970) sugirieron que la síntesis de lípidos a partir de ^{14}C -acetato en los cloroplastos depende de la relación molar clorofila:Triton en el medio de incubación, mejor que de la concentración absoluta de detergente, e indicaron que la máxima incorporación se alcanza cuando dicha relación tiene un valor de aproximadamente 1. Nosotros hemos confirmado tal extremo, según se aprecia en la Fig. 16.

Así mismo, hemos determinado el tiempo y la temperatura de incubación óptimos para la síntesis de ácidos grasos en presencia de Triton X-100, que resultaron ser 60 min y 20°C respectivamente (Fig. 17 y Tabla XXVII). Además, hemos encontrado que el aumento de temperatura tiene un efecto significativo

sobre la relación oleato:estearato de los lípidos sintetizados en el cloroplasto a partir de ^{14}C -acetato, que pasa de 26,5 a 1,7 cuando la temperatura se eleva de 20 a 35°C (Tabla XXVIII). Esta disminución de la síntesis de oleato, que favorece la acumulación de estearato, debe guardar relación con la reacción de desaturación mediada por la estearil-ACP desaturasa (Jacobson y col., 1974), y será objeto de un estudio más minucioso próximamente.

La incorporación de radioactividad en ácidos grasos muestra, por otra parte, una dependencia casi lineal respecto a la concentración de clorofila presente en el medio de incubación (Fig. 18), resultado similar al obtenido Nakamura y Yamada (1975a).

La incorporación de radioactividad en los acilglicéridos se ve afectada de forma muy distinta, en relación con la concentración de Triton, según que existan o no cofactores en el medio. Efectivamente, en ausencia de cofactores exógenos la síntesis de acilglicéridos a partir de ^{14}C -acetato no se ve afectada significativamente (Tabla XXV), mientras que la presencia de cofactores en el medio de incubación (Tabla XXVI) determina una variación de los acilglicéridos similar a la que sufren los lípidos. No encontramos una explicación clara para este fenómeno, pero entendemos que refleja el hecho de que la síntesis de lípidos y acilglicéridos se ve influenciada de forma distinta por la presencia de cofactores añadidos, como hemos venido manteniendo desde el principio de esta discusión, posiblemente porque ambas actividades están separadas en el ámbito celular.

El aumento de incorporación que se aprecia en los acil-ACPs cuando la relación molar clorofila:Triton desciende muy probablemente se relaciona con la desorganización de las envueltas cloroplásticas, que pone en contacto el ACP exógeno con los enzimas del estroma.

En ninguna de nuestras experiencias hemos encontrado estimulación por el Triton X-100 sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos tan elevada

como la descrita por Stumpf y Boardman (1970), quienes registraron aumentos por un factor 4,8 y 6,7 para experimentos realizados con cofactores y sin ellos respectivamente. Nosotros hemos encontrado estimulaciones por un factor de 1,6 y 2,7, lo que concuerda mejor con los resultados de Roughan y col. (1976).

Resumiendo, creemos haber puesto de manifiesto que el Triton X-100 muestra un efecto inhibitor sobre la síntesis de ácidos grasos en los cloroplastos cuando se sobrepasa una cierta concentración. Además, el detergente afecta de distinta forma la incorporación de radioactividad en lípidos y acilglicolípidos.

El otro desacoplador ensayado, ClNH_4 , al contrario que el Triton X-100, se muestra inhibitor de la síntesis de lípidos a partir de ^{14}C -acetato a todas las concentraciones ensayadas, mientras que sobre los acilglicolípidos, lo mismo que el Triton, demuestra poco efecto (Tabla XXIX).

Una vez que se estableció el efecto inhibitor del Triton X-100 y del cloruro amónico sobre la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetato, se intentó separar la actividad de síntesis de ácidos grasos de la transferencia de estos a los acilglicolípidos, que según nuestra hipótesis de trabajo tienen lugar en distintos sitios. Los resultados que se exponen en la Fig. 19 nos muestran como la adición de Triton X-100, a una incubación de cloroplastos que se encontraba en un momento de gran actividad de síntesis de ácidos grasos, no varía significativamente la cinética de incorporación de radioactividad en lípidos y acilglicolípidos, probablemente porque el detergente se agregó a una concentración a la que no inhibe severamente la síntesis de ácidos grasos, por no modificar grandemente la permeabilidad de las envoltas cloroplásticas. La posterior adición de ATP y CoA produce un aumento de la incorporación en las dos fracciones analizadas, mucho más pronunciado en los acilglicolípidos que en los lípidos (17,5 y 3 veces respecti-

vamente). La estimulación de la incorporación de radioactividad en los lípidos estimamos que resulta propiciada por el aumento de la permeabilidad de la envuelta cloroplástica producido por el detergente previamente añadido, que facilita la penetración de los cofactores exógenos.

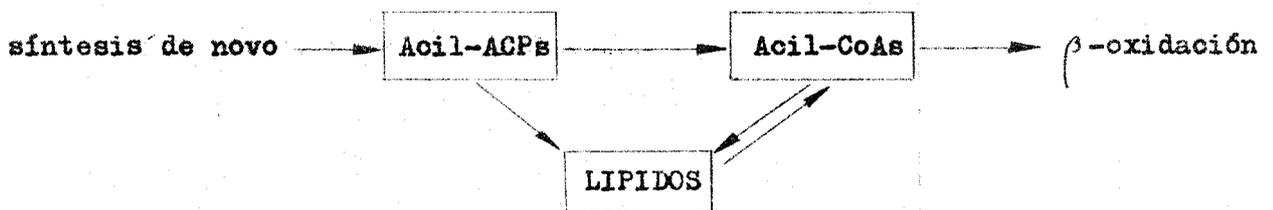
Esta explicación es tanto mas verosímil cuando se compara con los resultados de la experiencia paralela realizada con ClNH_4 . En efecto, la adición de este desacoplador produce una clara inflexión en la cinética de incorporación de ^{14}C -acetato en la fracción lipídica (Fig. 20). La subsiguiente adición de ATP y CoA da lugar a una respuesta inmediata en la incorporación de radioactividad en los acilglicósteres, y posteriormente en los lípidos.

IV CONCLUSIONES

Las moléculas portadoras de acilo, CoA y ACP, se presentan en la célula en cantidades catalíticas, de ahí que el estudio químico de los aciltioésteres exija la utilización de una masa importante de material de partida, y el empleo de un procedimiento sensible y selectivo. Nosotros hemos analizado la composición de ácidos grasos de los aciltioésteres de seis tejidos distintos. Nunca antes se había realizado un estudio de este tipo. Los datos que aportamos, aunque insuficientes para hacer generalizaciones, nos permite apreciar que la composición de ácidos grasos de los aciltioésteres varía considerablemente de una especie a otra, lo que no es en absoluto sorprendente habida cuenta de la variabilidad de composición de ácidos grasos que se observa entre los tejidos. Pero además hemos encontrado que la composición de ácidos grasos de los aciltioésteres y lípidos también varía notablemente dentro de un mismo tejido. Esta diferencia nos indica que la composición que presentan los lípidos de un tejido no viene determinada directamente por el "pool" de aciltioésteres disponible para la síntesis de tales lípidos. Así que, aunque está ampliamente demostrado que los aciltioésteres pueden actuar como donadores de acilos para la síntesis de los diferentes glicerolípidos, esta disparidad observada en la composición de lípidos y aciltioésteres nos lleva a considerar que la acilación del esqueleto glicéridico de los lípidos no se realiza por puro azar a partir del "pool" de aciltioésteres disponible, sino que los enzimas implicados deben presentar una notable selectividad por la naturaleza del resto acilo. Tal especificidad debe ser, asimismo, responsable en parte de la característica distribución

de ácidos grasos saturados e insaturados entre las posiciones de los glicerolípidos.

Por otra parte, no debemos olvidar las modificaciones que pueden tener lugar en el residuo acilo con posterioridad a su incorporación al glicerolípidio. Así, como ya discutimos ampliamente (pp. 23-28), la síntesis de 18:2 parece ser que tiene lugar fundamentalmente por desaturación de la -oleil-PC, y la del 18:3, según reciente evidencia, por desaturación del 1-linoleil-MGDG. Indudablemente que estas modificaciones, producidas precisamente en ácidos grasos que son muy importantes cuantitativamente, han de producir variaciones radicales en la composición de ácidos grasos de los lípidos en comparación con la del "pool" de acil tioésteres del que originariamente procedían. Entre los tres "pool" de acilos de la célula probablemente, y a la vista de la evidencia acumulada, tienen lugar los siguientes intercambios:



Todos los intercambios indicados están razonablemente documentados. Según esto la composición de ácidos grasos de los acil-ACPs debe reflejar la actividad del sistema de síntesis de novo, incluyendo alargamiento a 18:0 y desaturación a 18:1, y efectivamente en los acil-ACPs siempre están bien representados los distintos intermediarios de la ruta, principalmente palmitato y oleato. Los acil-CoAs, por su parte, reciben restos acilo de los acil-ACPs, por medio del ya citado sistema de conexión tioesterasa-tioquinasa (pag. 28), y de los lípidos, por la acción sucesiva de lipasas y tioquinasas. Por tanto la composición de ácidos grasos de los acil-CoAs es más heterogénea en cuanto a procedencia y probablemente está sujeta a un recambio más intenso.

Evidentemente el estudio químico de los acilglicéridos abre algunos interrogantes que deberían ser considerados mas detenidamente. El mas sobresaliente es el que se refiere a la existencia de ácidos grasos poliinsaturados en los acil-ACPs, que probablemente refleja una actividad enzimática hasta ahora desconocida, y cuyo significado se nos escapa.

Los estudios metabólicos, realizados con precursores radioactivos, de diferentes tejidos nos ponen inmediatamente de manifiesto que la composición de ácidos grasos radioactivos, sintetizados en el transcurso de la incubación, difiere notablemente de la que presentan los propios lípidos endógenos. En las semillas en germinación lo que predomina es la síntesis de lípidos de membrana, así que en estos tejidos se aprecia una acumulación mayoritaria del precursor marcado en los lípidos polares, como hemos podido comprobar con el guisante. Además, la capacidad de síntesis de lípidos durante la germinación es mayor en semillas con bajo contenido de lípidos de reserva, guisante, que en las semillas ricas en lípidos de reserva, extremo que hemos podido comprobar repetidamente utilizando otras semillas distintas, tales como soja, alubia, altramuç, y cuyos resultados no se muestran.

Por el contrario, las semillas oleaginosas en formación muestran una gran capacidad de incorporación de precursores marcados en sus lípidos, y particularmente en sus triglicéridos, como hemos podido verificar en la semilla de girasol y en la de cártamo (Resultados no expuestos).

En todo caso, la incorporación de radioactividad, a partir de precursores marcados, en los acilglicéridos es siempre pequeña cuando se ensaya el tejido intacto, lo que seguramente se debe a las pequeñas cantidades en que aparecen las moléculas portadoras en la célula. Es por ello que, para estudiar la participación de dichos portadores, haya que recurrir a extractos o fracciones subcelulares que son susceptibles de adición de cofactores exógenos. Realmente nosotros hemos podido conseguir porcentajes importan-

tes de incorporación en acil-CoAs y en acil-ACPs cuando ensayabamos extractos libres de células, como en el extracto enzimático de semillas de girasol en formación, y en los cloroplastos de espinaca, cuyos resultados se han mostrado a lo largo de este trabajo, o en microsomas de aguacate, cártamo y patata, que también fueron ensayados con distinta fortuna (resultados no mostrados).

La semilla de girasol en formación representa una novedad en lo que a estudios de biosíntesis de lípidos se refiere. Nosotros hemos podido comprobar que, ensayada como tejido intacto, presenta una mayor capacidad de incorporación de precursores marcados que otras semillas análogas ampliamente utilizadas, como cártamo y soja, mostrándose además una gran actividad oleato desaturasa. Por otra parte, el extracto enzimático obtenido por nosotros, mediante un procedimiento muy simple, conserva las actividades citadas, lo que no siempre resulta factible, por mor de la liberación, durante la trituración del tejido, de sustancias que resultan inhibitorias para determinadas actividades enzimáticas, tales como compuestos fenólicos y taninos. Nuestros resultados indican que la semilla de girasol en formación no contiene grandes cantidades de estas sustancias, por lo que son muy adecuadas para el estudio de determinadas actividades enzimáticas aisladas, particularmente la oleato desaturasa microsómica.

Los cloroplastos aislados constituyen, por diversos motivos ya comentados, un sistema especialmente apropiado e interesante para estudios de biosíntesis de lípidos, y más concretamente para el examen del papel de las moléculas portadoras de acilo. En los cloroplastos siempre se obtienen importantes incorporaciones a partir de ^{14}C -acetato cuando se incuban en presencia de cofactores y de luz. Nosotros creemos haber puesto de manifiesto que la incorporación de radioactividad en los acilglucósidos y lípidos responden de distinta forma a la presencia de cofactores exógenos, resultados que nos

llevan a sugerir que mientras que la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el estroma, y por tanto no es directamente afectada por la presencia de cofactores agregados en el medio de incubación, debido a la existencia de la envuelta cloroplástica, la síntesis de acil-CoAs, a partir de los ácidos grasos radioactivos sintetizados en el interior del cloroplasto, tiene lugar en la envuelta cloroplástica, en un punto que es asequible a los cofactores adicionados (Fig. 21).

De la importancia de la membrana externa de los cloroplastos en la biosíntesis de lípidos nos da idea el hecho, señalado por algunos autores, de que, excepto una actividad ATPasa, todas las actividades enzimáticas detectadas hasta la fecha en dicha membrana están relacionadas con el metabolismo lipídico, lo que denota la implicación de este sitio celular en el proceso de biogénesis de membranas.

Además, la secuencia que proponemos, y que se esquematiza en la Fig. 21, es coherente con los elevados porcentajes de ácidos grasos libres encontrados por diversos autores cuando se incuban cloroplastos aislados. La salida de los ácidos grasos sintetizados en el estroma al exterior del cloroplasto se justifica claramente si tenemos en cuenta las necesidades de residuos acilo para la síntesis de lípidos de membrana, así que a partir del "pool" de acil-CoAs formado sobre la envuelta externa del cloroplasto deben satisfacerse los requerimientos de acilos para los lípidos de las membranas cloroplásticas, MGDG principalmente, y de las membranas microsómicas: PC, PG y PE entre otros. Por supuesto que el esquema propuesto sugiere que la transferencia de acilos entre el cloroplasto y el retículo endoplásmico se realiza con el concurso del CoA como portador.

Desde luego, el destino exacto de los acil-CoAs formado sobre la envuelta cloroplástica debe ser estudiado más detenidamente, y para ello habrá que ensayar los cloroplastos aislados en presencia de microsomas, y es

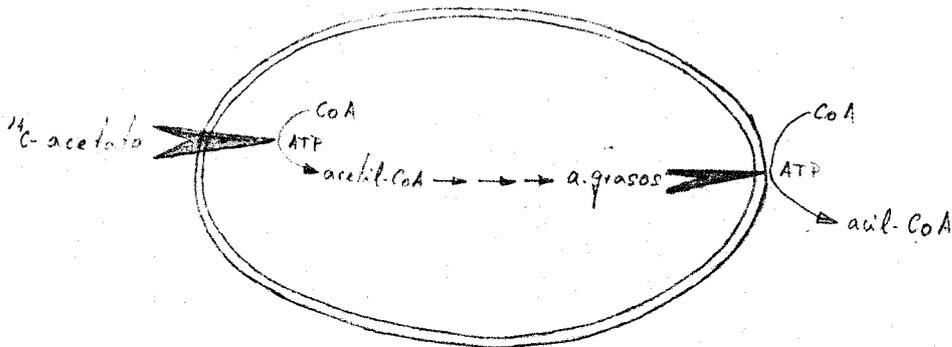


Fig. 21. Secuencia propuesta para serie de acontecimientos que tienen lugar cuando se incuban cloroplastos aislados con ^{14}C -acetato. El acetato penetra fácilmente en el cloroplasto, en donde es activado mediante CoA y ATP endógenos, y se convierte en ácidos grasos. Estos ácidos grasos son transferidos a la envuelta, en donde son convertidos en los correspondientes acil-CoAs con el concurso de los cofactores añadidos.

en este sentido en el que pensamos investigar proximately.

Así pues, y para terminar, podemos asegurar que las moléculas portadoras de acilo, ACP y CoA, desempeñan un papel muy destacado en todas las reacciones del metabolismo que tienen lugar en la fracción soluble y que implican la participación de ácidos grasos. En este sentido es perfectamente clara y coherente la participación de portadores en las reacciones de síntesis de ácidos grasos mediadas por enzimas solubles, en tanto que en aquellas reacciones que tienen lugar mediante enzimas asociados a membranas, tales como las desaturaciones de oleato a ácidos grasos poliinsaturados, no existe requerimiento de portador. Es muy probable que las moléculas portadoras aparecieran muy tempranamente en el curso de la evolución, de ahí que participen activamente en la formación de todos aquellos ácidos grasos que están universalmente distribuidos: los saturados y monoinsaturados. En una siguiente etapa evolutiva, en la que aparecieron los sistemas membranosos internos que determinan la compartimentación característica de la célula eucariótica, se hizo sentir la necesidad de ácidos grasos más insaturados que conformaran la fluidez exigida en las membranas celulares, y esta necesidad es la que determina la aparición de enzimas desaturasas unidas a membranas, que no requieren la participación de portadores de acilo, sino que actúan directamente sobre los restos acilo esterificados en los lípidos de la membrana, fosfatidilcolina en el retículo endoplásmico y monogalactosildiglicérido en el cloroplasto.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abdelkader, A., Cherif, A., Demandre, C. y Mazliak, P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 155-165.
- Appleby, R.S., Safford, R. y Nichols, B.W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 248, 205-211.
- Appleby, R.S., Gurr, M.I. y Nichols, B.W. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 209-216.
- Appelqvist, L.A. (1975) in "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids" (T. Galliard y E.I. Mercoer, eds.), pp. 247-286. Academic Press. London.
- Bajwa, S.S. y Sastry, P. (1973) *Indian J. Biochem. Biophys.* 10, 65-66.
- Barron, E.J. y Stumpf, P.K. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 60, 329-337.
- Barron, E.J. y Mooney, L.A. (1968) *Anal. Chem.* 40, 1742-1744.
- Beck, J.C. y Levine, R.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 489, 360-369.
- Bloomfield, D.K. y Bloch, K. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 337-345.
- Bolton, P. y Harwood, J.L. (1977a) *Biochim. Biophys. Acta* 489, 15-24.
- Bolton, P. y Harwood, J.L. (1977b) *Biochem. J.* 168, 261-269.
- Bolton, P. y Harwood, J.L. (1978) *Planta* 138, 223-228.
- Brooks, J.L. y Stumpf, P.K. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 108-116.
- Bruinsma, J. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 52, 576-578.
- Canvin, D.T. (1963) *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 1879-1885.
- Cherif, A., Dubacq, J.P., Mache, R., Oursel, A. y Tremolieres, A. (1975) *Phytochemistry*, 14, 703-706.
- Christie, W.W. y Moore, I.H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 176, 445-452.
- Davies, W.H., Mercer, E.I. y Goodwin, T.W. (1966) *Biochem. J.* 98, 369-373.
- Devor, K.A. y Mudd, J.B. (1971) *J. Lipid Res.* 12, 403-411.
- Douce, R. (1974) *Science* 183, 852-853.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Givan, C.V. y Stumpf, P.K. (1971) *Plant Physiol.* 47, 510-515.
- Gurr, M.I., Robinson, M.P. y James, A.T. (1969) *Eur. J. Biochem.* 9, 70-78.
- Gurr, M.I. y Brawn, P. (1970) *Eur. J. Biochem.* 17, 19-22.
- Gurr, M.I. (1971) *Lipids*, 6, 266-273.
- Gurr, M.I., Blades, J., Appleby, R.S., Smith, C.G. Robinson, M.P. y Nichols, B.W. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 281-290.

- Gurr, M.I. y James, A.T. (1976) "Lipid Biochemistry. An Introduction". Segunda edición. Chapman and Hall. London.
- Harwood, J.L. y Stumpf, P.K. (1970) *Plant Physiol.* 46, 500-508.
- Harwood, J.L., Sodja, A., Stumpf, P.K. y Spurr, A.R. (1971) *Lipids* 6, 851-854.
- Harwood, J.L. y Stumpf, P.K. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 281-291.
- Harwood, J.L. y Stumpf, P.K. (1972a) *Lipids* 7, 8-19.
- Harwood, J.L. y Stumpf, P.K. (1972b) *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 282-290.
- Harwood, J.L. (1975a) en "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids". (T. Galliard y E.I. Mercer, eds.), pp. 44-93. Academic Press. London.
- Harwood, J.L. (1975b) *Phytochemistry* 14, 1985-1990.
- Harwood, J.L. (1976) *Phytochemistry* 15, 1459-1463.
- Harwood, J.L. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1259-1263.
- Harwood, J.L. y Bolton, P. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 287-289.
- Hatch, M.D. y Stumpf, P.K. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2879-2885.
- Hawke, J.C., Rumsby, M.G. y Leech, R.M. (1974) *Phytochemistry* 13, 403-413.
- Hawke, J.C., Leese, B.M. y Leech, R.M. (1975) *Phytochemistry* 14, 1733-1736.
- Heinz, E., Bertrams, M., Joyard, J. y Douce, R. (1978) *Z. Pflanzenphysiol.* 87, 325-331.
- Hitchcock, C. y Nichols, B.W. (1971) "Plant Lipid Biochemistry" Academic Press. London.
- Hitchcock, C. (1975) en "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids". (T. Galliard y E.I. Mercer, eds.), pp. 1-19. Academic Press. London.
- Huang, K.P. y Stumpf, P.K. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 158-
- Huang, K.P. y Stumpf, P.K. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 412-427.
- Huber, U. (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 393-421
- Jacobson, B.S. y Stumpf, P.K. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 656-663.
- Jacobson, B.S., Kannangara, C.G. y Stumpf, P.K. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 487-493.
- Jacobson, B.S., Jaworski, J.G. y Stumpf, P.K. (1974) *Plant Physiol.* 54, 484-486.
- James, A.T. and Martin, J.P. (1952) *Biochem. J.* 50, 679-690.

- Jaworski, J.G. y Stumpf, P.K. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 158-165.
- Jaworski, J.G., Goldschmidt, E.E. y Stumpf, P.K. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 769-776.
- Joyard, J. y Douce, R. (1976) C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. 282, 1515-1518.
- Joyard, J. y Douce, R. (1976a) Biochim. Biophys. Acta 424, 125-131.
- Joyard, J. y Douce, R. (1976b) Physiol. Veg. 14, 31-48.
- Joyard, J. y Douce, R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 486, 273-285.
- Kader, J.C. (1977) Biochim. Biophys. Acta 486, 429-436.
- Kannangara, C.G. y Stumpf, P.K. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1544-1551.
- Kannangara, C.G. y Stumpf, P.K. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, 83-91.
- Kannangara, C.G., Jacobson, B.S. y Stumpf, P.K. (1973a) Plant Physiol. 52, 156-161.
- Kannangara, C.G., Jacobson, B.S. y Stumpf, P.K. (1973b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 648-655.
- Kates, M. y Marshall, M.O. (1975) en "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids" (T. Galliard y E.I. Mercer, eds.), pp. 115-159. Academic Press. London.
- Kleinig, H. y Liedvogel, B. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 499-505.
- Leech, R.M. (1977) en "Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants". (H. Smith, ed.), pp. 289-327. Academic Press. London.
- Liedvogel, B. y Kleinig, H. (1976) Planta 129, 19-21.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F., Magidman, P. y Riemenschneider, R.W. (1964) J. Am. Oil Chem. Soc. 41, 693-696.
- Macey, M.J.K. y Stumpf, P.K. (1968) Plant Physiol. 43, 1637-1647.
- Macher, B.A. y Mudd, J.B. (1974) Plant Physiol. 53, 171-175.
- Mackender, R.O. y Leech, R.M. (1974) Plant Physiol. 53, 496-502.
- Mancha, M., Stokes, G.B. y Stumpf, P.K. (1975) Anal. Biochem. 68, 600-608.
- Marsh, J.B. y James, A.T. (1962) Biochim. Biophys. Acta 60, 320-328.
- Marshall, M.O. y Kates, M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260, 558-570.

- Matsumura, S. y Stumpf, P.K. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 932-941.
- McKee, J.W.A. y Hawke, J.C. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 197, 322-332.
- Morre, D.J. (1975) Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 441-481.
- Mudd, J.B., Van Vliet, H.H.D.M. y Van Deenen, L.L.M. (1969) J. Lipid. Res. 10, 623-630.
- Mudd, J.B. y Garcia, R.E. (1975) en "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids" (T. Galliard y E.I. Mercer, eds.), pp. 161-201. Academic Press. London.
- Murphy, D.J. y Leech, R.M. (1978) FEBS Lett. 88, 192-196.
- Murphy, D.J. y Stumpf, P.K. (1979) Plant Physiol. 63, 328-335.
- Nagai, J. y Bloch, K. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4626-4633.
- Nakamura, Y. y Yamada, M. (1975a) Plant Cell Physiol. 16, 139-149.
- Nakamura, Y. y Yamada, M. (1975b) Plant Cell Physiol. 16, 163-174.
- Neumann, J. y Jagendorf, A. (1965) Biochim. Biophys. Acta 109, 382-389.
- Newcomb, E.H. y Stumpf, P.K. (1953) J. Biol. Chem. 200, 233-239.
- Nichols, B.W. y Moorhouse, R. (1969) Lipids 4, 311-316.
- Nichols, B.W. y Safford, R. (1973) Chem. Phys. Lipids 11, 222-227.
- Nielsen, N.C. y Stumpf, P.K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 205-210.
- Nielsen, N.C., Adee, A. y Stumpf, P.K. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 192, 446-456.
- Nothelfer, H.G., Barckhans, R.H. y Spener, F. (1977) Biochem. Biophys. Acta 489, 370-380.
- Ohlrogge, J.B., Pollard, M.R. y Stumpf, P.K. (1978) Lipids 13, 203-210.
- Ongun, A. y Mudd, J.B. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1558-1566.
- Oo, K.C. y Stumpf, P.K. (1979) Lipids 14, 132-143.
- Overath, P. y Stumpf, P.K. (1964) J. Biol. Chem. 239, 4103-4110.
- Park, R.B. (1976) en "Plant Biochemistry" Tercera edición. (J. Bonner y J.E. Varner, eds.), pp. 115-144. Academic Press. New York.
- Porra, R.J. y Stumpf, P.K. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 176, 53-62.
- Porra, R.J. (1979) Phytochemistry 18, 1651-1656.
- Ray, T.K. y Cronan, J.E. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 4374-4378.
- Rebeiz, C., Castelfranco, P. y Breidenbach, R.W. (1965) Plant Physiol. 40, 286-289.

- Renkonen, O. y Bloch, K. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4899-4903.
- Rinne, R.W. (1969) *Plant Physiol.* 44, 89-94.
- Robinson, J.M. y Stocking, C.R. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1597-1603.
- Roughan, P.G. y Batt, R.D. (1969) *Phytochemistry* 8, 363-369.
- Roughan, P.G. (1970) *Biochem. J.* 117, 1-8.
- Roughan, P.G. (1975) *Lipids* 10, 609-614.
- Roughan, P.G., Slack, C.R. y Holland, R. (1976) *Biochem. J.* 158, 593-601.
- Roughan, P.G. y Slack, C.R. (1977) *Biochem. J.* 162, 457-459.
- Roughan, P.G., Holland, R. y Slack, C.R. (1979a) *Biochem. J.* 184, 193-202.
- Roughan, P.G., Mudd, J.B., McManus, T.T. y Slack, C.R. (1979b) *Biochem. J.* 184, 571-574.
- Safford, R. y Nichols, B.W. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 210, 57-64.
- Safford, R., Appleby, R.S. y Nichols, B.W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 239, 509-512.
- Sexton, J.C. y Moore, T.S. (1978) *Plant Physiol.* 62, 978-980.
- Sherrat, D. y Givan, C.V. (1973) *Planta* 113, 47-52.
- Shine, W.E., Mancha, M. y Stumpf, P.K. (1976a) *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 110-116.
- Shine, W.E., Mancha, M. y Stumpf, P.K. (1976b) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 472-479.
- Simoni, R.D., Criddle, R.S. y Stumpf, P.K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 583-591.
- Slack, C.R. y Roughan, P.G. (1975) *Biochem. J.* 152, 217-228.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Terpstra, J. (1976) *Biochem. J.* 155, 71-80.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. y Balansingham, N. (1978) *Biochem. J.* 170, 421-433.
- Smirnov, B.P. (1960) *Biokhimiya* 25, 545-555.
- Stumpf, P.K. y Boardman, N.K. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2579-2587.
- Stumpf, P.K. (1975) en "Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids". (T. Galliard y E.I. Mercer, eds.), pp. 95-113. Academic Press. London.
- Stumpf, P.K. (1976) en "Plant Biochemistry". Tercera edición. (J. Bonner y J.E. Varner, eds.), pp. 428-460. Academic Press. New York.
- Stumpf, P.K. y Porra, R.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 63-70.

- Stumpf, P.K. (1977) en "Biochemistry of Lipids II". International Review of Biochemistry, Vol. 14. (T.W. Goodwin, ed.) pp. 215-237. University Park Press. Baltimore.
- Stymne, S. y Appelqvist, L.A. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 223-229.
- Van Besouw, A. y Wintermans, J.F.G.M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 529, 44-53.
- Vance, W.A. y Stumpf, P.K. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 210-220.
- Van Hummel, H.C., Hulsebos, T.J.M. y Wintermans, J.F.G.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 380, 219-226.
- Vick, B. y Beevers, H. (1978) Plant Physiol. 62, 173-178.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2910-2917.
- Vijay, I.K. y Stumpf, P.K. (1972) J. Biol. Chem. 247, 360-366.
- Weaire, J.P. y Kekwick, R.G.O. (1975) Biochem. J. 146, 425-437.
- Wharfe, J. y Harwood, J.L. (1978) Biochem. J. 174, 163-169.
- Willemot, C. y Verret, G. (1973) Lipids 8, 588-591.
- Williams, J.P., Watson, G.R. y Leung, S.P.K. (1976) Plant Physiol. 57, 179-187.
- Wilson, T.L., Smith, C.R. y Mikolajczak, K.L. (1961) J. Am. Oil Chem. Soc. 38, 696-699.
- Wolfersberger, M.G. y Pieringer, R.A. (1974) J. Lipid Res. 15, 1-10.
- Yamada, M. y Stumpf, P.K. (1965) Plant Physiol. 40, 653-658.
- Yamada, M. y Nakamura, Y. (1975) Plant Cell Physiol. 16, 151-162.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Juan Sanchez Garcia
titulada "Biosíntesis de lípidos en plantas su-
periores: El papel de los acetilcoesteros".

acordó otorgarle la calificación de sobresaliente
cum laude

Sevilla, _____ de _____ 1.9_____

El Vocal,

[Signature]

El Presidente.

El Vocal,

[Signature]

El Secretario.

El Vocal,

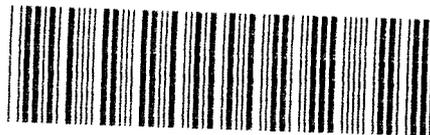
J. Lerdá Abuedo

El Docto

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500292137

FBI E TD-024

292137-