

Caracterización del Sistema Lipolítico presente en Semillas de Girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre Sustrato Endógeno

María Cecilia ARRIBÉRE*, Nora S. PRIOLO y Néstor O. CAFFINI

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 711, La Plata 1900, Argentina

RESUMEN. El sistema lipolítico presente en plántulas de girasol se encuentra asociado a los cuerpos lipídicos de las células de los cotiledones. Los cuerpos lipídicos aislados de plántulas, pero no de semillas sin germinar, pueden degradar los triacilglicéridos de reserva (autólisis) con liberación de glicerol y ácidos grasos. La máxima velocidad de autólisis se detecta en los siguientes rangos de pH: 3,2-3,7 y 8,3-9,0. El sistema lipolítico es notoriamente estimulado por las altas temperaturas, alcanzando valores de máxima actividad a 85 °C (pH 3,5) y 75 °C (pH 8,5). Los cationes divalentes (Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Mg⁺⁺, Hg⁺⁺) y monovalentes ensayados (K⁺, Na⁺), en su mayoría deprimen la actividad lipolítica, al igual que el EDTA, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el dodecil sulfato de sodio (SDS), en tanto que la aprotinina no tiene efecto sobre aquélla. El Triton X-100 incrementa la actividad en ambas zonas de pH óptimo. El sistema lipolítico del girasol manifiesta mayor afinidad por los ésteres de ácidos grasos saturados.

SUMMARY. "Characterization of the lipolytic system of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) on endogenous substrate". The lipolytic system present in sunflower seedlings seems to be associated to the lipid bodies located in cotyledons cells. Lipid bodies isolated from sunflower seedlings, but not from ungerminated sunflower seeds, could undergo autolysis of internal triacylglycerols resulting in the release of fatty acids and glycerol. Maximum activity is reached at pH 3,2-3,7 and 8,3-9,0. The lipolytic system is notably stimulated by higher temperatures: maximum activity is reached at 85 °C (pH 3,5) and 75 °C (pH 8,5). Inhibition and activation of the enzyme by some chemicals are also included in this work: bivalent (Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Mg⁺⁺, Hg⁺⁺) and monovalent (K⁺, Na⁺) cations mostly depress lipolytic activity, as well as EDTA, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and sodium dodecylsulphate (SDS), while aprotinine does not modify it; on the contrary, Triton X-100 increases lipolytic activity in both optimum pH ranges. The lipolytic system of sunflower shows higher affinity towards saturated fatty acids.

INTRODUCCION

Las semillas de oleaginosas contienen triacilglicéridos intracelulares como principal reserva nutritiva de la que dispone el embrión para su futuro desarrollo. Durante la germinación, la utilización de dichas reservas se inicia con la hidrólisis

* Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: *Helianthus annuus*; Girasol; Cuerpos lipídicos; Lipasas; Oleaginosas; Autólisis.

KEY WORDS: *Helianthus annuus*; Sunflower; Lipid bodies; Lipases; Oil seeds; Autolysis.

gradual de los triacilglicéridos a ácidos grasos y glicerol. Esta primera reacción es catalizada por lipasas (EC 3.1.1.3.), cuya actividad ha sido demostrada en los tejidos de plántulas de diferentes especies vegetales. Los triacilglicéridos están localizados en organelas subcelulares llamadas cuerpos lipídicos (oleosomas, esferosomas), que están rodeados por una media unidad de membrana ¹.

De acuerdo a la especie, las lipasas se pueden localizar en la membrana de los cuerpos lipídicos o en otros compartimientos subcelulares ¹. Los cuerpos lipídicos constituyen los candidatos ideales para la localización de las lipasas, ya que para que la lipólisis pueda tener lugar la enzima tiene que estar en contacto con el sustrato ². Sin embargo, existe escasa información acerca de la presencia de lipasas en los cuerpos lipídicos de semillas de oleaginosas: ricino ³, nabo ⁴, mostaza ⁴ y maíz ² son, a la fecha, los únicos casos informados.

Si los cuerpos lipídicos aislados, en condiciones apropiadas de pH y temperatura, producen liberación enzimática de ácidos grasos a partir de los triacilglicéridos endógenos ("autolisis"), este hecho suele ser interpretado como indicador de la presencia de una lipasa asociada a la membrana de los cuerpos lipídicos ¹.

En un trabajo anterior ⁵ se comunicó la presencia de actividad lipolítica en plántulas de girasol cultivadas a 30 °C en la oscuridad; la mayor actividad se registra entre los días 2 y 3 de iniciada la germinación, con valores máximos a pH 3,7 y 8,5. En el presente trabajo se da cuenta de la existencia de autolisis en cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L., cv. ACA 871), incluyendo la caracterización parcial del sistema lipolítico responsable de la movilización de los triacilglicéridos de reserva, así como los cambios producidos en la composición de ácidos grasos de los triacilglicéridos residuales durante la germinación de las semillas.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal

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

Las semillas se lavaron con agua corriente durante 24 horas a temperatura ambiente (20 °C) y se pusieron a germinar sobre toallas de papel húmedo a 30 °C en la oscuridad. El fin del período de imbibición fue considerado día cero de la germinación. Las plántulas fueron seleccionadas tanto por edad como por longitud del hipocótilo.

Preparación de extractos

Cotiledones de plántulas de 2-3 días de desarrollo fueron cuidadosamente removidos, lavados con agua destilada y homogeneizados (Omni-mixer, Sorval) durante un minuto a 4 °C con solución 0,1 M de buffer fosfatos de pH 7,5. El homogenato fue filtrado a través de una tela de nylon (tamaño de poro: 0,2 mm²) y el extracto crudo obtenido congelado y conservado a -20 °C hasta el momento de su uso.

Aislamiento de cuerpos lipídicos

Los extractos crudos fueron centrifugados a 11.000 g durante 30 minutos a 4 °C, obteniéndose una capa grasa superior que contiene los cuerpos lipídicos, un sobrenadante líquido y un pellet. La capa grasa fue cuidadosamente removida con una espátula y resuspendida en agua destilada (100 mg/ml); el sobrenadante fue recogido y el pellet separado y resuspendido en solución 0,1 M de buffer fosfatos de pH 7.

Determinación de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó por un método colorimétrico ⁶ en el que los ácidos grasos liberados en la lipólisis son convertidos en complejos de cobre que se solubilizan en isooctano, cuya absorbancia se determina a 715 nm.

Cuando se determinó actividad sobre la capa grasa, el medio de reacción contenía 2 ml de solución buffer, 5 ml de isooctano y 2 ml de muestra, ya que en la misma están presentes tanto la enzima como el sustrato. Para estimar la actividad lipolítica del sobrenadante y del pellet se utilizó como sustrato 0,5 ml de aceite de girasol disuelto en 4,5 ml de isooctano.

La mezcla de reacción fue agitada durante 2 minutos a 37°C, la actividad enzimática se detuvo por el agregado de 2 ml. de HCl 6N y la mezcla se siguió agitando durante un minuto. Finalmente se separaron 3 ml de la capa superior de isooctano, que contienen los ácidos grasos liberados, y se hicieron reaccionar con 0,6 ml de solución de acetato de cobre al 5% (pH 6,1). Luego de agitar cada tubo en un vórtex durante 90 segundos, se midió la absorbancia de la solución a 715 nm y los resultados se expresaron como nanomoles de ácido oleico por minuto por par de cotiledones.

Los ácidos grasos libres, eventualmente presentes en la muestra, fueron descontados mediante blancos en los que 2 ml de muestra se agitaron con 2 ml de HCl 6N durante un minuto, previamente a la adición de buffer e isooctano.

Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo especialmente diseñado para la realización simultánea de reacciones termostatazadas en sistemas de dos fases ⁷.

Para la obtención de un perfil de actividad enzimática en función del pH se utilizaron los siguientes sistemas buffer ⁸ : citrato-fosfato (pH 2,6-7), ácido bórico-borato de sodio (pH 7,6-9,2) y glicina-hidróxido de sodio (8,6-10,6).

Efecto de agentes químicos sobre el sistema lipolítico

Una alícuota (1,8 ml) de capa grasa resuspendida fue incubada durante 10 min a 37 °C con 0,2 ml de diferentes reactivos: aprotinina (0,009 mM), HgCl₂ (0,1 mM), PMSF (1 mM), CaCl₂, Cu(CH₃COO)₂, EDTA, KCl, MgCl₂ y NaCl (1 mM y 10 mM), Triton X-100 y SDS (1%); la actividad lipolítica residual fue medida como se indicó anteriormente.

Variación de la actividad lipolítica con la temperatura

El comportamiento del sistema lipolítico con la temperatura se estableció determinando la actividad lipolítica en muestras de capa grasa resuspendida en agua destilada y sometidas a incubación durante 2 minutos a pH 3,5 y 8,5 entre 35 °C y 90 °C.

GLC de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa (GLC) ⁹ de los ésteres metílicos de los mismos, a partir de los aceites extraídos de cotiledones de distintos estadios de desarrollo.

Para la obtención de los aceites se extrajeron los lípidos totales¹⁰ de plántulas de distintos días de germinación con $\text{Cl}_3\text{CH} : \text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), utilizando 17 ml de mezcla extractiva por gramo de muestra. La suspensión resultante se filtró por papel de filtro (S & S, tipo 0859) y el residuo se lavó dos veces con 2 ml de la mezcla extractante. Luego se le agregó al filtrado 1/5 de volumen de solución acuosa de NaCl 0,9%, se agitó y se dejó decantar a baja temperatura para permitir la separación de dos fases: una superior acuosa y una inferior clorofórmica. La fase inferior que contiene el aceite se llevó a seco.

La esterificación de los ácidos grasos se llevó a cabo calentando a reflujo durante 30 minutos 15 gotas de aceite con 30 ml de una mezcla de metanol-benceno (3:1) y 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar y luego se extrajo con 50 ml de hexano, agitando durante 1 minuto. Se lavó hasta neutralidad con NaCl al 10%, utilizando naranja de metilo como indicador. Se secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el hexano a presión reducida, se hizo una dilución 1:10 en hexano y se inyectó 1 microlitro de la muestra en el cromatógrafo gaseoso ¹¹.

Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo en un equipo Hewlett Packard modelo 5890 A. Las áreas correspondientes a cada pico se determinaron en forma relativa con un integrador Hewlett Packard 3392. La columna usada fue SP 2330 de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno.

La mejor resolución se obtuvo con las siguientes condiciones de corrida: un caudal de N_2 de 20 ml/min., una temperatura del inyector de 250 °C y una temperatura de columna de 188 °C. Como patrones se utilizaron los siguientes ácidos grasos (Sigma, 99,99% de pureza): ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), araquídico (20:0) y behénico (22:0).

RESULTADOS

Localización del sistema lipolítico

La capa grasa obtenida a partir de plántulas de dos días de crecimiento muestra actividad lipolítica endógena, con dos máximos a valores de pH comprendidos entre 3,2-3,7 y 8,3-9,0 (Fig. 1). La misma fracción proveniente de semillas sin germinar no manifiesta actividad lipolítica a ningún valor de pH.

El sobrenadante y el pellet obtenidos tanto a partir de semillas en dormancia como de semillas germinadas no revelan actividad lipolítica al ser ensayados frente a aceite de girasol como sustrato.

Efecto de diversos reactivos químicos sobre el sistema lipolítico

La acción del EDTA, iones mono y divalentes, detergentes e inhibidores enzimáticos se muestra en la Tabla 1.

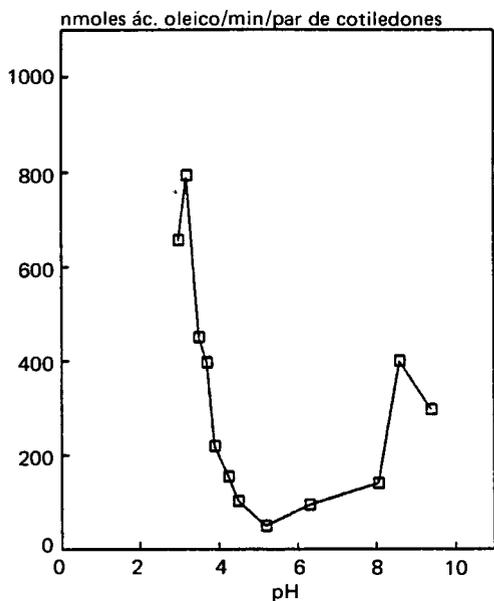


Figura 1. Variación de la actividad lipolítica en función del pH (37°C) en cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol de dos días de germinación.

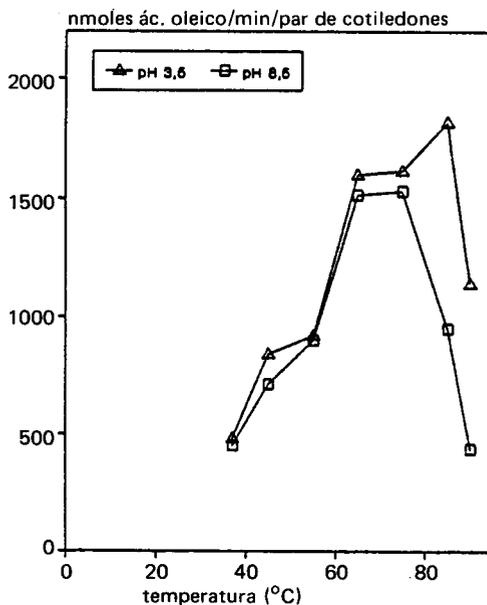


Figura 2. Variación de la actividad lipolítica en función de la temperatura en cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol de dos días de germinación.

Agente químico	Concentración	Actividad lipolítica relativa	
		pH 3,5	pH 8,5
Nada		100	100
EDTA	1mM	53	27
	10mM	27	27
CaCl ₂	1mM	93	83
	10mM	40	55
(CH ₃ COO) ₂ Cu	1mM	32	68
	10mM	94	40
MgCl ₂	1mM	74	63
	10mM	59	48
NaCl	1mM	91	53
	10mM	104	54
KCl	1mM	34	73
	10mM	18	84
HgCl ₂	0,1 mM	58	65
	1mM	44	59
PMSF	1mM	37	62
Aprotinina	9 µM	110	94
Triton X-100	1%	155	140
SDS	1%	55	19

Tabla 1. Efecto del EDTA, iones, detergentes e inhibidores enzimáticos sobre la actividad lipolítica.

A ambos valores de pH óptimo el agregado de EDTA, CaCl_2 , HgCl_2 y MgCl_2 provocan un descenso de la actividad lipolítica, que es más notorio a mayores concentraciones. En cambio, el $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ y el KCl muestran un comportamiento diferencial a los dos valores de pH óptimo: una concentración de 1 mM de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ disminuye la actividad lipolítica a ambos valores de pH, pero si a pH 3,5 la concentración se eleva a 10 mM prácticamente se reestablece la actividad original, en tanto que a pH 8,5 la actividad disminuye aún más. En cuanto al KCl, la actividad es baja a pH 3,5 a concentración 1 mM y desciende aún más al aumentar a 10 mM, mientras que a pH 8,5 la actividad desciende a concentración 1 mM pero se incrementa al aumentar la concentración a 10 mM.

El NaCl no modifica la actividad a pH 3,5, pero la reduce significativamente a pH 8,5.

En cuanto a los inhibidores de hidrolasas serínicas ensayados, la aprotinina parece no ejercer mayor efecto, en tanto que el PMSF provoca inhibición, que es mayor a pH ácido.

Los dos detergentes ensayados exhiben marcadas diferencias: el SDS provoca una fuerte caída de la actividad lipolítica (mayor a pH alcalino) en tanto que el Triton-X-100 incrementa notoriamente la actividad a ambos valores de pH.

Comportamiento del sistema lipolítico frente a la temperatura

El comportamiento térmico del sistema lipolítico se muestra en la Figura 2. A pH 8,5 la actividad lipolítica se incrementa hasta alcanzar un máximo entre 65 °C y 75 °C (3,4 veces el valor registrado a 37 °C) y luego decae, obteniéndose a 90 °C valores similares a los obtenidos a 37 °C. En cambio, a pH 3,5 la actividad lipolítica alcanza su valor máximo a 85 °C (3,8 veces la actividad registrada a 37 °C), reteniendo aún un 63% de la actividad máxima a los 90 °C.

Cambios en la composición de ácidos grasos durante la lipólisis in situ.

El análisis de ácidos grasos obtenidos a partir del aceite de semillas sin germinar se muestra en el cromatograma de la Figura 3.

La variación porcentual relativa de los ácidos grasos presentes en aceites residuales extraídos de cotiledones de plántulas de distintos días de germinación se consigna en la Tabla 2.

Luego de 24 horas de imbibición (día 0) los ácidos grasos saturados manifiestan las siguientes variaciones: el porcentaje relativo del ácido mirístico disminuye en un 62%, el del araquídico en un 35,7%, el del behénico en un 10,26%, el del palmítico en un 3,2% y el del esteárico en un 1,16%.

Durante los primeros días de la

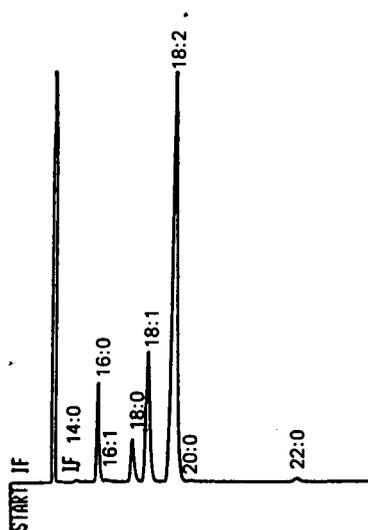


Figura 3. Ácidos grasos presentes en el aceite de semillas no germinadas de girasol, analizados por cromatografía gaseosa (detalles en el texto).

semillas	ácidos grasos (áreas relativas)							
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:0	22:0
no germinadas	0,357	7,832	0,190	4,817	17,513	67,603	0,605	1,081
día 0	0,135	7,582	0,108	4,761	17,680	68,168	0,389	0,970
día 2	0,175	6,531	< 0,1	4,804	19,543	66,463	0,402	1,034
día 3	0,390	6,204	0,266	4,038	21,821	65,009	0,369	0,985
variación porcentual	+9	-21	+44	-16	+24	-4	-39	-9

Tabla 2. Variación en el contenido de ácidos grasos durante la lipólisis in situ, analizados por cromatografía gaseosa de sus ésteres metílicos.

germinación, las variaciones más significativas en el contenido de ácidos grasos en relación con su composición en el aceite contenido en semillas sin germinar se registraron en los ácidos grasos saturados. Al día 2 se advirtieron las siguientes disminuciones: mirístico (51%), araquídico (33,5%), palmítico (16,6%), behénico (4,34%), linoleico (1,68%) y esteárico (0,26%). Al tercer día de la germinación se observó la siguiente reducción relativa en los porcentajes de ácidos grasos: araquídico(39%), palmítico (21%), esteárico (16%), behénico (9%) y linoleico (4%).

DISCUSION

En el presente trabajo se pone en evidencia la capacidad que tienen los cuerpos lipídicos aislados de cotiledones de plántulas de girasol de hidrolizar los triacilglicéridos endógenos (autólisis). En algunas especies, como ocurre en ricino ¹², los cuerpos lipídicos aislados exhiben autólisis sin necesidad de aditivos ni de agitación; sin embargo en girasol se requiere el agregado de un solvente orgánico (isooctano) y de agitación continua para que la reacción tenga lugar, hecho que podría explicar los resultados negativos obtenidos por Huang ¹ en ese sentido.

De las tres fracciones obtenidas por centrifugación del extracto crudo de cotiledones de plántulas de girasol, la única que manifiesta actividad lipolítica es la capa grasa. Dado que la actividad fue recuperada en esta fracción con un perfil de pH equivalente al obtenido con el extracto crudo ⁵, el sistema lipolítico presente en cotiledones de plántulas de girasol se encontraría localizado en los cuerpos lipídicos.

El comportamiento de la actividad lipolítica con el pH resultó diferente al de la mayoría de las lipasas de semillas de oleaginosas estudiadas. La aparición de dos máximos de actividad, uno a pH ácido y otro a pH alcalino, no es usual. Con algunas excepciones como *Ricinus communis* ¹³, *Brassica campestris* ¹⁴ y *Lupinus alba* ¹⁵, que contienen una lipasa ácida en semillas sin germinar, las demás lipasas conocidas, tanto de semillas en dormancia como germinadas, son alcalinas ¹⁶⁻¹⁷.

Se ha descrito que los ácidos grasos liberados en la lipólisis reducen, tanto

por efecto de carga como por impedimento estérico, el acceso de la lipasa a las moléculas de triacilglicéridos situadas en la interfase aceite-agua y que los cationes divalentes, como aceptores de ácidos grasos, previenen este tipo de inhibición ¹⁸. Este efecto no ha sido advertido en la autólisis de los cuerpos lipídicos de girasol. Tampoco se detectó la estimulación de la actividad lipolítica por cationes monovalentes, a los que se atribuye la capacidad de suprimir la inhibición enzimática por efecto de carga interfacial ¹⁵.

La actividad autolítica se ve incrementada por la presencia de Triton X-100 al 1% en el medio de reacción, tanto a pH ácido como alcalino, lo que podría indicar que en estas condiciones se favorece la solubilización de la o las lipasas o bien se logra un mejor contacto entre enzima y sustrato. Este efecto contrasta con el observado en lipasas aisladas de maíz ², nabo ¹⁹ y ricino ²⁰, cuya acción es fuertemente inhibida en presencia de detergentes.

La autólisis de los triacilglicéridos de los cuerpos lipídicos se ve estimulada con el aumento de la temperatura, siendo máxima a 85 °C a pH ácido y a 75 °C a pH alcalino. Si bien no existe información acerca de la temperatura óptima registrada en casos de autólisis, enzimas lipolíticas aisladas de otras semillas ^{14, 21} manifiestan temperaturas óptimas menores en la hidrólisis de sustrato exógeno, entre 25 °C y 37 °C.

El análisis de la composición de ácidos grasos de los triacilglicéridos presentes en semillas sin germinar revela que el 85,3 % de los mismos corresponde a ácidos grasos no saturados, de los cuales durante los primeros días de la germinación el ácido linoleico disminuye un 4 % en su porcentaje relativo, mientras que el ácido oleico parecería no consumirse. En el mismo período el ácido palmítico, que constituye el 7,8 % de los ácidos grasos contenidos en semillas en dormancia, decrece en forma relativa un 21 %. Este hecho, sumado a la disminución en general de los ácidos grasos saturados, pondría de manifiesto una preferencia de la o las enzimas presentes en el sistema lipolítico de cotiledones de plántulas de girasol por los triacilglicéridos que contienen dichos ácidos, comportamiento que coincide con el revelado por otras lipasas de semillas ^{9, 14}.

Agradecimientos. Al Ing. Agr. José María Bruniard, de la Asociación de Cooperativas Argentinas C.L., por la provisión de semillas. A la Dra. Lidia Herrera por su colaboración en la cromatografía gaseosa de ácidos grasos.

El presente trabajo ha sido apoyado por un subsidio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y por un estímulo científico parcial del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Huang, A.H.C. (1984) "Plant lipases", en *"Lipases"* (B. Borgström & H.L. Brockman, eds.), págs. 419-42. Elsevier, Amsterdam
2. Lin, Y.H., L.T. Wimor y A.H.C. Huang (1983) *Plant Physiol.* **73**: 460-3
3. Ory, R.L., L.Y. Yatsu, y H.W. Kircher (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **123**: 255-64
4. Lin, Y.H. y A.H.C. Huang, (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **225**: 360-9

5. Arribére, M.C., N.S. Priolo y N.O.Caffini (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 157-63
6. Kwon, D.Y. y J.S. Rhee (1986) *J.Amer. Oil Chem.Soc.* **63**: 89-92
7. Caffini, N.O., M.C. Arribére y N.S. Priolo (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 183-5
8. Stoll, V.S. y J.S. Blanchard (1990) *Meth. Enzymol.* **182**: 31-8
9. Daood. H. y H. Al-Ani (1986) *Acta Alimentaria* **15**: 319-28
10. Radin, N. S. (1969) *Meth. Enzymol.* **14**: 215-54
11. Herrera, L. (1990) "*Cristalización de triglicéridos en mezclas complejas*". Tesis doctoral. Fac. de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina
12. Ory, R.L., A. J. St. Angelo y A.M. Altschul (1960) *J. Lipid Res.* **1**: 208-13.
13. Muto, S. y H. Beevers (1974) *Plant Physiol.* **54**:23-8
14. Villalobos, N., F.Simón, L.Martín, M. Herrera y G. Nicolás (1987) *Biochem.Syst.Ecol.* **15**: 551-8
15. Sanz, L. C. y J.M. Olias (1990) *Food Chem.* **37**: 221-8
16. Whitenberg, D. C. y Ching I. Pao (1980) *Texas Sci. J.* **22**: 150-7
17. Huang, A. H. C. y R. A. Moreau (1978) *Planta* **141**: 111-6
18. Benzonana, G. y P. Desnuelle (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **164**: 47-58
19. Lin Y-H y A. H. C. Huang (1983) *Arch. Biochim. Biophys.* **225**: 360-9
20. Maeshima M. y H. Beevers (1985) *Plant Physiol.* **79**: 489-93
21. Daood, H. y H. Al-Ani (1988) *Acta Alimentaria* **17**: 127-39