

R. 11782

i 19220765

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS

SECCION DE QUIMICAS

x/865

COMPOSICION PECTICA Y ENZIMAS PECTINOLITICAS PRESENTES EN
PRODUCTOS ADEREZADOS ESPAÑOLES.

por

Jesus Castillo Gomez

Sevilla, Octubre 1977

SECRET

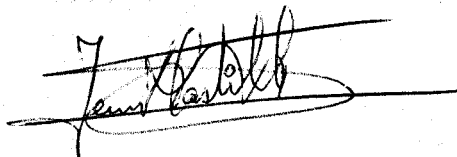
EX-11-77

9-11-77

ENTRADA N° 903

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

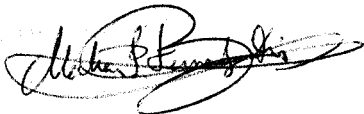
**Memoria presentada por el Licenciado
Jesús Castillo Gómez para optar al
grado de Dr. en Ciencias, Sección de
Químicas.**



fdo./ Jesús Castillo Gómez

vega

El Director de la Tesis



**fdo./Dr. D. Matías J. Fernández Díez
Profesor de Investigación**

vega

El Catedrático Ponente



**fdo. Dr. D. Juan M. Martínez Mazono
Catedrático de Química Técnica
de la Universidad de Sevilla.**

**Instituto de la Grasa y sus
Derivados.**

Esta Tesis ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química y Microbiología del Instituto de la Grasa y sus Derivados, en Sevilla, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. D. Matías J. Fernández Díez, Profesor de Investigación y Jefe del citado Departamento y la Dra. Dña. M^a Isabel Minguez Mosquera, Colaborador, ambos de dicho Centro, y habiéndose cumplido todos los requisitos exigidos.

Sevilla, Octubre 1977

AGRADECIMIENTO

Al Dr. D. Juan M. Martínez Moreno, Catedrático Padrino de esta Tesis.

Al Dr. D. Matías J. Fernández Díez, Profesor de Investigación del Instituto de la Grasa y a la Dra. M^a Isabel Mínguez Mosquera, Colaborador Científico de este mismo Centro por su eficaz e ininterrumpida dirección y su constante cooperación.

A D. José Cabrera Martín Colaborador Científico del Instituto de la Grasa por su desinteresada y valiosa ayuda en la elaboración de los datos.

A la Dra. Dña. M^a del Carmen Durán Quintana por el aislamiento de las bacterias ensayadas.

A mis compañeros y personal del Departamento de Química y Microbiología de este Centro, que de una u otra forma han contribuido a que esta Tesis fuera una realidad.

A la Dra. Dña. Dolores Ayestaran Tafalla, Directora de la Biblioteca de este Centro, y al Dr. D. Fernando Recio Quijano, médico Adjunto del Laboratorio de Bioquímica de la Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío por su estímulo y apoyo.

A las firmas comerciales que han suministrado las muestras, para la realización de las experiencias.

INDICE

	<u>Página</u>
1.- Introducción	1
2.- Objetivo y planteamiento	3
3.- Antecedentes bibliográficos	4
3.1.- Sustancias pécticas	4
3.2.- Enzimas pectinolíticas	12
3.2.1.- Pectinesterasa	15
3.2.2.- Poligalacturonasa	20
4.- Técnica experimental	27
4.1.- Materia prima empleada	27
4.1.1.- Pimientos	27
4.1.2.- Aceitunas	29
4.2.- Preparación de las muestras	29
4.2.1.- Obtención de residuos secos para la determinación de pectinas	29
4.2.2.- Extractos de pectinesterasa	30
4.2.3.- Extractos de poligalacturonasa	31
4.3.- Metodología	32
4.3.1.- Sustancias pécticas	32
4.3.1.1.- Sustancias pécticas totales por el método del carbazol	32
4.3.1.2.- Método de valoración funcional	34
4.3.1.3.- Determinación de acetilos	35
4.3.1.4.- Cálculo del grado de esterificación	38
4.3.1.5.- Influencia de diversos factores en la aplicación del método del carbazol	38

	<u>Página</u>
4.3.2.- Actividad pectinolítica	44
4.3.2.1.- Actividad de pectinesterasa	44
4.3.2.2.- Actividad de poligalacturonasa	46
4.3.2.3.- Detección de pectinesterasa y poligalacturonasa producidas por levaduras por formación de geles de pectato cálcico	50
4.3.2.4.- Medida de poligalacturonasa producida por bacterias mediante formación de halo en geles pécticos	51
5.- Resultados	54
5.1.- Composición péctica	54
5.1.1.- Pimientos	54
5.1.2.- Aceitunas	58
5.2.- Actividad de pectinesterasa	61
5.2.1.- Pimientos	62
5.2.2.- Aceitunas	63
5.3.- Actividad de poligalacturonasa	71
5.3.1.- Pimientos	71
5.3.2.- Aceitunas	72
5.4.- Actividad pectinolítica de microorganismos	91
6.- Resumen	95
7.- Conclusiones	104
8.- Bibliografía	109

1.- INTRODUCCION

En diversos productos aderezados (aceituna de mesa, pimientos para su relleno, pepinillos, etc) se producen fenómenos de ablandamiento que son causa de grandes pérdidas económicas por disminución en los rendimientos y depreciación del producto que no mantiene un adecuado grado de calidad. La importancia de este problema en la industria del aderezo española, ya grande tradicionalmente, tiende a incrementarse con el aumento que ha experimentado en los últimos años la elaboración de aceitunas negras al natural, cuya producción ha pasado, aproximadamente, de 1.000 toneladas métricas a 12-15.000 toneladas en los últimos ocho años, destinada fundamentalmente a la exportación a países del Este, pudiendo contribuir sensiblemente a equilibrar nuestro déficit comercial con dichas naciones. Las perspectivas actuales de apertura de nuevos mercados para este producto son igualmente esperanzadoras e incrementan la importancia de esta investigación.

Numerosos autores han relacionado el problema de ablandamiento en los productos del aderezo con cambios sufridos en las sustancias pécticas, que son responsables de la unión de las células entre sí para formar los tejidos, esto es, representan el constituyente principal de la llamada lámina media o sustancia intercelular realizando la función de una especie de cemento que mantiene la estructura tisular. Ya Cruess (1) en 1947, menciona este hecho como causante de considerables pérdidas para la industria del aderezo, atribuyéndolo a la producción de enzimas pectinolíticas por los mohos que crecen en la superficie de las salmueras de conservación, y muy principalmente a los pertenecientes al género *Penicillium*.

Vaughn (2) se refiere igualmente al ablandamiento de pepinillos y aceitunas por la actividad de enzimas microbianas que atacan las sustancias pècticas y cita, entre otros microorganismos responsables: *Bacillus mesentericus*, *B. megatherium*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, mohos de los gèneros *Penicillium* y *Aspergillum*, y levaduras. Acepta igualmente la posibilidad de descomposiciòn de pectinas por simple hidròlisis àcida o alcalina, del calor, heladas, etc.

Sin embargo, dentro de la bibliografía existente sobre el aderezo (3), se encuentran datos globales (4) sobre composiciòn y anàlisis de los materiales pècticos en el pimiento, o de determinadas fracciones obtenidas por diferencia de solubilidad (5) (6), pero solo en los últimos años (7) (8) (9) (10) se ha iniciado un estudio detallado de las pectinas del pimiento y aceituna de mesa y las transformaciones que experimentan estos productos durante la fermentaciòn y conservaciòn (11) (12).

2.- OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.

Dada la relación existente entre la composición pèctica y la textura, el primer objetivo de la presente tesis es estudiar el contenido en pectinas de la aceituna negra de mesa y del pimiento empleado en el relleno de aceitunas verdes así como la composición de estos materiales pècticos investigando el porcentaje de esterificación y de acetilos y los cambios que experimentan durante la elaboración y conservación.

Una vez establecida esta composición se aborda el estudio de las enzimas pectinolíticas que, procedentes bien del fruto, bien de microorganismos, pueden actuar degradando las sustancias pècticas.

Se caracterizan las pectinesterasas, que saponifican los èsteres metílicos de los àcidos poligalacturónicos presentes en la molècula, y las poligalacturonasas que realizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la cadena entre las unidades de àcido galacturónico.

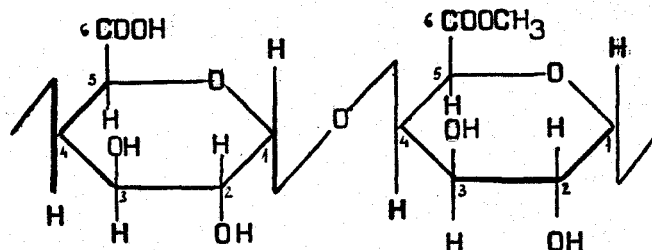
Por último, para evitar las alteraciones producidas en la aceituna madura por estas últimas enzimas, se investiga la posible presencia de inhibidores naturales en dicho fruto, deteniéndose en el estudio de la naturaleza, competitiva o no, de la inhibición.

3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

3.1.- Sustancias pècticas.

Las sustancias pècticas se encuentran presentes (13) (14), si no en todos, en la mayor parte de los tejidos vegetales, y en general, en proporciones relativamente elevadas en aquellos que son blandos, jugosos, de paredes primarias, en condiciones de crecimiento ràpido, y con alto contenido en humedad. Durante el proceso de lignificaciòn la cantidad de sustancias pècticas en las plantas decrece generalmente, llegando a constituir, en los tejidos duros, sòlo un pequeño porcentaje a veces despreciable.

Tienen la naturaleza de derivados de los hidratos de carbono; son poliurònidos, compuestos principalmente de residuos de àcido anhidrogalacturònico, derivado de la galactosa. La hipòtesis màs generalizada (15) es que los residuos anteriormente citados estàn unidos entre sÌ, en cadena lineal, mediante enlaces 1 - 4, anàlogos a los que se presentan en las amilasas.



Como puede verse en esta fòrmula, los grupos carboxilos de la cadena pèctica pueden encontrarse bien libres, bien parcialmente esterificados con alcohol metilico, e incluso en forma de sales, principalmente de calcio y de magnesio.

El àngulo entre los carbonos 1 y 4 es de 90° con respecto al plano del anillo de àcido galacturònico, segùn se ha demostrado por los estudios realizados por rayos X. Este àngulo dà una configuraciòn espiral a la cadena.

El número de residuos presentes en la cadena lineal es muy variable, pudiendo unirse diversas cadenas entre sí para formar macromoléculas, por lo que el peso molecular de las sustancias pècticas aisladas oscila dentro de un amplio intervalo que abarca desde 2.500 - 7.500, para el análisis de grupos terminales, hasta casi 300.000 en los productos más complicados.

Se han sugerido cuatro tipos de enlaces entre las distintas cadenas lineales:

a).- Formación de anhídrido entre dos grupos carboxilos de cadenas diferentes.

b).- Formación de ester entre un carboxilo y un hidroxilo de otra cadena.

c).- Enlaces de hidrógeno entre cadenas, bien entre hidroxilos, bien entre hidroxilos y carboxilos.

d).- Puentes de calcio, entre los carboxilos de cadenas diferentes.

Las sustancias pècticas que, como ya hemos indicado, representan el constituyente principal de la lámina media, forman también parte de las paredes primarias de las células, junto con celulosa, hemicelulosa y lignina, e incluso están presentes, a veces, en el jugo celular.

Su naturaleza coloidal hace que se empleen ampliamente en la preparación de todo tipo de emulsiones en productos alimenticios, y su uso en la elaboración de mermeladas, jaleas y compotas está sumamente extendido. Son muy abundantes en los frutos del género Citrus, en la pulpa de manzana y en la remolacha azucarera, cons-

tituyendo los dos primeros productos citados, generalmente, el mejor recurso para la obtención de sustancias pècticas purificadas.

Las pectinas de alto contenido en metoxilos en las concentraciones normalmente empleadas en la industria, forman geles dentro de un cierto intervalo de acidez, y en presencia de trazas de calcio, sòlo con un 50 % de azùcar al menos. Por el contrario, cuando el contenido en metoxilos es bajo, la gelificación puede producirse, en presencia de calcio, en ausencia de azùcar o con concentraciones mucho menores. Estos geles, conocidos como geles de enlace iònico tienen aplicaciòn en la elaboraciòn de ciertos productos alimenticios como ensaladas y postres diversos, pudiendo oscilar en ellos el valor de pH entre limites amplios, de 1 a 6 unidades (16).

En la molècula pueden estar presentes, esterificando los grupos alcohòlicos de las posiciones 2 y 3, grupos acetilos que dificultan los enlaces de hidrògeno, y por tanto, la formaciòn de geles.

Ademàs de los residuos de àcido galacturònico, con sus grupos carboxilos libres o esterificados parcialmente, o bien en forma de sales, se han encontrado en pectinas de diversas fuentes por varios investigadores (17) (18) (19) galactosa, glucosa, arabinosa, ramnosa, ribosa y otros azùcares neutros. Sin embargo, y teniendo en cuenta que las sustancias pècticas son difìciles de purificar, no puede darse seguridad sobre si estos compuestos son simples contaminantes o partes constitutivas de las molèculas pècticas.

Estas presentan carga negativa y son fuertemente hidròfilas pudiendo retener una cantidad de agua igual a varias veces su peso. En general, cualquier deshidratante, como el alcohol o la acetona, produce su precipitaciòn. Esta operaciòn se realiza indus-

trialmente mediante el empleo de coloides de carga contraria, como el hidróxido de aluminio.

Así mismo, precipitan los materiales pécticos ciertos iones metálicos, principalmente el calcio que, como hemos visto, puede ser el puente de unión de varias cadenas lineales entre sí. Esta acción precipitante se ve tanto más dificultada cuanto mayor es el porcentaje de grupos carboxilos esterificados en la molécula.

El calor produce una despolimerización de las sustancias pécticas por lo que las protopectinas, insolubles, cuando se hierven con agua liberan pectinas con el consiguiente aumento de solubilidad. De igual modo, al calentar una solución de pectinas se encuentra una pérdida de viscosidad en la que tiene una influencia notable el valor de pH del medio, pues los ácidos diluidos catalizan la despolimerización, y a concentración adecuada pueden producir además descarboxilación. La adición de electrolitos, al aumentar la carga de las moléculas pécticas, favorece la disociación, y por tanto disminuye la viscosidad de las soluciones.

La solubilidad de las sustancias pécticas está íntimamente relacionada con el contenido en ésteres metílicos, de forma tal que cuanto mayor sea la esterificación mayor es la solubilidad. Otros factores que influyen son, principalmente, la longitud de las cadenas y el valor de pH del medio. Tanto los álcalis como los ácidos, aunque éstos con menor efectividad, catalizan la hidrólisis de los ésteres metílicos al azar.

Los métodos de análisis utilizados para la determinación cualitativa y cuantitativa de las sustancias pécticas, son muy diversos y dependientes, principalmente, de la información que se de-

sea obtener y de la materia prima que se toma como punto de partida, bien productos sólidos, bien disoluciones.

Kertesz (13), en el libro ya citado anteriormente, realiza una excelente revisión de los procedimientos analíticos utilizados hasta 1951. Estos métodos, en general, pueden ser directos, en los que se dosifica el material péctico tal como se encuentra en la materia prima, o indirectos, en los cuales se determina un producto derivado del originalmente presente, como pectato cálcico, o bien un producto de descomposición como los residuos de ácido galacturónico.

Ulrich (14) en 1952 indica, recogiendo la opinión de diversos autores, que no existe concordancia en cuanto a la valoración de las sustancias pécticas presentes en los frutos, y no califica este hecho de sorprendente, teniendo en cuenta los dudosos límites de separación entre distintas fracciones de compuestos pécticos, lo impreciso de sus definiciones, y las grandes diferencias que puede haber en relación con su presencia, composición, concentración y distribución, de unas especies vegetales a otras, e incluso dentro de una misma especie, de un momento a otro de la vida del fruto.

Por estas razones, la extracción de los compuestos a partir de los vegetales ofrece dificultades. Indica este autor que, generalmente, los análisis se efectúan bien sobre los extractos obtenidos con agua fría (pectinas), bien sobre los de agua hirviente acidulada (compuestos pécticos totales).

Resume, como más importantes, los siguientes procedimientos analíticos generales:

-- Pesar la pectina extraída, una vez desecada, después de precipitada con alcohol (70 % de concentración final) o acetona. Valoración posterior de la acidez libre y carboxilos esterificados, y por tanto riqueza en metoxilos de la pectina aislada.

-- Descarboxilar, por el ácido clorhídrico, la pectina aislada y dosificar el anhídrido carbónico producido.

-- Precipitar el material péctico, una vez saponificados los grupos ésteres con hidróxido sódico, como pectato cálcico y pesar el precipitado.

Sin embargo, McCready y McComb (20) en 1952, exponen las dificultades de interpretación de los resultados que se presentan al utilizar procedimientos de extracción sucesiva de fracciones pécticas de los tejidos vegetales empleando distintos disolventes (agua caliente, ácido mineral diluido, álcalis fríos, oxalato amónico, etc.) debido al solapamiento de las referidas fracciones. Consideran más razonable, para la determinación de pectinas totales en frutos, la extracción del material a pH 7 ó más bajo, a temperatura suave, con tal que el tejido esté suficientemente macerado y que los cationes polivalentes se encuentren secuestrados. Describen un procedimiento que consiste en extraer las sustancias pécticas totales de los frutos, sin calentamiento, empleando solución Versene (sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético), como secuestrante del calcio, y pectinasa (poligalacturonasa). A continuación, el ácido anhidrourónico obtenido en la degradación del polímero por la enzima se hace reaccionar con carbazol, en medio

sulfúrico, midiendo la intensidad del color desarrollado a 520 nm. El procedimiento puede aplicarse a diversos tipos de materiales pécticos, tales como residuos secos, frutos frescos y zumos concentrados.

Un método análogo es descrito por Rouse y Atkins (21) en 1955 y utilizado por ellos en otros trabajos (22) (23). Posteriormente, Thibault y Robin (24) han adaptado este procedimiento para la determinación automática de los materiales pécticos con un Auto Analizador.

Gee, McComb y McCready (25) desarrollan una técnica muy práctica que permite la determinación cuantitativa y caracterización química parcial de las sustancias pécticas totales sin necesidad de extraerlas de los tejidos vegetales. Para ello, los tejidos frescos se tratan con etanol acidificado que inactiva las enzimas, elimina azúcares, ácidos y sales orgánicas solubles y convierte los pectinatos en sus sales libres.

El residuo insoluble resultante se analiza directamente sin extraer del mismo las sustancias pécticas. Las determinaciones realizadas incluyen grupos carboxilos libres, esterificados y totales, grupos acetilos, porcentaje de ácido anhidrouónico y porcentaje de esterificación. Para la determinación de los grupos acetilos emplean el método específico colorimétrico de McComb y McCready (26) por reacción de los grupos ésteres con hidroxilamina, con formación del ácido acetohidroxámico. Luh y cols. (27) (28) emplean posteriormente los mismos procedimientos.

Schultz (29) desarrolla una técnica para determinar acetilos consistente en saponificar los ésteres con hidróxido sódico, una

vez humedecida la pectina con alcohol etílico, y valorar la acidez volátil tras la adición de solución de Clark (sulfato magnésico y ácido sulfúrico en agua destilada) utilizando octanol-2 (dos gotas) como desespumante.

Otros métodos de extracción y análisis, recientemente desarrollados por varios autores, y que aún no han alcanzado una difusión tan amplia como los anteriores, se resumen por Pilnik y Voragen en una revisión sobre composición y propiedades de las sustancias pécticas (30).

Se han realizado numerosos estudios sobre los cambios que experimenta el contenido péctico total en manzanas (31), peras (32), tomates (33), naranjas y bananas (34), durante la maduración y se ha comprobado que al avanzar ésta la protopectina se convierte enzimáticamente en pectina por lo que hay un aumento de la fracción soluble en agua en tomates, cerezas, nísperos, naranjas (35), bananas (36) mangos y manzanas (37), entre otros frutos.

También la metoxilación cambia durante la maduración; así en albaricoques se ha encontrado que presenta un máximo cuando la fruta está madura y decrece a continuación rápidamente (36). Este resultado se confirma en el melocotón por Chang y Smith (38) que lo relacionan con los geles obtenidos en mermeladas.

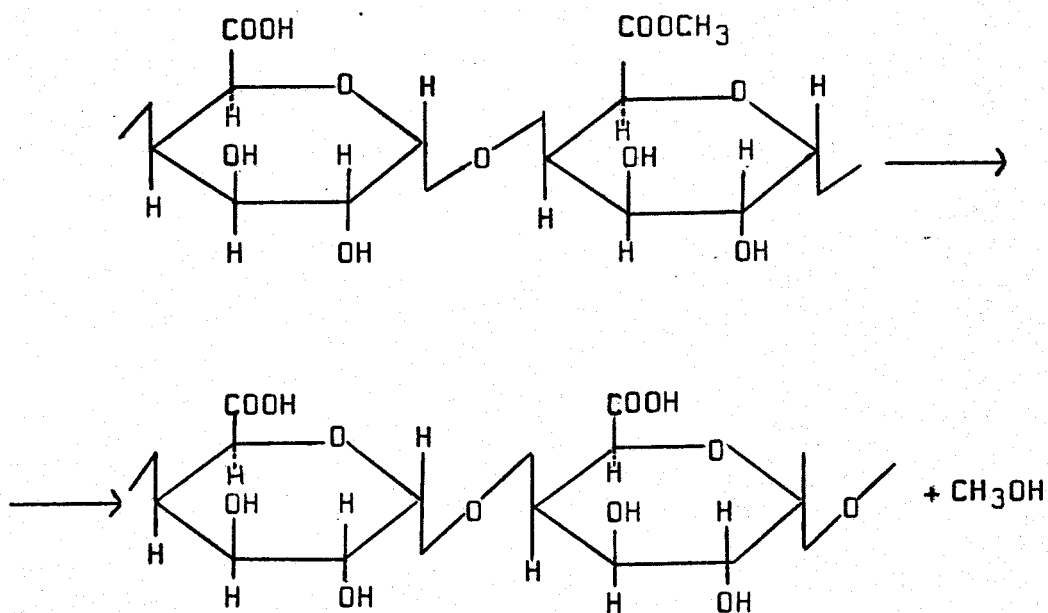
Utilizan la técnica de Smith y Bryant (39) en la cual la valoración se lleva a cabo después de separar las pectinas en fracciones relativamente homogéneas con respecto al contenido en ésteres metílicos, mediante el uso de dietilaminocelulosa (40) (41). Para la determinación de acetilos utilizan el método de Schultz

(29) anteriormente mencionado. Biale (42) ha estudiado la importancia de las pectinas desde el punto de vista fisiológico, por su contribución al metabolismo general.

3.2.- Enzimas pectinolíticas.

Dentro de las enzimas que pueden afectar las sustancias pécticas, modificando su composición, pueden establecerse según Phaff y Joslyn (43) y Kertesz (44), dos grupos principales según el lugar específico de acción sobre la molécula de pectina:

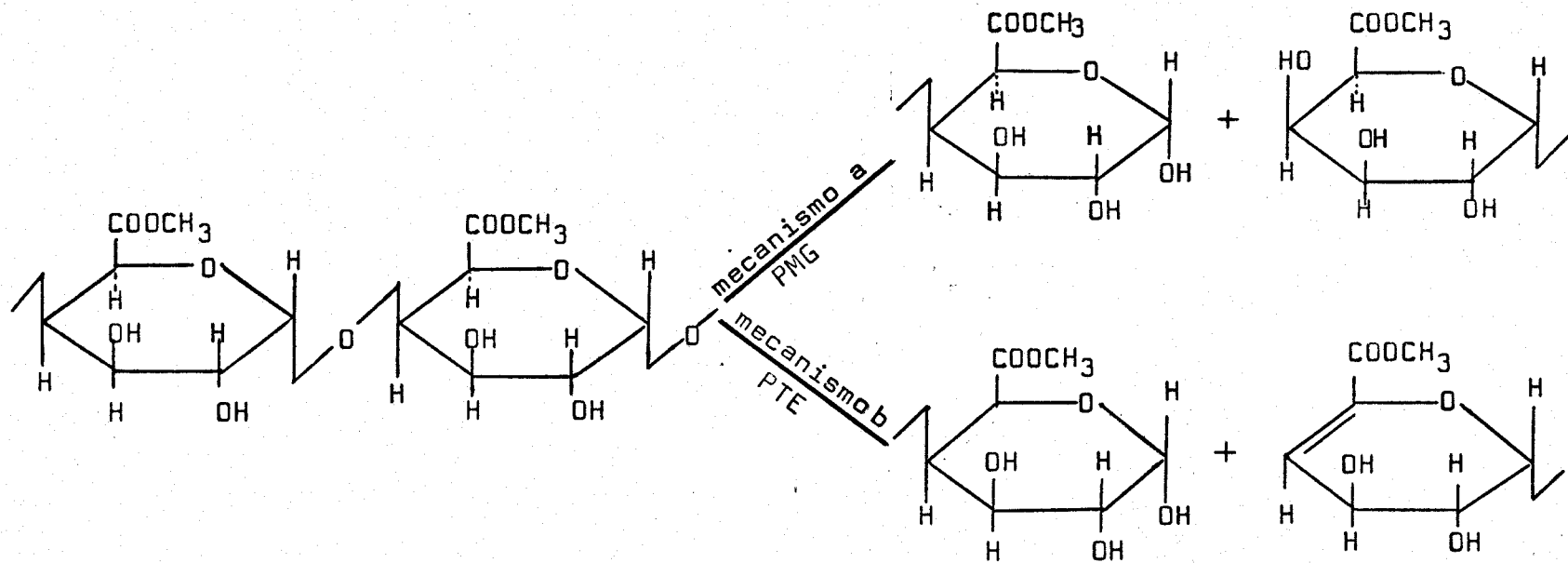
a).- El primero comprende las enzimas que saponifican la molécula rompiendo los grupos ésteres metílicos de los ácidos poligalacturónicos y su nombre genérico es el de pectin-esterasa o pectin-metil-esterasa. Actúan según el esquema siguiente:



b).- El segundo grupo lo integran las enzimas que despolimerizan las sustancias pécticas por rotura del enlace glicosídico, y se conocen con el nombre genérico de poligalacturonasas. Pueden subdividirse, a su vez, en dos clases: endo y exo. Las primeras atacan la cadena de ácido poligalacturónico al azar, y teóricamente en cualquier lugar de la misma, mientras que las exo ejercen su acción sólo en los núcleos terminales, de forma ordenada, dando lugar a monómeros y dímeros. Estas últimas son menos frecuentes en los microorganismos.

En relación con la hidrólisis producida parece que puede llevarse a cabo por dos mecanismos diferentes:

En el primer caso (mecanismo a), reciben los nombres genéricos de polimetilgalacturonasas (PMG) ó poligalacturonasas (PG) dependiendo del contenido en ésteres metílicos del sustrato sobre el que actúa. En el caso de que el mecanismo de ruptura sea el b, reciben el nombre de pectin-transeliminadas (PTE) y ácido péctico-transeliminadas (APTE), respectivamente, y dependiendo igualmente del contenido en metoxilos de la cadena de ácido poligalacturónico.



3.2.1.- Pectinesterasa.

El primer trabajo sobre estas enzimas fué publicado por Fremy en el año 1840. Desde entonces, son muy numerosas las publicaciones sobre presencia de la enzima en plantas y su modo de acción (43) (45 - 55).

Se han investigado ampliamente las obtenidas de hojas de alfalfa y tabaco, frutos cítricos, tomate y pepinillo. Así mismo se ha estudiado su presencia en la salmuera durante la fermentación de este último fruto, si bien la actividad es bastante baja, posiblemente por encontrarse en condiciones muy lejos de las óptimas (56).

Otras isoenzimas han sido aisladas procedentes de microorganismos. Así, Etchells y Bell han comprobado, sobre pectina cítrica, actividad de pectinesterasa producida por levaduras de los géneros *Endomycopsis* y *Debaryomices*, presentes en la salmuera durante la fermentación de numerosos frutos (57). Estos mismos autores, operando con distintas concentraciones de azúcares y a diferentes valores de pH (58), confirman posteriormente la existencia de desesterificación debida a la presencia de otros géneros de levaduras. Los mohos, que aparecen frecuentemente en la superficie de las salmueras durante la fermentación, son otra fuente de esta enzima (47).

La enzima de frutos está fuertemente absorbida en los componentes insolubles de los tejidos por lo que los zumos o extractos en agua solo contienen una pequeña fracción de la actividad total. Esto se aprovecha para una purificación previa de la enzima mediante lavados con agua acidulada, a valores de pH entre 3 y 4 unida-

des, que permiten separar numerosos componentes solubles del fruto, afectando muy poco la actividad enzimática. La extracción de la enzima puede llevarse a cabo con una solución salina (generalmente cloruro sódico al 10 %) ajustada a valores de pH comprendidos entre 6 y 7 unidades, condiciones en las que la enzima es muy soluble (59) (60).

Como método de purificación se emplea usualmente la diálisis frente al agua destilada, de la solución enzimática. En ausencia de sales, la enzima precipita, y esto permite su separación de otros componentes solubles en agua que no hubiesen sido eliminados en los lavados previos.

Otras formas de purificación utilizadas han sido la adsorción sobre tierras de diatomeas y la precipitación con sulfato amónico.

La determinación de actividad, basada en la medida de concentración de los productos de reacción, puede realizarse por los siguientes procedimientos:

a) Medida colorimétrica del metanol liberado en la hidrólisis de los grupos metoxilos de la pectina (61).

b) Formación de geles iónicos de pectinato cálcico, dependiendo del número de carboxilos libres, que puede utilizarse para detectar actividad enzimática en extractos, por comparación con un blanco (58).

Este método no tiene aplicación cuantitativa, y aunque presenta la ventaja de su rapidez, la actividad puede verse influenciada por la presencia de ion Ca^{++} .

c) Valoración, a pH constante, de los grupos carboxilos liberados por la acción de la enzima.

Kertesz, en 1937, utiliza ya este procedimiento para medir actividad en el jugo de tomate. El valor de pH empleado por este autor es de 6,2 unidades, zona de viraje del indicador rojo de metilo (53).

Posteriormente, la influencia del pH y el efecto de la presencia de cationes, se estudian por diversos autores (48) (49) (51) (62), que introducen una serie de modificaciones en el método original, las más importantes de las cuales se recopilan posteriormente por Rouse y Atkins (21).

Este método de valoración, que se caracteriza por su sencillez y exactitud, ha sido el más empleado en la práctica en los últimos años.

La actividad enzimática está asociada con la clarificación y gelificación de los zumos de frutas, por formación de pectinas de bajo contenido en metoxilos, con lo cual se separa el material coloidal y precipitan los sólidos insolubles que se encuentran en suspensión (63).

Bell, Etchells y Jones (56) concluyen que la actividad de pectinesterasa no está directamente relacionada con los cambios en la textura, ya que encuentran que la enzima está presente tanto en pepinillos duros como blandos. Sin embargo, podría tener una influencia indirecta, pues diversos investigadores han llegado a la conclusión de que la hidrólisis glicosídica de la cadena péctica debe ser precedida de desesterificación parcial (64) (65). Posterior-

mente al estudio de esta acción sinérgica se ha comprobado la inhibición de poligalacturonasa por altas concentraciones de pectinesterasa, si bien como estos trabajos no han sido hechos con dicha enzima purificada, la inhibición podría ser causada por sustancias extrañas que acompañen a la esterasa.

La hidrólisis de grupos metoxilos de la pectina por acción de la enzima es muy específica, habiéndose comprobado que no se hidrolizan los ésteres de glicoles y glicerina, y que otros ésteres, no galacturónicos, lo hacen a una velocidad mil veces inferior (66) (67). Así mismo, los metilglucósidos, ácido poligalacturónico sintético y el metilester del ácido α -D-galacturónico se hidrolizan más lentamente que la pectina natural (53). Sin embargo, la sal cálcica del éster metílico del tartrato es hidrolizada rápidamente por la enzima (68).

La pectinesterasa de frutos es, comparada con otras enzimas, muy resistentes al calor, siendo generalmente inactivada por encima de los 60° C, y dependiendo la desnaturalización alcanzada del valor de pH a que se encuentre. Así por ejemplo, a un valor de pH de 4 unidades la enzima se inactiva totalmente en pocos segundos (55) (69). La pectinesterasa procedente de mohos es mucho más sensible al calor.

El pH óptimo depende de la procedencia de la enzima y de la concentración y naturaleza de los cationes presentes. En general, la actividad de la enzima procedente de frutos crece con el valor de pH entre 4 y 7 unidades, siendo difícil el estudio por encima de este valor debido a la saponificación por simple reacción química que introduce un gran error en las determinaciones realiza-

das en dicha zona. Por otro lado, a valores de pH superiores a 7 unidades se produce una inactivación de la enzima, hecho que ocurre igualmente a valores de pH excesivamente bajos (70). Así, a temperatura ambiente, se desnaturaliza totalmente a un valor de pH de 2 unidades en una semana, y a un pH de 3 unidades en un mes, mientras que a un pH de 4 unidades, después de un mes a 25° C, sólo retiene un 18 % de su actividad (55). La enzima procedente de mohos tiene su pH óptimo entre 4,5 y 5 unidades.

Por lo que respecta al efecto de las sales, y en general, puede afirmarse que, en el caso de pectinesterasa de frutos, es prácticamente inactiva en ausencia de ellas. La adición de estas hace descender el pH óptimo, y el rango de actividad a regiones más bajas de pH. Sin embargo, para valores comprendidos entre 7 y 8 unidades las sales no parecen tener ningún efecto sobre la actividad de dichas enzimas (54) (59) (71).

Con cationes divalentes la activación máxima, a pH 6, ocurre para una concentración de sal alrededor de 0,03 M. Para cationes monovalentes, se consigue una activación máxima cuando la concentración de sal es alrededor de 0,1 M, pero la actividad no se elimina para concentraciones más altas (49). La activación es tanto más importante cuanto más bajo sea el pH.

Por el contrario, la pectinesterasa de mohos es activa en ausencia de sales y su actividad se ve muy poco influenciada por la concentración de las mismas o no cambia en absoluto, como indican McColloch y Kertesz (54).

La enzima es muy resistente a los agentes químicos pero es inhibida por los detergentes sintéticos, del tipo laurilsulfatosó-

dico y alkilarilsulfato, a bajas concentraciones. La pectinestera-
sa de hongos es mucho más resistente a estos agentes que la enzi-
ma de plantas superiores.

Se ha comprobado que la irradiación gamma activa la pectineste-
rasa y acelera la degradación de pectinas en fresas (72), naranjas
(73) (74), manzanas (75) y papayas (76).

El desarrollo de la actividad de pectinestera-
sa difiere de unas frutas a otras; así, mientras en bananas (36) y tomates (77)
se encuentra un incremento con la madurez, en el mango (37) dismi-
nuye la actividad con ésta.

3.2.2.- Poligalacturonasa.

En el año 1921 Paton (78) demuestra la presencia de poliga-
lacturonasa en el polen de azucena. Posteriormente Kertesz (45)
la encuentra en el tomate maduro, mientras que en el verde obtie-
ne resultados negativos, y McDonnell y cols. (49) realizan medi-
das de actividad, determinando el incremento en grupos reductores
liberados por el método del hipoyodito de Willstater-Schudel.

Matus (79) cita hasta sesenta y seis fuentes distintas de po-
ligalacturonasas, si bien, en su opinión, no todas son dignas de
confianza, dada la diversidad de procedimientos empleados por los
diferentes autores. En los pepinillos (80) se ha encontrado acti-
vidad enzimática tanto en el extracto de semilla seca como en los
estambres y pistilos, y en los frutos maduros, cuyo valor de pH
es aproximadamente 4,4 unidades. Por el contrario, los frutos ver-
des (con un valor de pH de alrededor de 6,1 unidades) no muestran
actividad. En este mismo trabajo se confirma que la cantidad de
enzima en el tomate se incrementa con la maduración.

Se han publicado igualmente numerosos trabajos sobre poligalacturonasas procedentes de mohos (64) (81 - 88), que son similares a las encontradas en las salmueras de diversos frutos fermentados y se ha relacionado el ablandamiento de melocotones en conserva con la presencia en su jugo de enzimas pectinolíticas, resistentes al calor, producidas por mohos de los géneros *Rhizopus* y *Gilbertella* (89) (90),

Ciertas especies de levaduras (91) (92) (93) presentan igualmente actividad enzimática, si bien parece que el mecanismo de acción es diferente, Demain y Phaff (94), y Roelefsen (95) realizan investigaciones para caracterizar estas enzimas. Estudios similares sobre diversas especies de levaduras fermentativas y oxidativas han sido realizados por Bell y Etehells (58) y en distintas especies del género *Bacillus* por Nertje y Vaughn (96), Vaughn y cols. (97) y Karbassi (98). Se ha demostrado también actividad pectinolítica, entre otras bacterias, en las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (99) y *Erwinia* (100),

En cuanto a la extracción de la enzima, los métodos empleados por los diversos autores, si bien son ligeras variantes, son muy similares al descrito por Hills y Mottern (51) para la pectinesterasa. Así, para tomates y pepinillos, se congelan los frutos a -10° C, y posteriormente, una vez parcialmente descongelados, se mezclan con cantidades variables de cloruro sódico al 2 %, ajustando el valor de pH a 6,0 unidades con hidróxido sódico 1 N. Los extractos se conservan bajo tolueno a 5° C. Otras partes de la planta se extraen sin congelación previa,

Phaff y Joslyn (43) recopilan cinco métodos para medir la actividad de poligalacturonasa:

1º.- Incremento en sustancias reductoras. Este procedimiento, estudiado por Jansen y McDonnell (64) da buenos resultados para altas concentraciones de enzima pero no es suficientemente sensible para la medida de actividad en salmueras cuando el aumento de poder reductor es muy pequeño.

2º.- Disminución del precipitado obtenido como pectato cálcico. Una vez saponificada la pectina, la ausencia de precipitado con el ion Ca^{++} indica la presencia de poligalacturonasa. Este método es útil para determinaciones cualitativas (58) (86).

3º.- Disminución del precipitado obtenido con alcohol (101).

4º.- Disminución de la rotación óptica (102).

5º.- Disminución de la viscosidad de una solución de pectina (56) (103) (104).

Los cuatro primeros requieren que se produzca una fuerte hidrólisis de enlaces glicosídicos en un intervalo de tiempo relativamente corto, mientras que el último método descrito es mucho más sensible, y por tanto más útil para estudiar la actividad en fermentaciones en las que la hidrólisis es lenta.

Factores tales como concentración, temperatura, tiempo de incubación, presencia de cloruro sódico y de pectinesterasa, tienen una gran influencia en las medidas de viscosidad, y por tanto deben tenerse muy en cuenta al normalizar el método de medida empleado.

Entre otros métodos de purificación, se han empleado la floculación en el punto isoeléctrico y cromatografía en gel (105), la cromatografía en columna con ácido pèctico modificado (106),

la precipitación con sulfato amónico seguida por cromatografía de intercambio iónico y filtración a través de gel (107), y la precipitación con rivanol y electroforesis en gel (108).

En cuanto al valor de pH óptimo para la actividad de la enzima poligalacturonasa, en las salmueras de pepinillos se encuentra alrededor de 4 unidades (43) (56) (79) (84), análogo al del tomate maduro (49).

Sin embargo, para las poligalacturonasas de bacterias presenta dicho valor óptimo alrededor de 7 unidades, mientras que, para los mohos ofrecen una mayor variabilidad; así en el caso de *Monilinia fructicola* (109) se ha demostrado la existencia de dos endopolimetilgalacturonasas con la máxima actividad a valores de pH de 4,5-5,0 y 7,5 respectivamente.

La presencia de algunos cloruros, a baja concentración, activa la acción de la poligalacturonasa (84), mientras que las grandes concentraciones de sal pueden inactivarla o precipitarla (56). La temperatura óptima de actividad parece estar alrededor de los 30° C.

La poligalacturonasa, cuando está suficientemente purificada, es muy resistente a diversos agentes químicos como el ácido yodoacético, cloruro mercuríco, azida sódica, fluoruro sódico, arseniato amónico y anhídrido sulfuroso que tienen poco ó ningún efecto sobre su actividad.

Jansen y cols. (82) comprueban la inhibición de la poligalacturonasa en presencia de altos niveles de pectinesterasa y lo atribuyen a proteínas acompañantes; otros autores, que confirman estos

resultados, afirman que pueden deberse a la formación de un gel consistente con los iones polivalentes presentes (56). Sin embargo, las investigaciones de mayor interés dirigidas a conseguir la inhibición de la poligalacturonasa son las realizadas para aislar sustancias naturales que, por su inocuidad, puedan añadirse como conservantes en las salmueras de fermentación. Así, Bell y Etchells (110) demuestran que la fracción soluble de la hoja de vid inhibe la actividad celulolítica y pectinolítica en la fermentación de pepinillos y, puesto que el inhibidor evita la degradación de la cadena péctica, encuentran una proporcionalidad entre su concentración y la textura.

Por otro lado, el extracto de la hoja de vid no afecta a las bacterias lácticas implicadas en la fermentación y los pepinillos, desalados y manufacturados, fueron aceptables para el panel. Encuentran que se consigue una extracción más completa del inhibidor con hojas frescas o heladas mientras que secas, calentadas a 45 - 48° C durante 40 horas, pierden gran parte de su actividad. Cuando se realiza una precipitación con acetona existe inhibición tanto por la fracción sobrenadante como por el precipitado lo que sugiere la presencia de más de un inhibidor.

Este inhibidor no es ni un carbohidrato ni una proteína y tiene elevado peso molecular ya que es estable al calor, álcali, ácidos diluidos, agentes precipitantes de proteínas como el tricloroacético y no es dializado por celofán o colodión frente a agua o buffers diluidos.

En un trabajo posterior (111) encuentran que el polvo separado para análisis de taninos retiene toda la actividad y en un estudio más detallado de la diálisis confirman que el mayor por-

centaje de material activo no se dializa y sólo una pequeña fracción de la actividad se encuentra en el dializado. Para una concentración de 4,8 mg/ml, correspondiente a 0,3 mg/ml de tanino, se consigue una inhibición del 95 %. La adsorción con Amberlita IRA - 410 (OH^-) separa todos los compuestos inhibidores pero la elución con hidróxido amónico seguida de desionización con Dowex 50 (H^+) produce una solución oscura, con fuerte reacción de polifenoles con cloruro férrico, que sólo retiene aproximadamente un 25 % del poder inhibidor original.

Por filtración en Sephadex G - 50, los extractos de la hoja de vid, cuando se representan como actividad de las fracciones como inhibidores, dan cinco ó seis picos de elución y las pruebas realizadas con cloruro férrico indican que existe una estrecha relación entre la concentración de polifenoles y la inhibición. Concluyen, que puesto que estos inhibidores de la hoja de parra, que son activos también para celulosa, se eluyen de forma relativamente rápida sus pesos moleculares deben de ser bastantes altos.

También en los extractos del forraje procedente de plantas del género *Sericea* (112) se ha demostrado la existencia de inhibidores que deben poseer naturaleza polifenólica pues la acción de polifenol-oxidasa suprime la inhibición; estos inhibidores, que precipitan con cafeína, gelatina y sulfato de nicotina, son efectivos con poligalacturonasas de diversas fuentes (113).

En semillas de algodón, Hunter (114) demuestra la relación que existe entre el contenido polifenólico y la resistencia a la infección por mohos y comprueba que los extractos obtenidos con estas semillas inhiben la poligalacturonasa proporcionalmente a

su concentración en compuestos fenólicos.

También en las hojas de vid se ha relacionado la cantidad de ortodihidroxifenoles presentes con la resistencia que muestran a la infección por *Gloeosporium ampelophagum* y se ha demostrado que dichos polifenoles, a bajas concentraciones, inhiben las enzimas pectinolíticas (115).

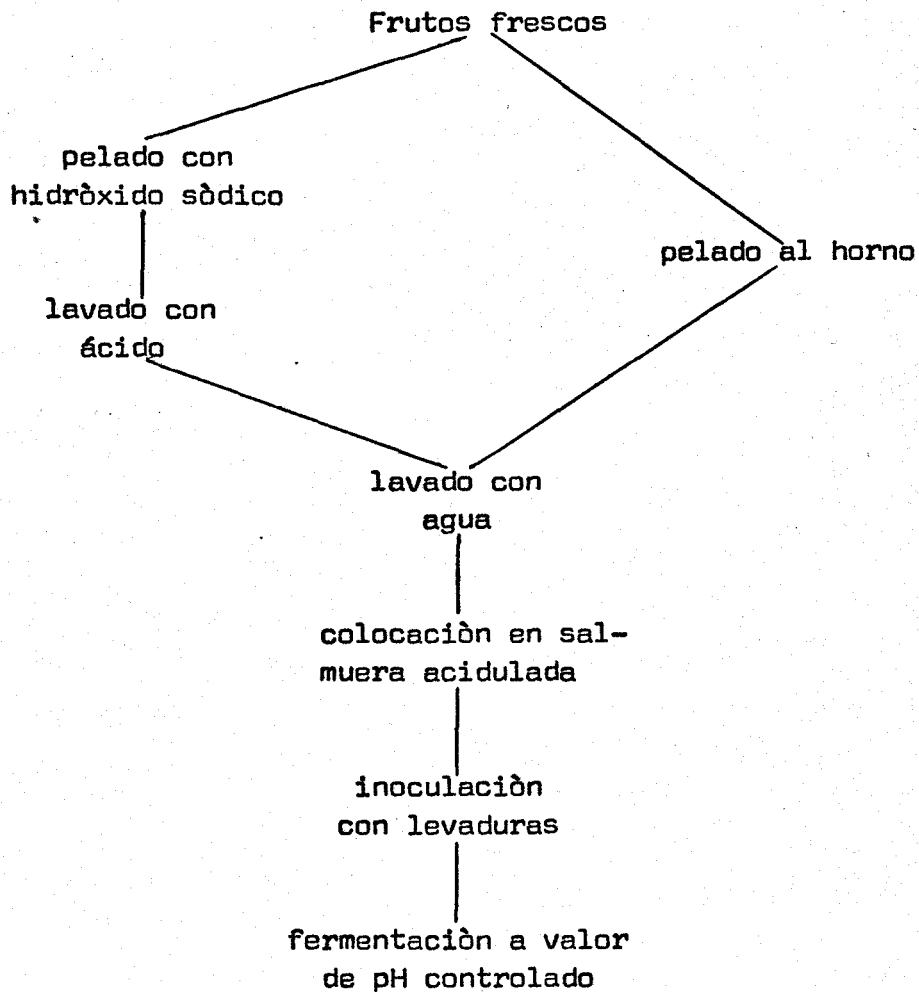
Recientemente, Pilnik y cols. (116) en una interesante comunicación estudian la especificidad y mecanismo de reacción de estas enzimas y Mueller (117) publica una revisión de algunas de sus aplicaciones en la que se discute la clarificación de jugos, el aprovechamiento de frutos y el ablandamiento de los tejidos en el prensado en frío de aceitunas.

4.- TECNICA EXPERIMENTAL

4.1.- Materia prima empleada.

4.1.1.- Pimientos.

Para las diferentes experiencias se emplean tanto frutos frescos como elaborados para el relleno de aceitunas verdes aderezadas al estilo español o sevillano. Para dicha elaboración se utilizan dos métodos, A y B, que difieren entre sí únicamente en el procedimiento de pelado previo y que pueden resumirse en el esquema siguiente:



En el método A, realizado totalmente en el laboratorio, los pimientos se introducen, para el pelado, en una solución acuosa de hidróxido sódico al 12 %, calentada a una temperatura que oscila, según las distintas experiencias, entre 68 y 75° C, con tiempos de inmersión variables, respectivamente, entre 4,0 y 2,5 minutos.

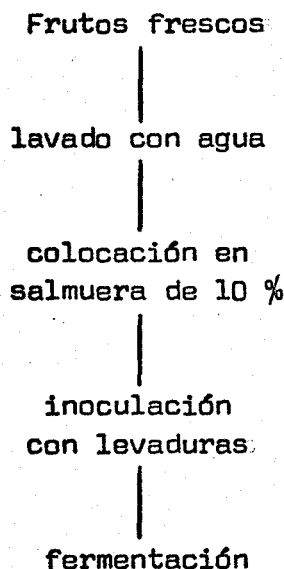
Al término del tratamiento alcalino, los frutos se lavan con agua acidulada con ácido láctico al 1 % durante corto tiempo para detener la acción de la lejía, se enjuagan posteriormente con agua, liberándolos mecánicamente de pedúnculos y semillas, y se colocan en salmuera del 12 - 13 % de cloruro sódico, acidulada con láctico hasta un valor de pH en el equilibrio de 3,4 a 3,6 unidades, dentro de fermentadores de cloruro de polivinilo, con capacidad para unos cuatro kilos de fruto, provistos de dispositivos adecuados para toma de muestras, reposición de salmuera y con cierre hidráulico para evitar la formación de velos superficiales de levaduras (11) (12) (118).

A continuación, se inoculan con un 2,5 % de cultivo de levaduras de diversas especies previamente aisladas y clasificadas de la flora naturalmente presente en salmueras de pimientos (118) (119); se incuban a 20 - 25° C, produciéndose una fermentación a pH controlado que comunica al pimiento las características organolépticas adecuadas para su consumo.

En el método B, el pelado de los frutos en horno, a llama directa de fuel oil, se realiza en la industria, trasladándose inmediatamente los pimientos pelados y lavados con agua al laboratorio para las operaciones posteriores de colocación en salmuera, inoculación y fermentación en las mismas condiciones que para el método A.

4.1.2.- Aceitunas.

Experiencias análogas se han realizado con aceitunas de la variedad Hojiblanca madura, empleándose tanto los frutos frescos como los procedentes de la elaboración como aceitunas negras al natural en salmuera (3), para lo cual se ha utilizado el mismo tipo de fermentadores, operando según el esquema siguiente:



4.2.- Preparación de las muestras.

4.2.1.- Obtención de residuos secos para la determinación de pectinas.

Para preparar los residuos secos se ha utilizado el método descrito por Gee, McComb y McCready (25) en el que se introducen algunas modificaciones para adaptarlo a los productos ensayados:

A una muestra de 400 g de frutos, previamente troceados, se le añaden tres volúmenes de etanol del 95 %. Esto ayuda a inactivar las enzimas, deshidrata parcialmente, y extrae las sustancias solubles de la pulpa. Después de dejar la muestra al menos una hora con

este tratamiento inicial se decanta, mezclando las porciones de pulpa en un triturador eléctrico con aproximadamente dos volúmenes de etanol acidificado (750 ml de etanol del 95%, 200 ml de agua destilada y 50 ml de HCl concentrado), agitando vigorosamente durante una hora y filtrando. Se mezcla el residuo con dos volúmenes de alcohol del 70%; se filtra nuevamente y se repite este tratamiento de mezcla y lavado hasta que el filtrado dé reacción negativa de cloruros con nitrato de plata. A continuación, se lava la pulpa, libre de cloruros, con dos volúmenes de acetona y se repite este tratamiento hasta que el líquido de lavado sea totalmente incoloro, dejando finalmente secar el residuo a temperatura ambiente.

Para los filtrados se utiliza papel de gran porosidad, empleando uno distinto en cada lavado, ya que, en caso contrario, la operación se hace extremadamente lenta por la naturaleza del material estudiado.

4.2.2.- Extractos de pectinesterasa.

Para el estudio de la actividad de pectinesterasa en el pimiento las soluciones enzimáticas se han preparado por el procedimiento seguido por otros autores para investigar la enzima del limón y del tomate (21) (120).

Para la extracción, cien gramos de pulpa, previamente lavados con agua acidulada con ácido clorhídrico, se maceran durante 24 horas en 200 ml de solución de cloruro sódico al 10 %.

En la aceituna madura, dada la compleja composición del fruto, la determinación de actividad enzimática en extractos preparados de forma semejante a los de limón, tomate o pimiento, con diferentes tiempos de extracción (6, 24, 48 horas), con aceituna prensada o

troceada y en alpechín, no dá resultados reproducibles, posiblemente debido a la presencia de compuestos que no se eliminan en el lavado previo y cuya hidrólisis interfiere la medida.

Para subsanar esta dificultad, 50 g de frutos deshuesados se prensan, se someten a un lavado con agua acidulada y a continuación a rápidos lavados con acetona. Después de repetir el lavado inicial con agua acidulada, se extrae finalmente con 100 ml de solución de cloruro sódico al 10 % durante 24 horas.

4.2.3.- Extractos de poligalacturonasa.

A partir de los pimientos, las soluciones de la enzima pueden obtenerse, sin dificultad, por extracción directa con cloruro sódico al 2 %, tal como describen otros autores para diversos frutos.

Sin embargo la extracción directa de aceitunas deshuesadas con cloruro sódico al 2 % no permite obtener soluciones activas de la enzima. Se ha intentado una purificación por lavados previos con acetona de modo análogo a como se hace para pectinesterasa pero los resultados han sido negativos ya que la poligalacturonasa parece ser mucho más sensible a la desnaturalización por este disolvente. Mejores resultados se han obtenido realizando la extracción tras sucesivos lavados con agua destilada si bien esta operación se ve aún dificultada por la gran concentración de lípidos del fruto. Para evitar esto, el método finalmente utilizado para la preparación de extractos de poligalacturonasa en la aceituna consiste en lo siguiente:

Cincuenta gramos de fruto deshuesado se prensan previamente para eliminar el alpechín y el aceite; a continuación, se tritura dicho prensado, lavándolo en un embudo varias veces con agua des-

tilada. Finalizados los lavados, el residuo se extrae con 100 ml de cloruro sódico al 2 % durante 24 horas y las medidas de actividad se realizan sobre estos extractos filtrados.

4.3.- Metodología.

4.3.1.- Sustancias pépticas.

4.3.1.1.- Sustancias pépticas totales por el método del carbazol (20).

- Reactivos.

- Solución Versene.- Disolver 5 g de la sal tetrasódica del ácido etilen-diamino-tetracético desecado en un litro de solución.

- Acido acético.- Glacial, grado reactivo.

- Acido sulfúrico.- Concentrado, grado reactivo.

- Alcohol etílico.- Al 95 %, grado reactivo.

- Alcohol etílico purificado.- Poner a reflujo un litro de alcohol etílico del 95 % con 4 g de Zn en polvo y 4 ml de SO_4H_2 (1:1) durante 24 horas. Destilar, usando todos los aparatos de vidrio. Agregar 4 g de Zn en polvo e hidróxido potásico al alcohol destilado y volver a destilar.

- Reactivo de carbazol.- Disolver 0,10 g de carbazol (de grado reactivo) en 100 ml de alcohol etílico purificado. La disolución es lenta y es necesario agitar.

- Acido galacturónico monohidratado.- (Grado reactivo). Comprobar la pureza, valorando 0,5 g del ácido con NaOH 0,1 N hasta un valor de pH de 8 unidades. El peso teórico de la fórmula del ácido galacturónico hidratado es 212.

- Pectinasa.- Schuchardt, grado reactivo.

- Extracción de sustancias pécticas con Versene-pectinasa.

Pesar 1,0 g de muestra seca libre de azúcar, preparada según la técnica anteriormente descrita, conteniendo de 10 a 40 % de pectinas (expresadas como ácido anhidro-urónico) en un vaso de 250 ml y humedeciendo con alcohol etílico del 95 %. Acomplejar los cationes divalentes con 200 ml de solución Versene al 0,5 %. Ajustar el pH a 11,5 unidades, con NaOH 1 N y saponificar las pectinas y pectinatos, manteniendo la mezcla a 25° C durante 30 minutos y acidificando posteriormente hasta pH 5,0 - 5,5 con ácido acético. Agregar 0,1 g de pectinasa, agitar durante una hora, diluir a 250 ml y filtrar. Despreciar los primeros mililitros del filtrado, diluir 2 ml a 100 ml y tomar 2 ml para el análisis.

- Determinación colorimétrica de ácido anhidro-galacturónico.

Poner 12,0 ml de SO_4H_2 concentrado, en un tubo de ensayo de 27 x 230 mm. Enfriar el tubo y su contenido en un baño de hielo alrededor de 3° C, y añadir los 2 ml de la solución obtenida anteriormente que contiene de 5 a 80 microgramos de ácido galacturónico saponificado. Mezclar el contenido homogeneamente mediante agitación manual. Colocar otra vez el tubo en el baño de hielo y enfriar por debajo de 5° C. Calentar el tubo y su contenido durante 10 minutos en un baño de agua hirviente. Enfriar alrededor de 20° C, añadir 1,0 ml de reactivo de carbazol al 0,10 %, mezclar homogeneamente, dejarlo estar a la temperatura ambiente durante treinta minutos, y determinar dentro de los quince minutos siguientes la intensidad de color usando la longitud de onda de 520 nm.

Analizar la serie de muestras, de manera que el tiempo y la temperatura, a partir de la adición del carbazol para la determinación de color, sean lo más reproductibles posible.

Usar una curva standard para obtener la concentración de ácido anhidrogalacturónico en las muestras y para controlar las variaciones diariamente, incluir con cada serie de muestras un patrón de 40 microgramos de ácido galacturónico hidratado (33,2 microgramos de ácido anhidrogalacturónico). La reproductibilidad tiene un error de un 2 % aproximadamente.

Si bien el método original recomienda usar solución de carbazol al 0,15 %, en este trabajo hemos elegido la concentración del 0,10 % por dar un margen más amplio de estabilidad de color (121).

4.3.1.2.- Método de valoración funcional (25).

- Acidez libre.

Añadir a 1,00 g de pasta seca 5 ml de etanol, 100 ml de agua y 1 g de NaCl, homogeneizando la suspensión seguidamente, durante treinta minutos, utilizando un agitador magnético, al objeto de facilitar la valoración posterior de la mezcla. Añadir 6 gotas de indicador Hinton (3 volúmenes de rojo de fenol al 0,4 %, 1 volumen de azul de bromotimol al 0,4 % y 1 volumen de rojo de cresol al 0,4 % con 1 volumen de agua destilada) y valorar con NaOH 0,1 N, agitando vigorosamente hasta color magenta, punto final que debe mantenerse un minuto. El número de mililitros de NaOH consumidos multiplicados por la normalidad es igual a los miliequivalentes de los grupos carboxilos libres por g de pasta.

- Esteres totales.

Añadir 10 ml de NaOH 0,5 N a ésta suspensión neutralizada y dejar reposar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente para saponificar los grupos ésteres. Añadir 10 ml de ClH 0,5 N y valorar la pasta, agitando energicamente, con NaOH 0,1 N en presencia de indicador Hinton hasta alcanzar un color magenta que debe mantenerse durante un minuto. El valor obtenido expresado en ml y previamente corregido mediante un ensayo en blanco para las diferencias en los reactivos 0,5 N, se multiplica por la normalidad del hidróxido sódico obteniéndose así los miliequivalentes de ésteres saponificados por g de pasta.

- Alcalinidad de las cenizas.

Se pesa en balanza de precisión alrededor de un gramo de residuo seco de pectina y se calcina en un crisol a una temperatura de 500 - 550° C. Recoger las cenizas obtenidas con agua destilada, calentando si es necesario. Añadir 10 ml de solución normal de ácido sulfúrico. Una parte del ácido se neutraliza por las bases de las cenizas y el exceso se valora con sosa 0,2 normal utilizando como indicador verde de bromocresol.

4.3.1.3.- Determinación de acetilos (26).

- Reactivos.

- Hidróxido sódico.- Disolver 9,4 g de NaOH de grado reactivo en 100 ml de agua destilada.

- Clorhidrato de hidroxilamina.- Disolver 3,75 g de clorhidrato de hidroxilamina, reactivo para análisis, en 100 ml de agua destilada.

- Perclorato férrico.- Disolver 1,93 g de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en 5 ml de HCl concentrado, añadir 5 ml de ácido perclórico al 70 % y evaporar la solución casi a sequedad. Diluir a 100 ml con agua destilada para usar como solución madre. Esta solución, cuando se conserva en el refrigerador, es estable hasta un mínimo de un mes. Añadir 8,3 ml de ácido perclórico del 70 % a 60 ml de solución patrón de perclorato férrico. Enfriar en hielo y llevar a 500 ml con metanol absoluto de grado reactivo. Esta solución es estable hasta un mínimo de una semana a temperatura ambiente.

En la mezcla, manipulación y almacenamiento de todos los reactivos que contienen ácido perclórico, deben observarse las máximas precauciones.

- Solución ácida de metanol.- Enfriar 35 ml de ácido perclórico del 70 % y llevarlo a 500 ml con metanol absoluto frío de grado reactivo.

- Glucosa penta-acetato standard.- Pesar 108,9 mg de β -D-glucosa pentacetato pura cristalina y disolver por calentamiento suave en 5 ml de alcohol etílico, llevando hasta 100 ml con agua destilada. Tomar fracciones de 2, 4, 5 y 7 ml de dicha solución y llevar a 50 ml con agua destilada: 5 ml de esta solución diluida acuosa representan 120, 240, 300 y 420 γ de acetilo respectivamente. Preparar un blanco usando 5 ml de agua destilada y utilizando para ajustar en el colorímetro el 100 % de transmitancia. La curva patrón obtenida, representando las lecturas del galvanómetro frente a la concentración de acetilos, es lineal entre 0 y 500 γ .

- Método.

Pesar en un vaso de 100 ml una muestra de 0,25 g de la pasta seca utilizada en el método de valoración, que contiene aproximadamente de 2 a 11 mg de acetilo. Añadir 25 ml de solución de hidroxilamina, homogeneizando la mezcla durante algunos minutos con un agitador magnético. Añadir lentamente a continuación 25 ml de solución de hidróxido sódico, agitando de 15 a 30 minutos más para conseguir la disolución del material péctico presente. Filtrar a través de papel de gran porosidad y pipetear exactamente 2 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml. Añadir 5 ml de agua destilada y 5 ml de metanol ácido, agitando vigorosamente. Llevar a volumen añadiendo solución de perclorato férrico en pequeñas porciones, agitando bien después de cada adición.

Después de 5 minutos separar el precipitado del complejo férrico de pectina-ácido hidroxámico por filtración de la solución a través de un papel de filtro Whatman 12, directamente dentro del tubo del colorímetro. Determinar la intensidad del color, usando una longitud de onda de 520 nm.

Preparar paralelamente un blanco, en otro matraz aforado de 25 ml mezclando 5 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de NaOH. Agitar enérgicamente, dejar reposar de 2 a 3 minutos, y añadir 1 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina. Añadir a continuación el metanol acidificado y perclorato férrico de la misma forma que con las soluciones problema.

4.3.1.4.- Cálculo del grado de esterificación.

En primer lugar, reducir todos los resultados a miliequivalentes por g de pasta.

Peso equivalente del ácido anhidrouónico (AAU) = 176

Carboxilos esterificados AAU = Esteres totales - acetilos.

Carboxilos totales AAU = Carboxilos libres + Carboxilos esterificados.

$$\% \text{ AAU} = \frac{176 \cdot 100 \cdot \text{Carboxilos totales AAU}}{1000}$$

$$\% \text{ esterificación} = \frac{\text{Carboxilos esterificados AAU} \cdot 100}{\text{Carboxilos totales AAU}}$$

4.3.1.5.- Influencia de diversos factores en la aplicación del método del carbazol.

En general, los procedimientos del carbazol y de valoración coinciden dentro de una variabilidad razonable para productos naturales. No obstante, se observa una tendencia a obtener valores casi siempre superiores en el método del carbazol, por lo que se ha creído necesario profundizar en las posibles fuentes de error de este método.

- Variaciones en el coeficiente angular de la curva patrón.

Se consideró de interés realizar un estudio sobre el efecto que las distintas marcas comerciales de sulfúrico podían tener sobre la curva patrón. Para esta experiencia se utilizan diez curvas patrón obtenidas con diferentes frascos de tres firmas comerciales A, B y C. Las correspondientes a cada uno de ellos

se identifican por un número correlativo, empleándose un segundo guarismo para las muestras sucesivas utilizadas del frasco C - 4.

En principio se dedujo la necesidad de calcular la correlación y la ecuación de regresión para las distintas líneas obtenidas.

En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos y de su observación se deduce la buena correlación existente para los valores de cada curva, lo cual significa el buen cumplimiento de la ley de Beer para cada caso en particular. En relación con las líneas de regresión, éstas presentan unos coeficientes angulares con ligeras variaciones que, aunque pequeñas, podrían afectar sensiblemente a la aplicación del método en cuestión.

Por tanto se decidió representar dichas líneas y el gráfico 1 (logaritmo de la transmitancia frente a concentración de ácido anhidrogalacturónico) muestra las variaciones de pendiente que se observan no ya entre distintas marcas de sulfúrico, lo cual era de esperar, sino entre los distintos frascos correspondientes a una misma casa comercial.

A la vista de estos resultados se decidió realizar el estudio estadístico correspondiente al conjunto formado por las 48 muestras correspondientes a cuatro experiencias realizadas en distintos días, todas ellas con sulfúrico del mismo frasco, al objeto de ver si existen diferencias significativas entre ellas.

En la Tabla II se presentan los valores de las variantes estudiadas. La primera columna indica la concentración empleada; la segunda, tercera, cuarta y quinta columna corresponden a las medidas, por duplicado y por fecha, de transmitancia efectuadas en el Spectronic 20 para cada una de las curvas.

TABLA I

Líneas de regresión y coeficientes de correlación correspondientes a las curvas patrón obtenidas con diferentes marcas y frascos de sulfúrico.

<u>Sulfúrico</u>	<u>Línea de regresión</u>	<u>Coefficiente de correlación</u>
A - 1	$y = 1,54543 - 0,00358 x$	$r = - 0,99488$
B - 1	$y = 1,92773 - 0,00312 x$	$r = - 0,99773$
B - 2	$y = 1,93522 - 0,00378 x$	$r = - 0,99100$
C - 1	$y = 1,93453 - 0,00497 x$	$r = - 0,99984$
C - 2	$y = 1,94103 - 0,00453 x$	$r = - 0,99805$
C - 3	$y = 1,92394 - 0,00545 x$	$r = - 0,99823$
C - 4 - 1	$y = 1,90228 - 0,00464 x$	$r = - 0,99641$
C - 4 - 2	$y = 1,92518 - 0,00368 x$	$r = - 0,99896$
C - 4 - 3	$y = 1,95458 - 0,00400 x$	$r = - 0,99282$
C - 4 - 4	$y = 1,95468 - 0,00425 x$	$r = - 0,98766$

GRAFICO 1.-Variaciones en el coeficiente angular de la curva patrón.

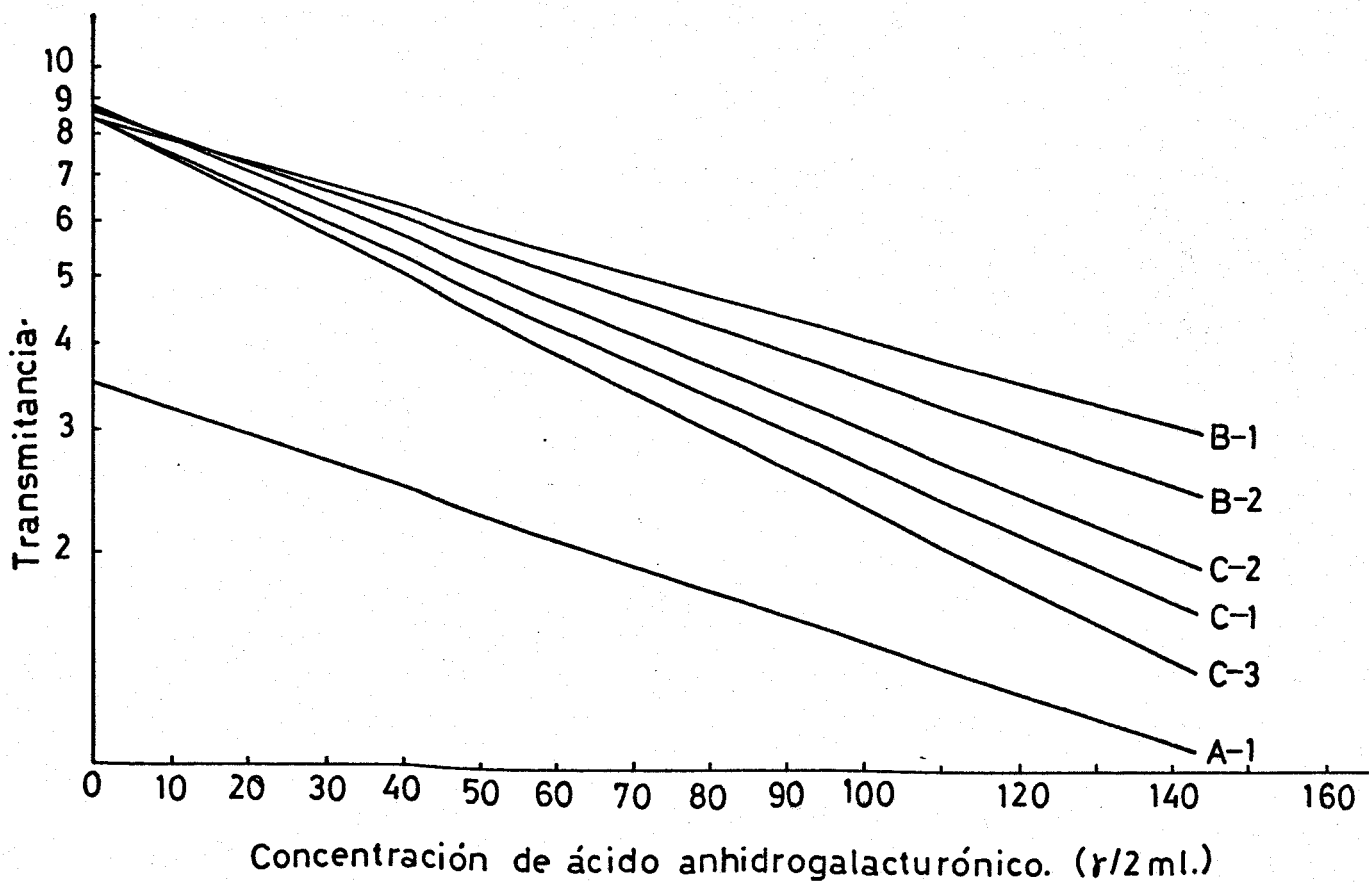


TABLA II

Valores de transmitancia correspondientes a las curvas patrón realizadas en fechas sucesivas con un mismo frasco de sulfúrico.

<u>Concentración</u> AAU (γ /2 ml)	<u>Fecha</u>			
	<u>20-2-74</u>	<u>21-2-74</u>	<u>27-2-74</u>	<u>28-2-74</u>
	<u>Curva 1</u>	<u>Curva 2</u>	<u>Curva 3</u>	<u>Curva 4</u>
80	33,0 - 34,5	42,0 - 43,0	40,5 - 42,0	37,0 - 40,0
60	41,0 - 41,5	51,0 - 51,5	55,5 - 53,0	53,0 - 54,0
40	58,5 - 50,5	62,0 - 58,0	62,0 - 66,0	62,0 - 65,0
16	66,0 - 70,0	72,5 - 73,0	78,5 - 77,5	76,0 - 77,0
8	69,0 - 72,5	76,5 - 78,0	81,5 - 80,5	82,5 - 80,0
4	79,0 - 75,0	82,5 - 83,0	87,5 - 86,5	86,5 - 85,0

Realizadas las operaciones oportunas, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III. De su observación se deduce una marcada y significativa diferencia entre las distintas experiencias, no encontrándose interacción significativa entre concentraciones y experiencias.

Para estudiar el error que cometeríamos al haber tomado como patrón una de estas líneas al azar y posteriormente medir el problema trazando una paralela por el punto correspondiente al blanco de 40% según indican los autores del método, elegimos para calcular el error máximo las dos líneas de coeficiente angulares extremos. Se toma como patrón la curva 1 y por el punto correspondiente a 40% se traza una paralela a la curva 2 estudiándose las diferencias para un valor dado de transmitancia entre dicha paralela y la curva 1 (gráfico 2). Los resultados obtenidos para intervalos de transmitancia de 10 en 10 unidades referidos a % de error se dan en la Tabla IV.

De todo lo expuesto se deduce que el método es perfectamente aplicable siempre que las determinaciones se realicen el mismo día que la curva patrón. Sin embargo, la dificultad que entraña la realización de una experiencia en que se efectúen simultáneamente un número elevado de muestras y la curva patrón, hace necesario la simplificación del método, mediante el trazado de la paralela por el correspondiente blanco.

En la zona comprendida entre concentraciones aproximadas de 30 a 60% , como puede observarse en la Tabla IV, el error cometido está dentro de unos límites aceptables de $\pm 10\%$ aproximadamente. Fuera de esta zona el error aumenta muy significativamente, sobre todo para bajas concentraciones.

TABLA III

Análisis de la varianza de las distintas experiencias con un mismo frasco de sulfúrico.

<u>Origen varianza</u>	<u>Sumas cuadrados</u>	<u>Grados libertad</u>	<u>Cuadrados medios</u>	<u>F</u>	<u>Sig.</u>
Concentración (C)	11800,88	5	2360,176	606,73	P <<< 0,01
Experiencias (E)	795,69	3	265,230	68,18	P <<< 0,01
Interacción C x E	91,81	15	6,12	,1,57	P >> 0,05
Error residual (replicados)	93,37	24	3,89		

GRAFICO 2.- Cálculo del error máximo.

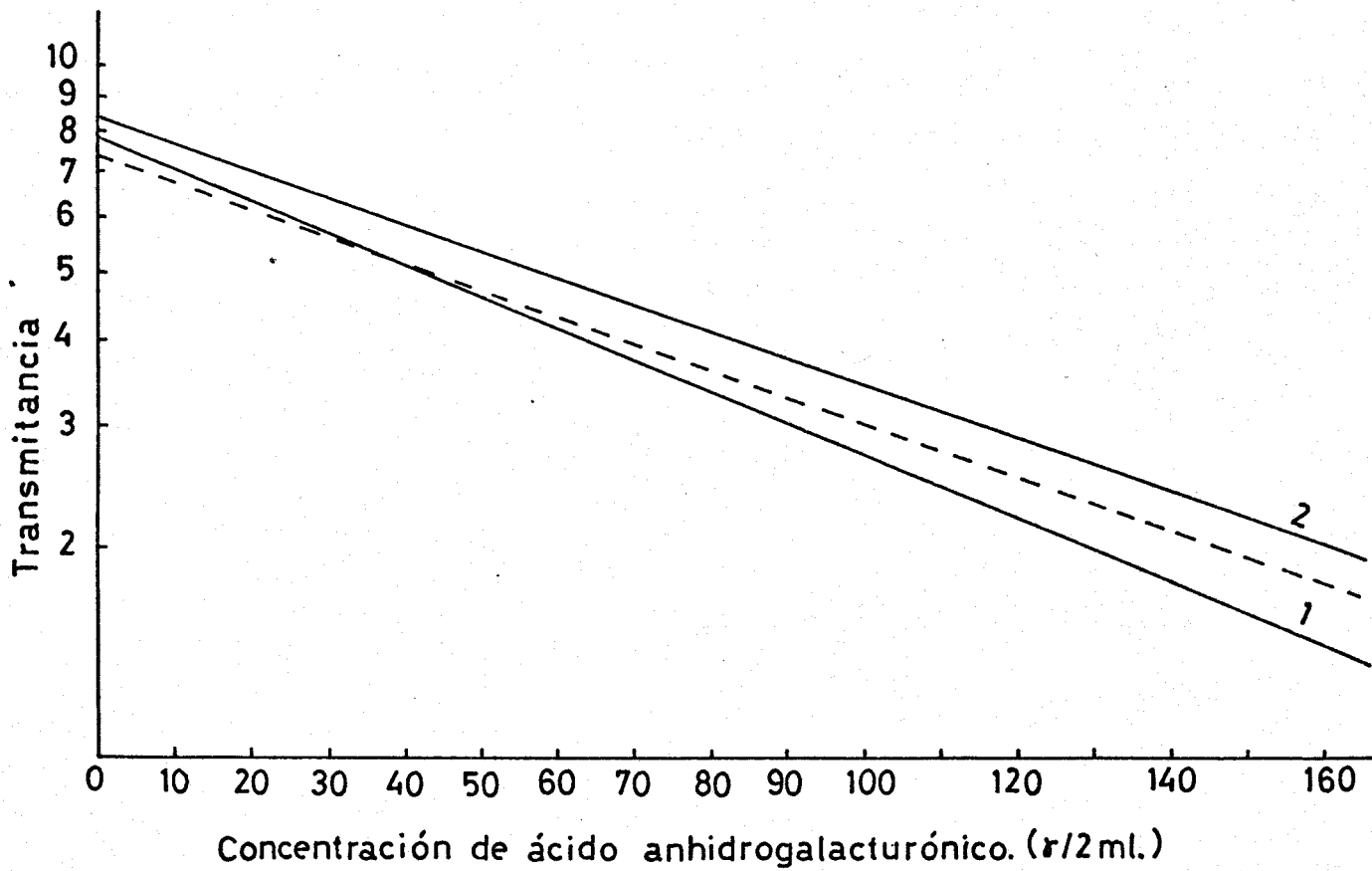


TABLA IV

Comparación entre las dos curvas realizadas con el mismo frasco de sulfúrico con coeficientes angulares extremos.

Transmitancia (%)	Concentración AAU (γ / 2 ml)		Error (%)
	<u>encontrado</u>	<u>real</u>	
70	11	6	41,7
60	26	23	11,6
50	43	43	0
40	64	68	- 6,3
30	91	101	- 11,1
20	129	146	- 17,0

Para evitar la realización sistemática de la curva patrón, y ceñirse al intervalo de menor error, parece ser por tanto aconsejable una toma de muestra tal, que dé transmitancias correspondientes a la zona de concentraciones antes mencionadas.

- Presencia de carbohidratos liberados en la hidrólisis.

La aplicación de estos razonamientos a los productos naturales objeto de nuestra investigación en unos casos corrige totalmente las diferencias existentes entre ambos métodos, pero en otros, éstas siguen existiendo aunque las condiciones de trabajo sean las más exigentes para evitar al máximo la introducción de errores.

Según Keijbets y Pilnik (122) la presencia de azúcares neutros en la cadena de pectina de la patata explica que los valores encontrados por el método de carbazol puedan ser hasta un 20 % superiores a los obtenidos por valoración.

Las sustancias pécticas al ser polisacáridos heterogéneos, según Pilnik y Voragen (30) pueden contener azúcares neutros ligados por enlace covalente a la cadena principal de galacturano en ramificaciones laterales o dentro de dicha cadena principal. Al realizar la extracción pectinolítica dichos azúcares neutros se solubilizan junto con el ácido galacturónico y aunque la reacción del carbazol se considera específica para este ácido, pueden reaccionar bajo las condiciones de la prueba, dando lugar a errores que representan para glucosa y galactosa, según Keijbets y Pilnik, respecto al ácido galacturónico, un exceso del 1 al 10 %.

Por todo ello, se consideró necesario investigar si en la solución tratada con pectinasa existían o no azúcares neutros.

La presencia de éstos se puso de manifiesto mediante la técnica de cromatografía descendente en cubeta de vidrio utilizando como líquido de desarrollo la mezcla acetona-butanol-agua (2:7:1). Se emplean tiras de papel de 28 x 60 cm poniendo manchas de la solución problema y como referencia muestras patrones de glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, fructosa, manitol, sacarosa y anhidro-urónico. El tiempo de desarrollo fué de 48 horas y como revelador, se empleó reactivo de α -naftol (123) para detectar las manchas de fructosa y disacáridos, y solución de nitrato de plata en acetona (124) para las pentosas y hexosas. En los extractos obtenidos se observó la presencia de disacáridos y entre las hexosas, glucosa y galactosa.

Una vez confirmada la presencia de azúcares, ensayamos el método del carbazol en combinación con la técnica del fenol-sulfúrico (125), indicada por Keijbets, específica para la detección de azúcares y así, poder corregir la interferencia de éstos en el contenido de ácido anhidrogalacturónico comparándose dichos resultados con los obtenidos por el método de valoración.

En la técnica del fenol-sulfúrico (125) de Dubois y col., se pipetea 2 ml de la solución problema en un tubo colorimétrico de diámetro interior entre 16 y 20 mm, añadiéndosele seguidamente 1 ml de solución de fenol al 5 % en agua y 5 ml de SO_4H_2 concentrado, añadidos rápida y directamente al tubo de ensayo para obtener una buena mezcla. Se espera 10 minutos y posteriormente se agitan y sumergen los tubos en baño maría a 25 - 30° C durante 15 minutos. Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y otros derivados, incluyendo los metil ésteres con grupos reductores libres, desarrollan un color amarillo-naranja que es estable durante varias horas,

mediéndose la absorbancia a 490 nm.

Teniendo en cuenta que la finalidad de esta experiencia complementaria es comprobar únicamente que la presencia de azúcares es otro de los factores que induce a error en la estimación de ácido galacturónico por el método del carbazol, si bien los azúcares procedentes de la hidrólisis del material péctico son diversos, como se demuestra por los resultados de la cromatografía en papel efectuada sobre los extractos, hemos considerado, para simplificar, a todos ellos como glucosa que es uno de los presentes en mayor cantidad. Lógicamente, para realizar la corrección exacta de los valores sería necesaria la estimación cuantitativa en cada caso de todos y cada uno de los azúcares presentes.

La forma de operar es la siguiente:

Se preparan por quintuplicado soluciones patrón de glucosa (GLU) y ácido anhidrouurónico (AAU), a cuatro concentraciones diferentes, obteniéndose las curvas correspondientes para cada una de ellas por los métodos del carbazol y del fenol-sulfúrico.

Calculadas las correspondientes líneas de regresión se obtienen las absorbancias específicas (b) para los dos productos mencionados en ambas longitudes de onda:

$$b_{AAU\ 520} = 0,0047$$

$$b_{GLU\ 520} = 0,0004$$

$$b_{AAU\ 490} = 0,0014$$

$$b_{GLU\ 490} = 0,0048$$

Al ser las absorbancias (A) aditivas, para una determinada longitud de onda, la solución del sistema de ecuaciones:

$$A_{520} = b_{AAU\ 520} C_{AAU} + b_{GLU\ 520} C_{GLU}$$

$$A_{490} = b_{AAU\ 490} C_{AAU} + b_{GLU\ 490} C_{GLU}$$

permite calcular la concentración (C_{AAU}) de ácido anhidrouónico corregida para la concentración de glucosa presente (C_{GLU}).

$$C_{AAU} = 109,1 A_{520} - 9,1 A_{490}$$

Al utilizar en el pimiento la corrección del método del fenol-sulfúrico para el del carbazol se consigue evidentemente una mejor aproximación a los resultados obtenidos por el procedimiento de valoración. En la Tabla V se presenta un ejemplo típico de dos muestras de pimientos (1 y 2) en las que se aplican directamente los dos métodos en estudio, valoración y carbazol, obteniéndose valores bastante discordantes entre sí. Sin embargo, en las muestras 3 y 4, de composición muy similar a las anteriores, al usar la corrección de azúcares indicada, los resultados obtenidos para ambos procedimientos son perfectamente aceptables.

En el caso de las aceitunas, la aplicación práctica y rutinaria de esta corrección al método del carbazol resultaría mucho más complicada, debido a la complejidad encontrada en la mezcla de azúcares liberados en la hidrólisis, razón que explica el hecho de que, para este producto natural, las discrepancias sean mayores entre los dos métodos empleados en este estudio.

4.3.2.- Actividad pectinolítica.

4.3.2.1.- Actividad de pectinesterasa.

TABLA V

Contenido del pimiento en ácido anhidrouónico (% residuo seco)
según los distintos métodos ensayados.

<u>Muestra</u>	<u>Valoración</u>	<u>Carbazol</u>
1	24,37	28,73
2	22,75	26,97
3	24,04	25,27*
4	23,37	23,10*

* valores corregidos por el método del fenol-sulfúrico.

El procedimiento empleado para la medida de actividad de pectinesterasa en los frutos es una adaptación de los procedimientos propuestos por Rouse y Atkins (21) y Kertesz (120).

- Reactivos.

- Solución al 1 % de pectina en cloruro sódico 0,2 M.- Disolver 11,7 g de NaCl en unos 200 ml de agua destilada y añadir lentamente, con agitación, 10 g de pectina en polvo (con una riqueza mínima del 9 % en metoxilos), con adiciones intermitentes de agua, hasta llevar finalmente la solución a un litro. Añadir de 4 a 6 gotas de tolueno a la solución y conservar en el refrigerador entre 4,5 y 10° C para evitar toda actividad microbiana, teniendo la precaución de que alcance la temperatura ambiente antes de utilizarla como sustrato en la determinación de actividad de pectinesterasa.

- NaOH 0,5 N.- 20 g de NaOH y completar hasta 1 litro con agua destilada.

- NaOH 0,05 N.- 2 g de NaOH y completar hasta 1 litro con agua destilada.

- Determinación de pectinesterasa.

En un vaso de 150 ml poner 50 ml del sustrato, llevar la solución con NaOH 0,5 N hasta un valor de pH próximo al de medida de la actividad, añadir cuidadosamente con una pipeta de 1 a 5 ml de la solución enzimática y mezclar mecánicamente sustrato y enzima, ajustando rápidamente la solución con NaOH 0,05 N al pH de medida.

Se realiza entonces la valoración a pH constante con esta última solución de hidróxido sódico mediante un equipo de titulación automático Metrohm, modelo 3 D, provisto de registrador.

El tiempo de reacción es de treinta minutos, a una temperatura de alrededor de 30° C, y comienza en el momento en que se alcanza el pH elegido para la valoración.

Los blancos se preparan añadiendo al sustrato el mismo volumen de solución enzimática, previamente hervida durante diez minutos, procediéndose a continuación de manera análoga a la ya indicada anteriormente.

Las unidades de pectinesterasa, (u. PE) ml, representan el número de miliequivalentes hidrolizados por minuto y mililitro de solución enzimática, multiplicados por el factor 10^4 para facilidad de interpretación, y se obtienen por la fórmula:

$$(u. PE) ml = \frac{ml \text{ NaOH consumidos} \times \text{normalidad} \times 10^4}{ml \text{ solución enzimática} \times 30 \text{ minutos}}$$

4.3.2.2.- Actividad de poligalacturonasa.

El método empleado en los frutos consiste en la medida del cambio de viscosidad de una solución de pectina y ha sido utilizado por diversos autores para determinación de actividad de poligalacturonasa de otras procedencias.

- Reactivos.

- Buffer cítrico/citrato 0,5 N.- Preparar soluciones de ácido cítrico 0,5 N y citrato sódico 0,5 N y mezclar hasta alcanzar el valor de pH deseado. Este tampón puede utilizarse desde un valor de pH de 3,5 hasta 6,2 unidades.

- Buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 0,2 M.- Preparar soluciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,2 M y PO_4HNa_2 0,2 M mezclando ambas hasta el pH de medida. La zona tampón está situada entre valores de pH de 5,7 y 8,0 unidades.

Solución de pectina al 2%. - Poner en un vaso de precipitado una cantidad de la solución tampón que sea aproximadamente la mitad del volumen final deseado, añadiendo poco a poco, con agitación magnética, la cantidad de pectina exactamente pesada. Completar hasta el volumen final y dejar en agitación hasta asegurarse de la uniformidad de la solución, comprobando antes de utilizar ésta que no ocluye burbujas de aire. Para la conservación de la solución, inhibir el desarrollo microbiano con unas gotas de tolueno.

- Medida de la viscosidad.

Para su medida se utiliza un viscosímetro capilar, de vidrio, de los denominados de Ostwald, introducido en un baño termostático de dimensiones adecuadas y paredes transparentes para su observación. El líquido problema, contenido en el viscosímetro, no debe situarse durante todo el curso de la operación a una distancia inferior a 2 cm del nivel superior del líquido del termostato o del fondo del baño. El cronómetro utilizado está graduado en divisiones de 0,2 segundos.

Para el calibrado se ha utilizado una solución de sacarosa al 60 %, determinándose el tiempo de flujo, en ningún caso inferior a 200 segundos y calculándose la constante por la fórmula:

$$\text{Constante} = \frac{\text{Viscosidad cinemática (cSt)}}{\text{Tiempo de flujo (seg.)}}$$

Para el ensayo de la actividad de la poligalacturonasa, en matraces erlenmeyer de 50 ml se mezclan con agitación 5 ml del extracto enzimático con 25 ml de la solución de pectina al 2 %. A continuación se añaden unas gotas de tolueno para inhibir el desarrollo microbiano, se cierran y se incuban a 30° C durante 72 horas. El blanco se prepara adicionando a 25 ml de la solución de pectina 5 ml del extracto previamente calentado a 80° C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

La actividad se expresa como descenso relativo de la viscosidad del extracto activo (A) respecto al blanco (B), con lo cual el error debido a la hidrólisis queda compensado:

$$\% \text{ Descenso en viscosidad} = \frac{\text{Viscosidad B} - \text{Viscosidad A}}{\text{Viscosidad B}} \times 100$$

Para la puesta a punto del método se ha realizado una curva patrón con una poligalacturonasa comercial. Los valores medios se recogen en la Tabla VI, representándose en el Gráfico 3 la actividad frente a concentración de poligalacturonasa.

Puede observarse que la relación entre la concentración de enzima y el descenso en viscosidad no es lineal. La sensibilidad del método es mayor aproximadamente hasta 6 μ g/ml de la enzima.

Para comprobar el efecto del cloruro sódico se ha ensayado la actividad enzimática de una solución que contiene 2 μ g/ml de poligalacturonasa con distintas concentraciones de la sal y los resultados obtenidos se recopilan en la Tabla VII.

El cloruro sódico que incrementa la viscosidad de la solución de pectina, inhibe la acción de la poligalacturonasa patrón emplea-

TABLA VI

Variación de la actividad de PG en función de la concentración de la enzima.

<u>Concentración de poligalacturonasa (μg/ml)</u>	<u>Viscosidad muestra (cSt)</u>	<u>Viscosidad blanco (cSt)</u>	<u>Descenso %</u>
2	14,82	19,71	24,83
6	10,76	20,36	47,14
10	9,47	20,59	54,01

GRAFICO 3.- Variación de la actividad de P.G. en función de la concentración de la enzima.

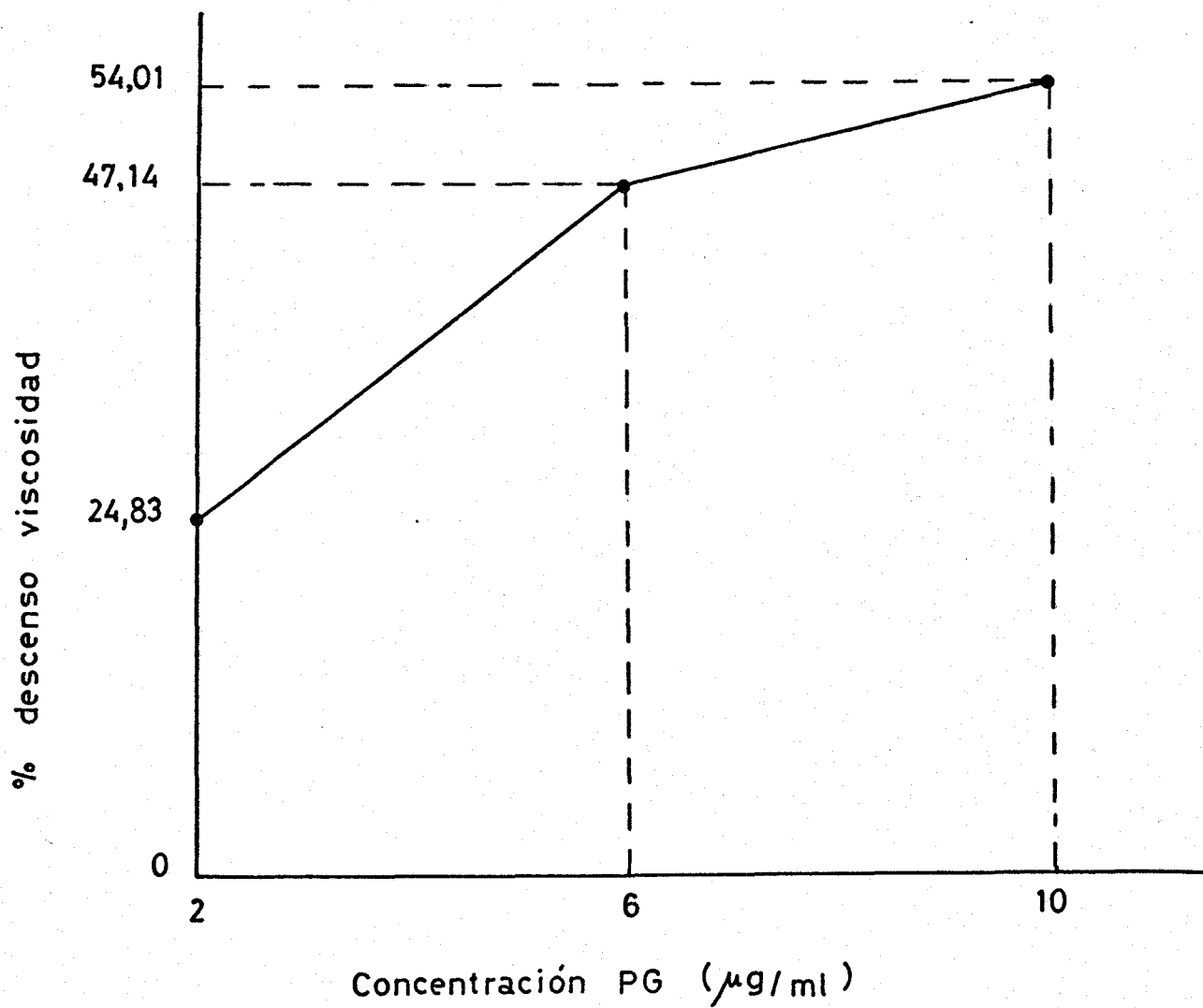


TABLA VII

Influencia del cloruro sódico sobre la actividad de PG

<u>Concentración cloruro sódico %</u>	<u>Viscosidad muestra (cSt)</u>	<u>Viscosidad blanco (cSt)</u>	<u>Descenso %</u>
0	14,82	19,71	24,83
6	30,92	33,60	7,98
8	35,79	36,71	2,51
10	36,60	37,10	1,34
12	39,42	39,46	0,09

da. Estos resultados se representan en el Gráfico 4.

También el pH tiene una importante influencia tanto en la viscosidad de la solución de pectina como en la actividad de la poligalacturonasa empleada, descendiendo ambas con el incremento del valor de pH desde 3,5 a 6,0 unidades, como puede comprobarse en la Tabla VIII y Gráfico 5.

De estos ensayos se deduce la gran importancia de mantener unas condiciones exactamente reproducibles en cuanto se refiera a concentración de cloruro sódico y valores de pH que afectan tanto a la viscosidad de la solución de pectina como a la actividad de la enzima.

Una importante interferencia del método, en algunos estudios, estriba en la presencia en los extractos de poligalacturonasa, de pectinesterasa que, al actuar sobre la pectina desesterificándola, tiene una acción gelificante. Bell y col. (56) utilizan para eliminar esta acción una incubación previa del extracto enzimático a 40° C durante un periodo de tiempo de 24 a 48 horas. Sin embargo, se ha comprobado que este procedimiento sólo es válido cuando la actividad de pectinesterasa es moderada pero no cuando la concentración de esta enzima en el extracto es muy elevada.

Por las razones que anteceden, en la fase de alta actividad de pectinesterasa el estudio se ha limitado al intervalo de pH inferior a 6,0 unidades, lejos del óptimo de esta enzima, realizándose la caracterización del valor de pH óptimo de la enzima poligalacturonasa en aquella fase del proceso de maduración del fruto en que la presencia de pectinesterasa es mínima.

GRAFICO 4.-Efecto del cloruro sódico sobre la actividad de PG.

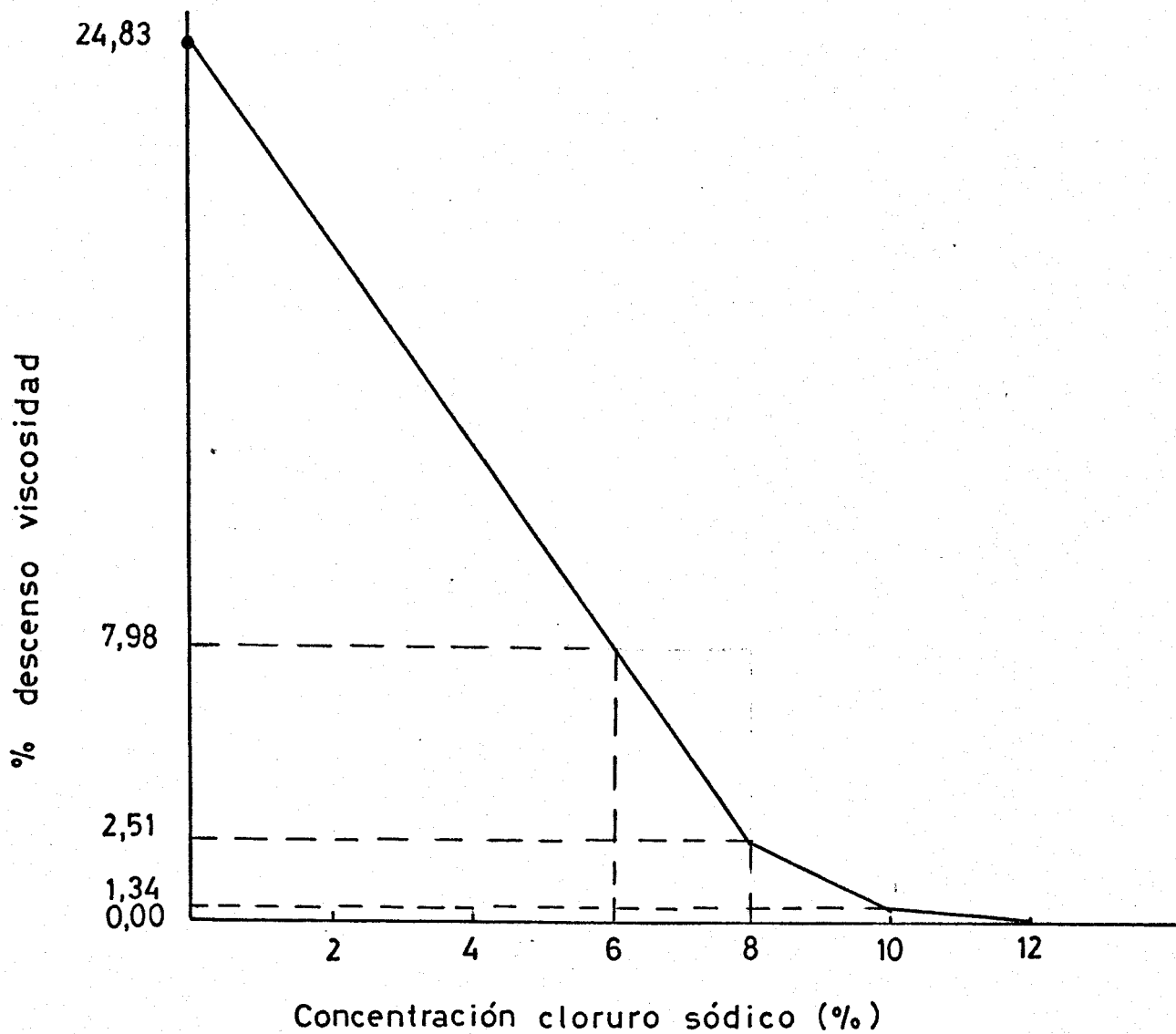
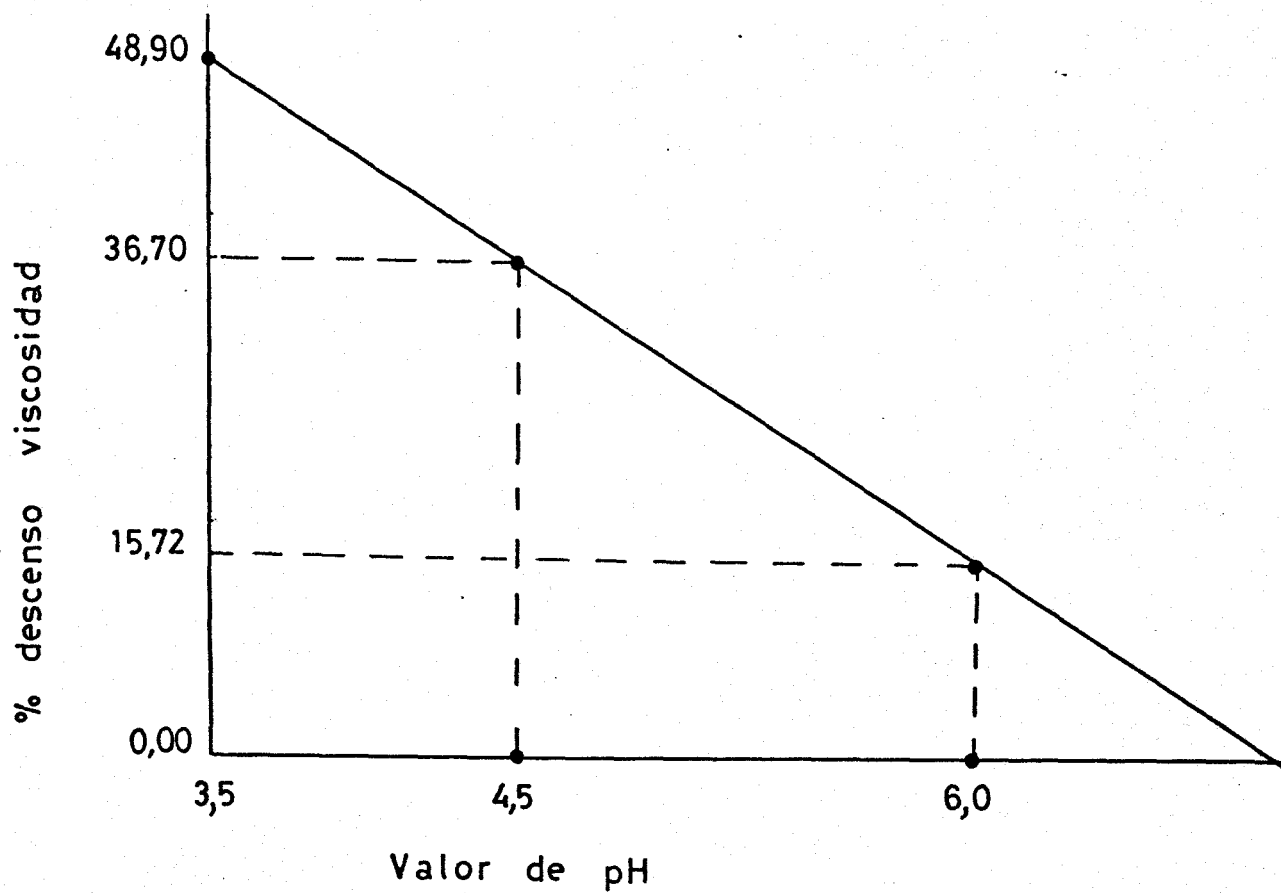


TABLA VIII

Efecto del valor de pH sobre la actividad de PG.

<u>pH</u>	<u>Viscosidad muestra (cSt)</u>	<u>Viscosidad blanco (cSt)</u>	<u>Descenso %</u>
3,50	11,39	22,29	48,90
4,50	13,86	21,90	36,70
6,0	13,39	15,89	15,72

GRAFICO 5.-Efecto del valor de pH sobre la actividad de P.G.



4.3.2.3.- Detección de pectinesterasa y poligalacturonasa producidas por levaduras por formación de geles de pectato cálcico.

Para estudiar la posible producción de enzimas pectinolíticas por levaduras, se ha utilizado un medio de cultivo semejante al descrito por Bell y Etchells para su uso en la detección de pectinesterasa y poligalacturonasa producidas por dichos microorganismos presentes en la fermentación de pepinillos (58), el cual se prepara con la siguiente composición:

Pectina de alta esterificación.....	0,50 %
Peptona.....	0,50 %
Cloruro sódico.....	0,50 %
Extracto de levadura.....	0,25 %
Glucosa.....	0,20 %

Este medio se ajusta con ácido tartárico a dos valores de pH diferentes, de 3,5 y 5,0 unidades, respectivamente; se distribuye en tubos de ensayo de 25 x 200 mm, conteniendo cada uno de ellos 40 ml y se esteriliza a media atmósfera durante 15 minutos, condiciones en las que el efecto del calor sobre la pectina presente en el medio de cultivo es mínimo, según los autores citados. Posteriormente se inoculan, una vez fríos, con las especies de levaduras que se estudian, desarrolladas en agar-infusión de levadura-glucosa durante ocho días.

Transcurridos treinta días desde la inoculación se toman aproximadamente cinco mililitros del medio y se añaden unas gotas de solución concentrada de cloruro cálcico. En caso de resultar el ensayo positivo para pectinesterasa, la desesterificación consiguiente de la pectina hace que, se forme un gel consistente de pectato cálcico.

Cuando no hay formación de gel después de adicionado el cloruro cálcico, la adición de unas gotas de solución de hidróxido sódico cataliza la saponificación de la pectina y provoca la inmediata aparición de gel. Si esto no ocurre, los microorganismos inoculados son productores de poligalacturonasa, que actua durante la incubación degradando las cadenas pécticas, y en consecuencia no se forma el gel de pectato tras la adición del hidróxido sódico.

4.3.2.4.- Medida de poligalacturonasa producida por bacterias mediante formación de halo en geles pécticos.

Para detectar la producción de poligalacturonasa por bacterias presentes en la aceituna se ha adaptado el método seguido po Nagel y Vaughn (126) para la caracterización de la enzima producida por *Bacillus polymyxa*:

Medio basal para el desarrollo de bacterias. Se prepara de la forma siguiente:

KH_2PO_4	0,10 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 %
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 %
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,50 %
Extracto de levadura.....	0,25 %

Como fuente de carbono se añade pectina al 3 % que, según los autores antes mencionados, es más eficaz como inductor en la síntesis de poligalacturonasa que los ácidos péctico y anhidrohurónico.

Para la preparación del medio, se disuelven en un vaso de precipitado todas las sales en la mitad del volumen final de agua destilada, añadiendo a continuación poco a poco con agitación magnéti-

ca la pectina hasta que la homogeneización sea completa. Posteriormente, se ajusta con hidróxido sódico concentrado a un valor de pH de 7,0 unidades, se lleva al volumen deseado, se distribuye en botes, se inoculan éstos con un 1 % (v/v) de cultivo en crecimiento activo y se incuban a 30° durante 15 días.

- Medida de actividad de poligalacturonasa.

Con el caldo metabólico obtenido tras este periodo de incubación, y una vez separadas las células por centrifugación en frío, se realiza el ensayo de formación de halo en un medio sólido de la siguiente composición:

Acido péctico	1 %
Agar lavado	1 %
CaCl ₂	0,001 M
Glicina	0,100 M

Para su preparación, se disuelven el cloruro cálcico y la glicina en un volumen aproximadamente igual a la mitad del final y se adiciona el ácido péctico con agitación; se ajusta la solución con NaOH 1 N a un valor de pH de 9,0 unidades, se añade el agar y finalmente se lleva a volumen con agua destilada.

El medio así preparado se esteriliza en corriente de vapor durante diez minutos, se deja enfriar en baño maría hasta 60° C aproximadamente, y se distribuye en placas Petri (unos 15 ml en cada una) dejándolo solidificar. A continuación, se mantienen las placas a temperatura ambiente durante un mínimo de 2 - 3 horas para asegurarse de que el medio adquiere la consistencia adecuada.

Con la ayuda de un taladratapones se realiza en cada placa una oquedad, de unos 10 - 12 mm de diámetro, colocando en la misma 0,5 ml del caldo metabólico, obtenido por centrifugación del cultivo, e incubando en estufa a 30° C durante 12 - 15 horas.

Posteriormente, se cubre la superficie de las placas con ácido clorhídrico 5 N, retirándolo al cabo de unos minutos. La aparición de un halo alrededor de la oquedad indica la presencia de poligalacturonasa, pudiendo servir el diámetro de dicho halo como medida semicuantitativa de su actividad.

5.- RESULTADOS.

5.1.- Composición péctica.

En un estudio preliminar se ha investigado el contenido en pectinas totales del pimiento y la aceituna hojiblanca madura por los métodos anteriormente descritos del carbazol y valoración. En la Tabla IX se incluyen los valores medios obtenidos para el pimiento crudo, pelado y elaborado por fermentación y para la aceituna hojiblanca madura, antes y después de su preparación como aceituna negra al natural en salmuera. Los resultados muestran el porcentaje de residuo seco obtenido y el de pectinas, expresado como ácido anhídrouónico, tanto en dicho residuo como en el fruto utilizado.

De su observación puede deducirse que, si bien ambos procedimientos muestran en general una buena concordancia teniendo en cuenta la variabilidad en la composición de productos naturales, existe la tendencia a obtener valores más altos por el método de carbazol, cuyas causas han sido previamente analizadas en el apartado 4.3.1.5.

Por estas razones, en sucesivas campañas se presentan los resultados obtenidos por el método de valoración que, por otra parte, presenta la ventaja de una más completa información sobre la composición de las pectinas presentes en el fruto.

5.1.1.- Pimientos.

Establecido inicialmente el contenido en pectinas se ha continuado durante dos campañas las investigaciones dirigidas a profundizar en la composición péctica y las variaciones que dicha composición experimenta durante el proceso de pelado, fermentación y conservación, en lo que respecta a contenido en ácido anhídrouónico, grado de esterificación y porcentaje de acetilos.

TABLA IX

Porcentajes de residuo seco obtenido y % de pectinas (como ácido anhidrouónico) en dicho residuo y en los frutos.

Producto utilizado	% residuo seco	% ácido anhidrouónico			
		Residuo seco		Producto	
		Valoración	Carbazol	Valoración	Carbazol
Pimiento crudo, pulpa	1,15	27,17	30,71	0,31	0,35
" " piel	1,46	24,40	22,13	0,36	0,32
" " total	2,61	25,62	25,91	0,67	0,67
Pimiento pelado	1,36	29,39	31,54	0,40	0,43
Pimiento elaborado	1,82	24,62	30,35	0,45	0,55
Aceituna madura, pulpa	1,72	8,08	13,45	0,14	0,23
" " piel	2,13	7,59	10,30	0,16	0,22
" " total	3,85	7,81	11,71	0,30	0,45
Aceituna elaborada	5,50	8,55	11,41	0,47	0,63

A continuación se dan los valores correspondientes a los análisis de pectinas obtenidos en los pimientos antes y después del pelado, realizándose esta última operación bien por tratamiento alcalino con solución de hidróxido sódico (Tabla X), bien mediante el método tradicional en horno rotatorio a fuego directo (Tabla XI).

A pesar de que las operaciones de pelado se realizaron en tres fechas sucesivas en cada campaña, para así poder tener datos de fruto fresco en distintos estados de madurez, la textura (9) osciló entre límites muy pequeños en la primera de ellas (Tabla X) para poder hacer una gradación y correlacionarla con el contenido en ácido anhidrouónico. No obstante, en la siguiente campaña (Tabla XI) en que los frutos presentan un rango algo superior en textura puede observarse una correspondencia entre el gradual decrecimiento de ésta, y los descensos que presentan los porcentajes tanto de ácido anhidrouónico referido al producto, como de residuo seco.

El grado de esterificación se mantiene, en general, prácticamente del mismo orden, incluso después de haber sufrido el pimiento el proceso de pelado, y el porcentaje de acetilos, para la materia prima tiende a disminuir con la pérdida de textura.

Los frutos pelados se colocan en los fermentadores de laboratorio (12 en total para cada campaña) y se elaboran como ha sido descrito en el apartado 4.1.1. Una vez fermentados dichos frutos y después de ocho meses de conservación, se realiza un análisis de pectinas cuyos valores medios, unidos a los valores obtenidos previamente para el pimiento crudo y pelado, se dan en la Tabla XII. En ella se observa que los porcentajes de ácido anhidrouónico, referidos a residuo seco, al ser todos ellos comparables entre sí, pue-

TABLA X.

Contenido y composición p ctica de pimientos. Fruto fresco y pelado con álcali. Campaña 1973-74

Muestra	Textura (Kg/100g)	% residuo seco	% Acido anhidrouónico		% grupos carboxilos esterificados	% acetilos (en residuo seco)
			Residuo seco	Producto		
Pulpa 1	335,8	0,97	20,37	0,195	60,80	1,78
Pulpa 2	333,2	0,56	21,52	0,110	67,65	1,62
Pulpa 3	339,8	0,80	18,86	0,115	50,23	1,62
Piel 1	-	1,37	14,54	0,195	62,82	1,36
Piel 2	-	1,18	14,64	0,175	62,00	1,12
Piel 3	-	1,08	19,23	0,210	66,00	1,23
Pelado 1	184,7	1,25	18,93	0,235	63,94	1,80
Pelado 2	169,9	0,81	11,17	0,090 *	72,47	1,61
Pelado 3	204,0	1,00	18,18	0,185	55,50	1,92

* El bajo contenido en ácido anhidrouónico de esta muestra se debe a un excesivo tratamiento alcalino durante el pelado.

TABLA XI

Contenido y composición péctica de pimientos. Fruto fresco y pelado a fuego directo. Campaña 1974 - 75.

<u>Muestra</u>	<u>Textura (Kg/100g)</u>	<u>% residuo seco</u>	<u>% Acido anhidrouónico</u>		<u>% grupos carboxilos esterificados</u>	<u>% acetilos (en residuo seco)</u>
			<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>		
Pulpa 1	370,4	1,02	25,12	0,256	68,98	1,86
Pulpa 2	339,8	0,95	24,29	0,231	73,15	1,74
Pulpa 3	285,0	0,79	26,65	0,211	68,38	1,69
Piel 1	-	1,32	15,17	0,200	69,70	1,08
Piel 2	-	0,98	14,37	0,141	74,87	1,14
Piel 3	-	0,89	19,13	0,170	70,60	1,08
Pelado 1	149,0	1,55	24,50	0,380	60,62	1,92
Pelado 2	155,0	1,27	19,68	0,250	74,41	1,56
Pelado 3	154,0	1,25	24,36	0,310	68,14	1,74

TABLA XII

Contenido y composición péctica de pimientos. Valores medios para los frutos en las tres fases de elaboración.

<u>Muestra</u>	<u>Textura (Kg/100g)</u>	<u>% residuo seco</u>	<u>% Acido anhidrouónico</u>		<u>% grupos carboxilos esterificados</u>	<u>% acetilos (en residuo seco)</u>
			<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>		
Campaña 1973 - 74						
Crudo	336,26	0,78	20,25	0,153	59,56	1,67
Pelado	186,19	1,02	16,09	0,170	63,97	1,77
Fermentado	151,62	1,37	17,41	0,230	47,60	1,43
Campaña 1974 - 75						
Crudo	332,00	0,92	25,35	0,232	70,17	1,76
Pelado	152,00	1,35	22,84	0,310	67,72	1,74
Fermentado	136,00	1,51	21,97	0,335	69,11	1,60

den correlacionarse perfectamente con la pérdida de textura que sufre el fruto durante el proceso de elaboración. Por otra parte, el grado de esterificación sigue la misma pauta observada anteriormente, y el contenido de acetilos disminuye en el fruto elaborado.

Los aumentos que se observan en el porcentaje de ácido anhídrouónico en el fruto, durante el proceso de pelado y fermentación, pueden explicarse considerando que durante estas etapas se produce una gran alteración de los tejidos vegetales que ocasiona una considerable pérdida de agua y materiales solubles en ella, con el consiguiente aumento de la concentración de material péctico respecto al existente en el fruto fresco, al referirnos a un peso de muestra fijo, lo cual queda reflejado en el incremento que experimenta en dichas fases el porcentaje de residuo seco obtenido.

Otra posible causa de dicho incremento puede radicar en la viscosidad decreciente de las muestras correspondientes a las tres fases de la elaboración consideradas: fruto fresco, pelado y fermentado. Este factor dificulta, en grado decreciente de importancia, una completa recuperación del producto en las sucesivas operaciones de filtrado.

Para corregir el efecto de estos factores sobre el aumento en el contenido de ácido anhídrouónico en el fruto, se ha tomado como constante el porcentaje medio de residuo seco, con lo cual dicho contenido varía de forma paralela al referido a residuo seco, tal como puede verse en la Tabla XIII, donde se incluyen los valores medios corregidos correspondientes a las dos campañas.

TABLA XIII

Contenido en ácido anhidrouónico de pimientos. Valores medios corregidos para los frutos en las tres fases de la elaboración.

<u>Muestra</u>	<u>Textura (Kg/100g)</u>	<u>% Acido anhidrouónico</u>	
		<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>
Campaña 1973 - 74			
Crudo	336,26	20,25	0,237
Pelado	186,19	16,09	0,188
Elaborado	151,62	17,41	0,204
Campaña 1974 - 75			
Crudo	332,00	25,35	0,297
Pelado	152,00	22,84	0,267
Elaborado	136,00	21,97	0,257

Cuando durante la elaboración y conservación el control se descuida, y como consecuencia la textura se deteriora, se producen transformaciones tanto en la composición como en el contenido total de pectinas por procesos físico-químicos o por la acción pectinolítica de microorganismos, como los mohos, presentes por contaminación accidental. Esto se confirma por los datos de composición que se presentan en la Tabla XIV para frutos elaborados en distintos estados de conservación, en la cual se pone de manifiesto la tendencia que muestran todos los parámetros estudiados a disminuir con el gradual ablandamiento del fruto, observándose que el contenido en ácido anhidrouónico, tanto en residuo seco como en el fruto fresco varía paralelamente con la textura que muestran, si bien en éste último la pérdida de material péctico está parcialmente enmascarada por el gran incremento en porcentaje de residuo seco debido a las causas antes mencionadas. Los valores obtenidos, una vez corregidos estos incrementos, se incluyen en la Tabla XV.

Como consecuencia de todo lo expuesto, parece ser que la pulpa del pimiento, en cuanto a su composición péctica se refiere, no sufre una gran alteración durante el proceso de pelado y mantiene prácticamente a lo largo de la fermentación y conservación posterior el contenido inicial de dichos componentes, siempre que el proceso de elaboración haya sido debidamente controlado en todas sus fases.

Sin embargo, si bien el proceso de pelado no altera considerablemente el porcentaje de ácido anhidrouónico, se aprecia un ligero descenso suficiente como para pensar que la estructura pécti-

TABLA XIV

Contenido y composición p ctica de pimientos en distintos estados de conservación.

<u>Muestra</u>	<u>Textura (Kg/100g)</u>	<u>% residuo seco</u>	<u>% Acido anhidrouónico</u>		<u>% grupos carboxilos esterificados</u>	<u>% acetilos (en residuo seco)</u>
			<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>		
Campaa 1973 - 74						
Duros	151,40	1,87	16,54	0,31	88,90	1,85
Blandos	128,70	2,00	14,84	0,30	83,70	1,68
Campaa 1974 - 75						
Duros	149,00	1,55	22,34	0,35	57,95	1,86
Blandos	73,84	3,25	9,53	0,30	39,81	1,50

TABLA XV

Valores corregidos del contenido en ácido anhidrourónico de pimientos en distinto estado de conservación.

<u>Muestra</u>	<u>Textura (Kg/100g)</u>	<u>% Acido anhidrourónico</u>	
		<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>
Campaña 1973 - 74			
Duros	151,40	16,54	0,194
Blandos	128,70	14,84	0,174
Campaña 1974 - 75			
Duros	149,00	22,34	0,261
Blandos	73,84	9,53	0,112

ca sufre procesos de despolimerización y parte del contenido inicial de protopectina pasa a pectina soluble. Este descenso no es, desde luego, comparable con el que presenta la textura, que deberá estar afectada, lógicamente, por otros factores, tales como la pérdida de turgencia celular.

La mayor o menor degradación que sufran las cadenas pécticas estará en función con la forma de realizar el tratamiento de pelado y por consiguiente, si éste se verifica en las condiciones adecuadas y sólo afecta al fruto superficialmente, el pimiento alcanzará la flexibilidad suficiente manteniendo la textura adecuada para su conservación.

Unicamente, cuando el proceso de conservación no es el adecuado y la despolimerización, con el consiguiente aumento de pectina soluble, es considerable, el fruto, además de tener una sensible pérdida de textura sufre un acusado descenso en el contenido en ácido anhidrouónico, porcentaje de esterificación y porcentaje de acetilos.

5.1.2.- Aceitunas.

El estudio de composición péctica en la aceituna se realiza en frutos de la variedad Hojiblanca, correspondientes a dos campañas sucesivas, y recolectados dentro del intervalo normal para su elaboración como aceitunas negras al natural en salmuera, si bien debe indicarse que su estado de madurez era algo excesivo.

Los resultados obtenidos (Tabla XVI) muestran que el contenido en ácido anhidrouónico, es análogo para ambas campañas, referido tanto a residuo seco como a fruto fresco, siendo siempre el porcen-

TABLA XVI

Contenido y composición p ctica de aceitunas negras maduras de la variedad Hojiblanca. Fruto fresco.

<u>Muestra</u>	<u>% residuo seco</u>	<u>% ácido anhídrour�nico</u>		<u>% grupos carboxilos esterificados</u>	<u>% acetilos (en residuo seco)</u>
		<u>Residuo seco</u>	<u>Producto</u>		
Campaña 1974					
Pulpa 1	2,25	7,94	0,18	22,00	2,37
Piel 1	1,75	7,30	0,13	49,60	1,42
Pulpa 2	2,00	6,64	0,13	0,00	2,97
Piel 2	2,50	5,74	0,14	48,20	1,72
Media de la campaña					
Pulpa	2,12	7,29	0,15	11,00	2,67
Piel	2,12	6,52	0,13	48,90	1,57
Campaña 1975					
Pulpa 1	2,32	7,16	0,17	15,06	2,54
Piel 1	1,03	5,24	0,05	50,00	2,13
Pulpa 2	1,86	8,33	0,16	20,10	2,49
Piel 2	1,14	6,33	0,07	51,10	1,86
Media de la campaña					
Pulpa	2,09	7,74	0,16	17,58	2,51
Piel	1,08	5,76	0,06	50,55	1,99

taje superior en la pulpa que en la piel, hecho igualmente observado en el porcentaje de acetilos. Por el contrario, son las pectinas de la piel las que presentan un grado de esterificación notablemente más elevado.

Para seguir la evolución del contenido y composición de los materiales pécticos durante la maduración de los frutos, en la segunda de las campañas consideradas se realizan dichos análisis para aceitunas de la misma variedad, recogidas del árbol en distintos estados de madurez. Los resultados se dan en la Tabla XVII.

En primer lugar puede observarse que, en todos los casos, el contenido en ácido anhidrouónico de la pulpa sigue siendo superior al de la piel y que dicho contenido, referido a fruto fresco, decrece a medida que avanza el estado de madurez del fruto.

Por otro lado, el grado de esterificación, mayor en la piel que en la pulpa, disminuye con la maduración del fruto, llegando a desaparecer dicha esterificación en la aceituna excesivamente madura. Luh y cols (127) encuentran un descenso semejante en aceitunas de la variedad Sevillana. El contenido en acetilos, superior en la pulpa, parece que tiende a aumentar algo en el fruto maduro.

En la misma Tabla XVII se incluyen los datos correspondientes al producto elaborado como aceituna negra al natural en salmuera partiendo de los frutos correspondientes al estado de maduración B, análisis efectuado a los cinco meses de conservación.

Se observa un incremento en el porcentaje de residuo seco, análogo al encontrado para los pimientos, y cuya causa fué explicada al referirnos a dicho producto. Esto hace que aparentemente

TABLA XVII

Contenido y composición p ctica de aceitunas de la variedad Hojiblanca en distintos estados de madurez. Campaña 1975.

Muestra	Estado de maduración	% residuo seco	% ácido anhidrourónico		% grupos carboxilos esterificados	% acetilos (en residuo seco)
			Residuo seco	Producto		
Fruto fresco						
Pulpa 1	A	2,35	9,57	0,23	12,47	2,19
Piel 1		1,01	8,48	0,09	45,39	1,35
Pulpa 2	B	1,59	12,13	0,19	19,82	2,26
Piel 2		1,20	9,34	0,11	41,09	1,61
Pulpa 3	C	2,04	8,92	0,18	0,00	2,21
Piel 3		1,02	5,70	0,06	0,00	1,92
Fruto elaborado a los 5 meses de conservación *						
Pulpa		2,54	8,40	0,21	0,00	2,46
Piel		0,66	4,75	0,03	0,00	2,32

A.- Frutos en el envero.

B.- Frutos maduros.

C.- Frutos excesivamente maduros

* Como materia prima se emplearon frutos correspondientes al estado de maduración B.

el contenido en ácido anhidrourónico referido al producto sea algo superior al inicial (pasa de 0,19 % a 0,21 %).

Sin embargo, dicho contenido, referido a residuo seco, sufre un gran descenso respecto al valor inicial, tanto en la pulpa (de 12,13 % a 8,40 %) como en la piel (de 9,34 % a 4,75 %). Realizadas las oportunas correcciones, considerando invariable el porcentaje de residuo seco, como en el caso del pimiento, ésta pérdida del material péctico se refleja igualmente en los valores del contenido en ácido anhidrourónico referidos a fruto fresco (desde 0,19 % a 0,13 % en la pulpa, y de 0,11 % a 0,06 % en la piel), lo que se relaciona perfectamente con el hecho de que la textura de los frutos elaborados era muy deficiente por defectos atribuibles a una mala conservación, y que ratifica igualmente lo observado en los pimientos blandos. La esterificación de los grupos carboxilos desaparece por completo mientras que el porcentaje de acetilos parece experimentar un sensible aumento.

Finalmente, se sigue la evolución de los componentes pécticos en frutos maduros que, una vez recolectados, se conservan durante un mes en dos trojes. A ellos pertenecen las muestras iniciales de la segunda campaña representadas en la Tabla XVI. Los resultados obtenidos, a los 12 y 28 días de conservación, se dan en la Tabla XVIII.

Puede observarse aquí también que el porcentaje de residuo seco aumenta con el tiempo de conservación, lo cual se explica por el hecho de que la aceituna pierde una cierta cantidad de agua y materiales solubles durante el atrojado. Por ello, el porcentaje de ácido anhidrourónico tiende igualmente a incrementarse en el fruto fresco.

TABLA XVIII

Evolución del contenido y composición péctica de aceitunas negras maduras de la variedad Hojiblanca durante su conservación en trojes.

Muestra	Tiempo de atrojado (días)	% residuo seco	% ácido anhidrouónico		% grupos carboxilos esterificados	% acetilos (residuo seco)
			Residuo seco	Producto		
Pulpa 1-1	0	2,32	7,16	0,17	15,06	2,76
Piel 1-1		1,03	5,24	0,05	50,00	2,88
Pulpa 1-2	12	2,55	8,00	0,20	0,00	2,96
Piel 1-2		1,22	3,15	0,04	0,00	2,88
Pulpa 1-3	28	3,58	8,71	0,31	0,00	3,93
Piel 1-3		1,50	4,44	0,07	0,00	4,20
Pulpa 2-1	0	1,86	8,33	0,16	20,10	2,43
Piel 2-1		1,14	6,33	0,07	51,10	1,89
Pulpa 2-2	12	2,16	7,60	0,16	0,00	2,70
Piel 2-2		1,19	3,47	0,04	0,00	2,37
Pulpa 2-3	28	2,75	8,47	0,23	0,00	3,30
Piel 2-3		1,50	4,55	0,07	0,00	3,00

El grado de esterificación llega a hacerse cero dentro de los doce primeros días de conservación, periodo en el que desaparece también la actividad de pectinesterasa detectada en el fruto como se estudiará posteriormente. El porcentaje de acetilos, por el contrario, aumenta con el tiempo de atrojado.

5.2.- Actividad de pectinesterasa.

La preparación de las soluciones enzimáticas y las determinaciones de actividad se han llevado a cabo por la técnica descrita anteriormente en los apartados 4.2.2 y 4.3.2.1 respectivamente.

Para la puesta a punto del método, se realiza un estudio de la presencia de pectinesterasa en tomate y limón (Tabla XIX) confrontándose los resultados con los obtenidos por otros autores (7) (43).

Los valores encontrados en el tomate son del mismo orden que los dados por dichos investigadores (43), así como el pH óptimo de 7,6 unidades. Como ya se ha indicado, para valores de pH superiores a éste, la saponificación espontánea de la pectina, catalizada por los álcalis, interfiere las medidas de actividad haciendo imposible su estudio en esta zona.

En el limón los resultados no son comparables a los encontrados por Rouse y Atkins (7) ya que estos autores realizan las determinaciones en concentrados cítricos comerciales mientras que en el presente trabajo dichas determinaciones se han llevado a cabo en extractos obtenidos al tratar con cloruro sódico al 10 % la pulpa exenta de zumo.

TABLA XIX

Medidas de actividad de pectinesterasa en limón y tomate

pH	Limón		Tomate	
	<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>	<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
7,60	2,10	4,20	31,30	62,60
6,60	0,91	1,82	25,40	50,80
5,60	0,62	1,24	17,80	35,60
4,60	-	-	13,35	26,70

(u. PE) ml = unidades de pectinesterasa por ml de extracto

(u. PE) g = unidades de pectinesterasa por g de pulpa

El estudio de la actividad de pectinesterasa se ha realizado tanto en pimientos como en aceitunas. En el primer caso, el intervalo de madurez elegido ha sido únicamente el que corresponde a la recolección de dicho fruto para su uso en el relleno. Por el contrario, las aceitunas han sido estudiadas durante un periodo de tiempo mas amplio, correspondiente a muy distintos estados de madurez.

5.2.1.- Pimientos.

Se analizaron extractos correspondientes a catorce muestras de fruto fresco en distinto grado de desarrollo de color. Como puede observarse en las Tablas XX y XXI la actividad de pectinesterasa tiene muy poca importancia cuantitativa, a pesar de lo cual puede apreciarse que en el fruto verde-rojizo los valores de dicha actividad son superiores a los encontrados para el que denominamos rojo, pimiento que presenta un estado de textura y color óptimo para la elaboración de aceitunas rellenas y en el que prácticamente no se detecta presencia de pectinesterasa. En las cuatro muestras analizadas de pimiento sobremaduro se observa una ligera tendencia a incrementarse los valores de actividad de pectinesterasa. Sin embargo, su significación carece de importancia, teniendo en cuenta que en dichas muestras, que hubieron de seleccionarse, no precisamente al azar, entre las diferentes partidas que llegaban a la fábrica, el deterioro producido por la excesiva madurez va frecuentemente acompañado por el desarrollo de abundante flora microbiana que, probablemente, es la responsable de los pequeños incrementos de actividad observados.

Puede, por tanto, considerarse que en todos los casos en que

TABLA XX

Medidas de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de pimientos en distintos estados de madurez.

Muestra	Estado de maduración	ml NaOH 0,05 N consumidos				(u. PE) ml	(u. PE) g
		1	2	\bar{x}	Blanco		
1	Verde-rojizo	0,155	0,155	0,155	0,080	0,25	0,50
2	"	0,220	0,190	0,205	0,100	0,35	0,70
3	"	0,210	0,200	0,205	0,080	0,42	0,84
4	"	0,140	0,500	0,145	0,110	0,12	0,24
5	"	0,250	0,250	0,250	0,090	0,53	1,06
6	"	0,170	0,180	0,175	0,100	0,25	0,50
7	"	0,150	0,155	0,152	0,085	0,22	0,44
8	Rojo	0,100	0,140	0,120	0,110	0,03	0,06
9	"	0,115	0,110	0,112	0,110	0,01	0,02
10	"	0,095	0,100	0,097	0,090	0,02	0,04
11	Rojo sobremaduro	0,130	0,140	0,135	0,100	0,12	0,24
12	"	0,160	0,170	0,165	0,100	0,22	0,44
13	"	0,160	0,145	0,152	0,125	0,09	0,18
14	"	0,100	0,125	0,112	0,100	0,04	0,08

TABLA XXI

Valores medios de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de pimientos en distintos estados de madurez.

<u>Estado de maduración</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>			
	<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>	<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
Verde-rojizo	0,184	0,092	0,31	0,62
Rojo	0,110	0,100	0,02	0,04
Rojo sobremaduro	0,141	0,106	0,12	0,24

se detectó actividad de la enzima las muestras fueron inaceptables o de baja calidad para la industria del aderezo, bien por su color deficiente, en el caso en que los pimientos estaban poco maduros, bien por su baja textura, cuando el fruto se encontraba sobremaduro.

Una confirmación de cuanto antecede se presenta en el hecho de que todas las medidas de actividad realizadas en extractos de pimientos pelados, obtenidos de aquellos frutos frescos clasificados como rojos, han dado siempre resultados negativos.

5.2.2.- Aceitunas.

Para investigar la presencia de pectinesterasa en la aceituna se han elegido cuatro variedades diferentes: Gordal, Manzanilla, Lechín y Hojiblanca. El estudio, realizado en distintos estados de madurez (Tablas XXII a XXV), pone de manifiesto para las tres primeras variedades, no sólo la escasa actividad de la enzima, sino también las pequeñas fluctuaciones que dicha actividad sufre durante el proceso completo de maduración. Sin embargo, en la variedad Hojiblanca, cuando presenta un grado avanzado de desarrollo de color, esta actividad es sensiblemente superior, lo que se pone más claramente de manifiesto en la Tabla XXVI donde se comparan los valores medios obtenidos.

Por esta razón, siendo ésta variedad una de las más empleadas para la elaboración de aceitunas negras al natural en salmuera, se ha considerado de gran interés la realización de un estudio a fondo sobre la presencia de pectinesterasa que puede jugar un importante papel en relación con los graves problemas de ablandamien-

TABLA XXII

Medidas de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de aceitunas de la variedad Gordal en diferentes estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
	<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
Muy verde	0,150	0,150	0,00	0,00
"	0,175	0,170	0,02	0,04
Verde	0,125	0,105	0,07	0,14
"	0,155	0,135	0,07	0,14
"	0,075	0,060	0,05	0,10
"	0,195	0,170	0,08	0,16
Color cambiante	0,160	0,125	0,12	0,24
"	0,120	0,100	0,07	0,14
Negra	0,170	0,130	0,13	0,26
"	0,200	0,180	0,07	0,14

TABLA XXIII

Medidas de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de aceitunas de la variedad Manzanilla en diferentes estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
	<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
Verde	0,090	0,090	0,00	0,00
"	0,145	0,140	0,02	0,04
Color cambiante	0,170	0,155	0,05	0,10
"	0,230	0,225	0,02	0,04
Negra	0,160	0,150	0,03	0,06
"	0,100	0,075	0,08	0,16
"	0,080	0,060	0,07	0,14

TABLA XXIV

Medidas de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de aceitunas de la variedad Lechin en diferentes estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
	<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
Verde	0,100	0,100	0,00	0,00
"	0,095	0,090	0,02	0,04
Color cambiante	0,110	0,095	0,05	0,10
"	0,105	0,100	0,02	0,04
"	0,120	0,095	0,08	0,16
"	0,105	0,090	0,05	0,10
"	0,110	0,100	0,03	0,06
Negra	0,125	0,100	0,08	0,16
"	0,105	0,095	0,03	0,06
"	0,110	0,095	0,05	0,10

TABLA XXV

Medidas de actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos de aceitunas de la variedad Hojiblanca en diferentes estados de madurez.

<u>Estado de madurez</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
	<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
Verde	0,105	0,100	0,02	0,04
"	0,100	0,100	0,00	0,00
Color cambiante	0,105	0,095	0,03	0,06
"	0,090	0,085	0,02	0,04
"	0,130	0,100	0,10	0,20
"	0,125	0,100	0,08	0,16
Negra	0,210	0,090	0,40	0,80
"	0,290	0,100	0,63	1,26
"	0,170	0,095	0,25	0,50
"	0,310	0,090	0,73	1,46
"	0,470	0,100	1,23	2,46
"	0,430	0,090	1,13	2,26

TABLA XXVI

Valores medios de actividad de pectinesterasa en distintos estados de madurez para las diferentes variedades estudiadas.

<u>Estado de madurez</u>	<u>Actividad (u. PE) g</u>			
	<u>Gordal</u>	<u>Manzanilla</u>	<u>Lechin</u>	<u>Hojiblanca</u>
Muy verde	0,02	0,00	0,00	0,00
Verde	0,14	0,02	0,02	0,02
Color cambiante	0,19	0,07	0,09	0,12
Negra	0,20	0,12	0,11	1,46

to que tan directamente afectan a la industria del aderezo.

Varios son los factores cuya influencia se ha investigado en relación con la actividad de esta enzima:

- Estado de madurez del fruto
- Tiempo de extracción de la enzima
- Tiempo de almacenamiento del fruto
- Tiempo de conservación en trojes
- Efecto de la diálisis
- Efecto del valor de pH
- Efecto del cloruro sódico.

Estado de madurez del fruto.-

Comprobada la mayor actividad de pectinesterasa en la variedad Hojiblanca, una vez desarrollado el color negro del fruto, se consideró necesario conocer, con mayor detalle, lo que ocurre posteriormente, puesto que, en la práctica industrial, la recolección se prolonga, a veces, hasta alcanzar unos estados de madurez sumamente avanzados.

En la Tabla XXVII se presentan los valores encontrados para la actividad de la enzima, partiendo de frutos, todos ellos suficientemente maduros pero recogidos en fechas sucesivas.

En ella puede observarse que en una primera etapa la actividad de pectinesterasa se incrementa con la madurez alcanzándose un máximo que coincide, aproximadamente, con el estado en que tanto la textura como el color del fruto son óptimos para la elaboración como aceituna negra al natural en salmuera.

TABLA XXVII

Evolución de la actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos procedentes de aceitunas maduras de la variedad Hojiblanca recolectadas en distintas fechas.

Fecha	ml NaOH 0,05 N consumidos				(u. PE) ml	(u. PE) g
	1	2	\bar{x}	Blanco		
26 - 1 - 75	0,270	0,295	0,282	0,095	0,62	1,24
	0,325	0,300	0,312	0,090	0,74	1,48
	0,325	0,300	0,312	0,090	0,74	1,48
3 - 2 - 75	0,445	0,485	0,465	0,090	1,25	2,50
	0,535	0,505	0,520	0,090	1,43	2,86
	0,420	0,410	0,415	0,110	1,02	2,04
20 - 2 - 75	0,200	0,280	0,240	0,100	0,47	0,94
	0,265	0,300	0,282	0,115	0,56	1,12
	0,260	0,220	0,240	0,100	0,47	0,94
	0,275	0,290	0,282	0,095	0,62	1,24
16 - 3 - 75	0,175	0,195	0,185	0,095	0,30	0,60
	0,185	0,220	0,202	0,120	0,27	0,54

A partir de este estado, cuando la madurez del fruto progresa y su textura disminuye, la actividad de la enzima va decreciendo, es mínima en la última muestra registrada en la tabla, correspondiente ya a una aceituna sobremadura, que presentaba una pulpa excesivamente blanda, y llega a anularse totalmente en los demás muestres realizados posteriormente.

Tiempo de extracción de la enzima.-

Comprobada la alta actividad de pectinesterasa en la variedad Hojiblanca, en comparación con las variedades Gordal, Manzanilla y Lechín antes estudiadas, se ha investigado en ella la influencia que, sobre los valores de dicha actividad, tiene el tiempo de maceración con la solución de cloruro sódico al 10 % empleada para la extracción de la enzima.

Para ello, diversas muestras de aceitunas, que presentan diferentes texturas por corresponder a distintos estados de madurez, se emplean para preparar los extractos, utilizando dos tiempos de maceración, de 4 y 24 horas.

Realizada la extracción, los valores obtenidos en las medidas de actividad se incluyen en la Tabla XXVIII en la cual las seis primeras muestras corresponden a aceituna madura de buena textura, mientras las otras seis pertenecen a frutos sobremaduros cuya pulpa se encontraba muy blanda. Los resultados parecen indicar que el tiempo óptimo para la operación de extracción varía con el estado de madurez de los frutos como resultante de diversos factores entre los que pueden incluirse la facilidad de difusión de la enzima desde la pulpa hasta la solución, que es mayor cuando aque-

TABLA XXVIII

Influencia del tiempo de extracción de la enzima sobre la actividad de pectinesterasa.

Muestra nº	Tiempo de extracción horas	ml NaOH 0,05 N consumidos			
		Valor medio	Blanco	(u. PE) ml	(u. PE) g
1	4	0,205	0,120	0,28	0,56
	24	0,185	0,095	0,30	0,60
2	4	0,130	0,100	0,10	0,20
	24	0,195	0,100	0,32	0,62
3	4	0,215	0,100	0,38	0,76
	24	0,245	0,140	0,35	0,70
4	4	0,345	0,125	0,73	1,46
	24	0,375	0,115	0,87	1,74
5	4	0,280	0,140	0,47	0,94
	24	0,420	0,100	1,07	2,14
6	4	0,175	0,100	0,25	0,50
	24	0,240	0,100	0,47	0,94
7	4	0,390	0,110	0,95	1,90
	24	0,240	0,110	0,45	0,90
8	4	0,430	0,085	1,15	2,30
	24	0,280	0,090	0,65	1,30
9	4	0,200	0,100	0,33	0,66
	24	0,160	0,150	0,03	0,06
10	4	0,270	0,115	0,52	1,04
	24	0,230	0,145	0,28	0,56
11	4	0,235	0,100	0,45	0,90
	24	0,180	0,100	0,27	0,54
12	4	0,255	0,100	0,52	1,02
	24	0,235	0,110	0,42	0,84

lla se encuentra reblandecida y la estructura original del tejido está muy alterada, y la inactivación de la enzima cuando se prolonga excesivamente los tiempos de maceración. Esto explica que mientras en las muestras con buena textura, en las cuales la difusión es más lenta, los valores de actividad obtenidos cuando la maceración se prolonga durante veinticuatro horas tienden a ser superiores a los encontrados cuando la extracción es más corta, en las aceitunas sobremaduras el tiempo de cuatro horas parece suficiente para la solubilización de la pectinesterasa que es progresivamente inactivada al aumentar el tiempo de maceración.

Tiempo de almacenamiento del fruto.-

Teniendo en cuenta que no siempre se realiza la elaboración inmediatamente después de la recolección, es de sumo interés conocer lo que ocurre con la actividad de la enzima durante el posible almacenamiento del fruto, puesto que la composición del mismo, y concretamente el grado de esterificación del material péctico en él presente, variará de acuerdo con la evolución de la enzima.

Para estudiar este punto, se ha investigado dicha evolución, durante la conservación en cámara a 12 - 15° C, para dos muestras diferentes de aceitunas. Los frutos de la primera, recolectados directamente del árbol y sanos en una gran mayoría, presentaban en general buena textura, mientras que en la segunda muestra, procedente de una fábrica, se observaba un importante porcentaje de frutos sucios y una gran heterogeneidad en cuanto a su textura.

Este último defecto puede atribuirse tanto a los golpes durante el transporte como al desarrollo de microorganismos, mohos principalmente, de actividad pectinolítica.

Los resultados obtenidos (Tabla XXIX) muestran que, en los frutos recolectados directamente del árbol, la actividad de pectinesterasa se incrementa durante una primera fase de la conservación, para ir descendiendo posteriormente de forma paulatina. Sin embargo, las aceitunas tomadas de la fábrica presentan una progresiva disminución en la actividad enzimática lo cual parece indicar que la primera fase de ascenso ha tenido lugar durante el almacenamiento a temperatura ambiente, anterior a la toma de muestra. Vemos por tanto, que dicho almacenamiento es otro factor de gran importancia para la degradación de la cadena péctica.

Tiempo de conservación en trojes.-

Como consecuencia de la evolución observada en la actividad de la enzima durante el simple almacenamiento del fruto, antes de su elaboración por fermentación, se consideró conveniente realizar experiencias dirigidas a estudiar la influencia del tiempo de conservación en trojes por el papel que puede jugar en los procesos de extracción de aceite a los que se dedica parte de la producción de esta variedad y en los cuales muestra una gran tendencia a formar pastas en las que el aceite se separa con gran dificultad.

En la Tabla XXX se incluyen los resultados obtenidos de cuya observación puede concluirse que la actividad de pectinesterasa disminuye al incrementarse el periodo de almacenamiento en los trojes, hecho que concuerda con lo observado en el apartado anterior en relación con el almacenamiento en fábrica, y que, en este caso, puede estar relacionado con la observación de que la prolongación del almacenamiento en trojes facilita la extracción del aceite, ya que al disminuir, e incluso llegar a anularse el contenido en ésteres, como se demostró en el apartado 5.1.2, se inestabilizan los geles pécticos.

TABLA XXIX

Evolución de la actividad de pectinesterasa durante el almacenamiento del fruto

<u>Procedencia de la muestra</u>	<u>Tiempo de almacenamiento</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
		<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
	<u>Dias</u>				
Arbol	0	0,31	0,10	0,70	1,40
	7	0,42	0,10	1,07	2,14
	8	0,67	0,12	1,83	3,66
	10	0,40	0,10	1,00	2,00
	15	0,33	0,10	0,77	1,54
	20	0,26	0,15	0,37	0,74
Fábrica	0	0,42	0,11	1,02	2,04
	7	0,35	0,10	0,82	1,64
	8	0,34	0,12	0,73	1,46
	10	0,30	0,10	0,65	1,30
	15	0,22	0,10	0,40	0,80
	20	0,23	0,10	0,43	0,86

TABLA XXX

Evolución de la actividad de pectinesterasa con el tiempo de conservación en troje.

<u>Muestra nº</u>	<u>Tiempo de atrojado (días)</u>	<u>ml NaOH 0,05 N consumidos</u>		<u>(u. PE) ml</u>	<u>(u. PE) g</u>
		<u>Valor medio</u>	<u>Blanco</u>		
1	0	0,23	0,10	0,43	0,86
	10	0,17	0,11	0,17	0,34
	20	0,09	0,08	0,03	0,06
2	0	0,23	0,13	0,35	0,70
	10	0,13	0,11	0,07	0,14
	20	0,08	0,08	0,00	0,00
3	0	0,21	0,12	0,30	0,60
	10	0,14	0,10	0,13	0,26
	20	0,08	0,08	0,00	0,00

Efecto de la diálisis.-

Para purificar la pectinesterasa se ha dializado el extracto enzimático durante 72 horas en tubos de celofana semipermeable frente a agua destilada, sustituyendo varias veces a la fase acuosa externa con nuevo volumen de agua destilada para asegurarse de que la concentración final de las sales es prácticamente despreciable.

Puesto que la membrana es semipermeable la atraviesan libremente las sales y solutos de bajo peso molecular mientras que las proteínas son retenidas por el mayor tamaño de su molécula. En ausencia de sales algunas de las proteínas presentes precipitan mientras que otras permanecen en la fracción soluble.

Separadas ambas fracciones por centrifugación las medidas de actividad realizadas han puesto de manifiesto que la pectinesterasa obtenida de la aceituna no precipita y se mantiene por tanto en el sobrenadante.

Efecto del valor de pH.-

Segun los estudios realizados por otros autores, comentados anteriormente en la bibliografía, la máxima actividad de pectinesterasa, para diversos frutos como pepinillos, tomate, limón, etc., se encuentra a un valor de pH de alrededor de 7,5 unidades.

En nuestro caso, para investigar la variación de la actividad de dicha enzima, procedente de la aceituna negra madura, se realiza un estudio detallado dentro del intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 7,5 unidades.

Por encima de este valor, no se ha considerado de interés efectuar determinaciones de actividad por dos razones fundamentales. En primer lugar, en la industria que elabora este tipo comercial de aderezo de aceitunas negras no se alcanzan, durante la fermentación y conservación, valores tan elevados de pH. Por otro lado, la saponificación de la pectina, introduciría un gran error en las determinaciones.

Los resultados obtenidos (Tabla XXXI), representados en el Gráfico 6, muestran claramente que la actividad de la enzima en la aceituna negra madura crece paralelamente con el valor de pH en toda la zona considerada, tendiendo a un máximo análogo al encontrado para otros frutos, a 7,5 unidades, y siendo muy reducida en el intervalo considerado como el más idóneo para la fermentación, entre 4,5 y 5,0 unidades aproximadamente.

Efecto del cloruro sódico.-

Teniendo en cuenta que, durante el proceso de fermentación de la aceituna negra madura en salmuera, los dos factores de mayor importancia son el valor de pH y la concentración de cloruro sódico, consideraremos ahora el efecto de éste último.

Para ello, a la solución del sustrato, preparada con una concentración 0,2 N de dicha sal (1,16 %) tal como se ha descrito en el apartado 4.3.2.1., se añaden cantidades crecientes de cloruro sódico, obteniéndose, al valor de pH de máxima actividad, 7,5 unidades, los resultados que se dan en la Tabla XXXII, cuyos valores medios se representan en el Gráfico 7.

TABLA XXXI

Influencia del valor de pH sobre la actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos de aceituna de la variedad Hojiblanca.

pH	Actividad (u. PE) ml			
	<u>Muestra 1</u>	<u>Muestra 2</u>	<u>Muestra 3</u>	<u>Muestra 4</u>
4,50	0,06	0,20	0,06	-
5,50	0,10	0,72	0,48	0,60
6,50	0,23	0,87	0,95	1,23
7,50	0,63	1,23	1,12	1,43

GRAFICO 6.-Influencia del valor de pH sobre la actividad de pectinesterasa en extractos enzimaticos de aceituna de la variedad Hojiblanca,

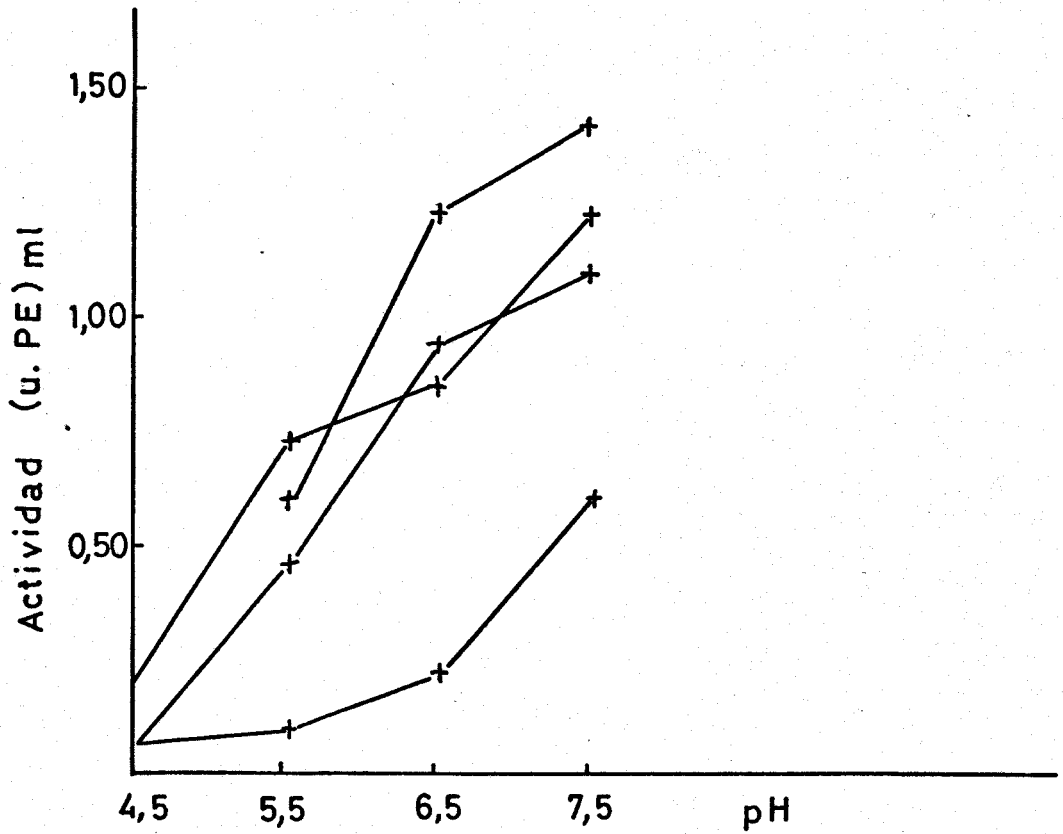
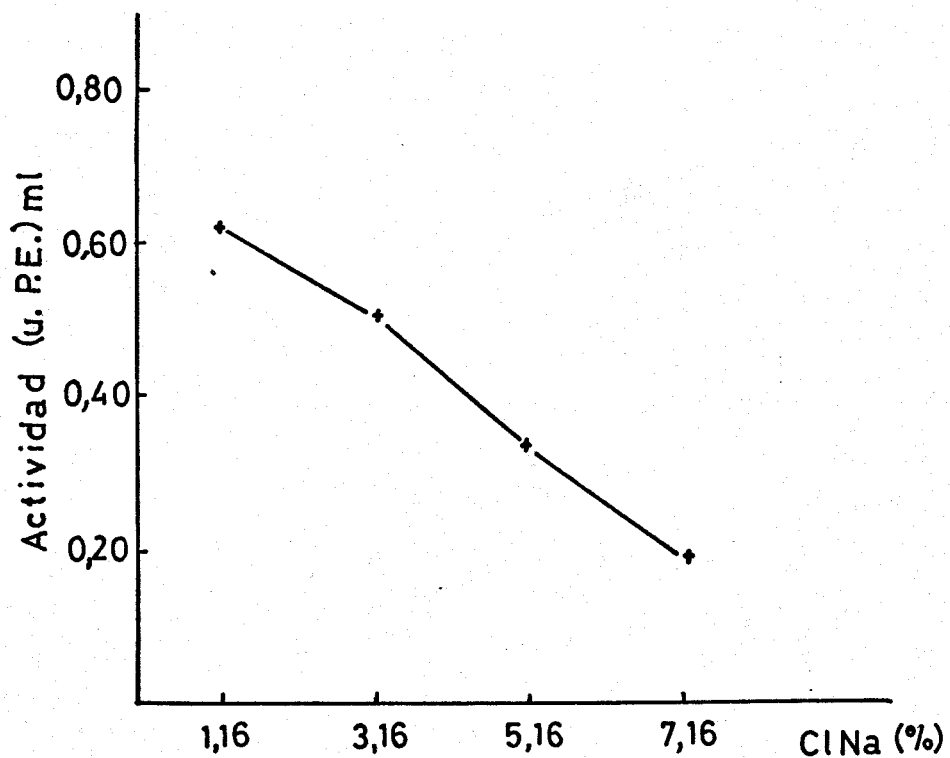


TABLA XXXII

Efecto de la concentración de cloruro sódico sobre la actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos de aceitunas de la variedad Hojiblanca.

<u>ClNa (%)</u>	<u>Actividad (u. PE) ml</u>		
	<u>Muestra 1</u>	<u>Muestra 2</u>	<u>\bar{X}</u>
1,16	0,62	0,63	0,62
3,16	0,50	0,52	0,51
5,16	0,32	0,37	0,34
7,16	0,10	0,30	0,20

GRAFICO 7.- Efecto de la concentración de cloruro sódico sobre la actividad de pectinesterasa en extractos enzimáticos de aceitunas de la variedad Hojiblanca.



De su observación puede deducirse que el cloruro sódico presenta un efecto inhibitor sobre la actividad de pectinesterasa procedente de aceitunas de la variedad Hojiblanca, moderado para bajos niveles de la sal, y bastante más marcado cuando se adiciona al sustrato un 6 % de la misma, a diferencia de lo que ocurre para las enzimas de otros frutos, sobre las cuales, como se expuso en el apartado 3.2.1, las sales no tienen ningún efecto sobre su actividad para valores de pH comprendidos entre 7,0 y 8,0 unidades (54) (59) (71).

Considerando todo lo anteriormente expuesto, si el valor de pH óptimo de la enzima es de 7,5 unidades, lejos del que se mantiene en la fermentación y conservación de los frutos, y ya que la sal posee un efecto inhibitor de la actividad enzimática, cabría pensar que, en estas condiciones la pectinesterasa es prácticamente inactiva. Sin embargo, es preciso resaltar que, hasta establecerse el equilibrio jugo-salmuera, la enzima puede jugar un importante papel, iniciando la degradación de la cadena péctica, y favoreciendo posiblemente la acción posterior de la poligalacturonasa. En efecto, la intervención de la pectinesterasa se pone de manifiesto en la desesterificación ya mencionada producida en los materiales pécticos durante la fermentación.

5.3.- Actividad de poligalacturonasa.

Entre las diferentes causas a las que se han atribuido las alteraciones producidas por fenómenos de ablandamiento en los frutos en estudio se encuentran la mala calidad de la materia prima, las deficiencias en el control de las condiciones de fermentación y conservación y la acción de enzimas procedentes bien del fruto bien de origen microbiano.

Ya se ha indicado la estrecha relación que existe entre el contenido y composición de las sustancias pécticas de los frutos y su textura, por lo que cualquier proceso que altera estos materiales tiene una importante repercusión en el ablandamiento citado.

Por ello, comprobado que el contenido en materiales pécticos, expresado como ácido anhidroutrónico, decrece con la pérdida de textura (apartado 5.1.), se ha considerado de gran interés iniciar el estudio de la actividad de poligalacturonasa en estos procesos.

5.3.1.- Pimientos.

Se eligen veinticuatro muestras diferentes de fruto fresco, correspondientes al intervalo de madurez característico del pimiento recolectado para su posterior empleo en el relleno de aceitunas, y en cada una de ellas se investiga la actividad de poligalacturonasa a un pH de 4,0 unidades, valor medio que se presenta durante la fermentación y conservación de dicho fruto.

Los resultados negativos obtenidos en todos los casos, junto con el hecho de que los microorganismos responsables de la fermentación del pimiento no presentan actividad de la enzima, como se describirá en el apartado 5.4., explican que durante dicha fermentación y la posterior conservación no se altere prácticamente la

composición péctica y la textura de los frutos, como ya se vió en el apartado 5.1.1., siempre que se realice un adecuado control y se evite el desarrollo de mohos sobre la superficie de las salmueras.

5.3.2.- Aceitunas.

Los graves problemas de ablandamiento que frecuentemente presentan las aceitunas de la variedad Hojiblanca, elaboradas como negras al natural en salmuera, justifican la importancia de la detección y caracterización de la enzima poligalacturonasa presente en este fruto, cuya actividad se relaciona directamente con las alteraciones pectinolíticas.

Los factores cuya influencia se ha considerado son:

- Estado de madurez del fruto
- Tiempo de almacenamiento
- Efecto de la diálisis
- Efecto del valor de pH
- Efecto del cloruro sódico
- Inhibidores presentes en la aceituna

Estado de madurez del fruto.-

Al objeto de estudiar como evoluciona la actividad de poligalacturonasa durante las distintas etapas de la maduración, se realizan en cada una de ellas medidas de dicha actividad, fijando el valor de pH a 4,0 unidades, por ser próximo al que presenta la pulpa del fruto y al que posteriormente se mantiene durante su fermentación. En la Tabla XXXIII se presentan los valores obtenidos de cuya observación podemos deducir que, durante el proceso de maduración, se in-

TABLA XXXIII

Actividad de poligalacturonasa en aceitunas de la variedad Hojiblanca en diferentes estados de madurez.

<u>Muestras nº</u>	<u>Descenso en viscosidad (%)</u>			
	<u>Verde</u>	<u>Color cambiante</u>	<u>Madura</u>	<u>Sobremadura</u>
1	0,0	0,0	14,3	51,7
2	0,1	0,0	23,7	30,7
3	-	-	11,1	35,7
\bar{x}	0,0	0,0	16,4	39,4

crementa la actividad de poligalacturonasa, y así, mientras en la aceituna recolectada verde o durante el envero no se detecta prácticamente la presencia de la enzima, las concentraciones de ésta toman valores crecientes para los frutos maduros y sobremaduros, empleados comunmente para la fermentación.

Tiempo de almacenamiento.-

Establecida, en los estudios realizados sobre la pectinesterasa, la importancia del tiempo que transcurre desde la llegada del fruto a fábrica hasta su utilización, se ha investigado la influencia que el periodo de almacenamiento tiene sobre la actividad de poligalacturonasa.

El planteamiento de la experiencia fué el siguiente: dos muestras de aceitunas, una de ellas recogida directamente del árbol y otra procedente de una fábrica, se mantienen almacenadas en cámara termostática a 12° - 15° C siguiéndose en cada una de ellas la evolución de la actividad con el tiempo de conservación.

Los resultados obtenidos, a un valor de pH de 4,0 unidades se presentan en la Tabla XXXIV en la que se observa como la actividad de poligalacturonasa, moderada inicialmente, se incrementa rápidamente al prolongarse el almacenamiento a pesar del control de la temperatura.

Este incremento de actividad puede en parte estar relacionado con el hecho de que un alto porcentaje de las aceitunas almacenadas, tanto en la fábrica como en la cámara, desarrollan colonias de mohos en su superficie, especialmente en la zona de inserción del pedúnculo.

TABLA XXXIV

Influencia de los tiempos de almacenamiento sobre la actividad de poligalacturonasa a pH 4,0.

<u>Tiempo de conservación</u>	<u>Descenso viscosidad (%)</u>		
	<u>Arbol</u>	<u>Fábrica</u>	<u>\bar{x}</u>
0 días	30,7	21,9	26,3
6 días	63,7	54,7	59,2
9 días	76,1	59,7	67,9

La presencia de estos mohos nos puso de manifiesto la necesidad de investigar más profundamente el estado de sanidad de los frutos. Para ello, se realizan siembras microbiológicas de los líquidos obtenidos al lavar las aceitunas con agua esteril, y de la pasta obtenida por trituración de la pulpa. Dichas siembras han permitido detectar la presencia de bacterias Gram-negativas y pertenecientes al género *Bacillus*, cuyo caracter pectinolítico se demuestra, tanto por métodos microbiológicos como por medidas de viscosidad, en los ensayos presentados en el apartado 5.4. En estudios posteriores a la presente Tesis se continúa esta línea de investigación para identificar dichos microorganismos y comprobar su verdadera importancia en los fenómenos de ablandamiento.

Efecto de la diálisis.-

Con la finalidad de purificar la poligalacturonasa se dializa, frente a agua destilada, el extracto enzimático, en tubos de celofana semipermeable, sustituyendo varias veces la fase externa acuosa con nuevo volumen de agua destilada.

Transcurridas 72 horas, se separan por centrifugación dos fracciones; la del sobrenadante se emplea directamente para las medidas de actividad, y la del precipitado, después de lavarla con agua destilada, se redisuelve en un volumen de solución de cloruro sódico al 2 % igual al del extracto inicial, y se filtra a continuación para eliminar los restos insolubles.

Las determinaciones realizadas a un valor de pH de 4,0 unidades (Tabla XXXV) demuestran que existe actividad de poligalacturonasa tanto en la solución del precipitado como en el sobrenadante. Si bien en éste último dicha actividad es siempre bastante mayor, ha de con-

TABLA XXXV

Actividad de poligalacturonasa a pH 4,0 en las fracciones obtenidas por diálisis de extractos enzimáticos de aceituna Hojiblanca madura.

<u>Muestra nº</u>	<u>Descenso en viscosidad (%)</u>	
	<u>Precipitado</u>	<u>Sobrenadante</u>
1	0,0	7,4
2	26,7	78,5
3	10,9	37,5
4	4,7	48,5
5	27,1	57,7
6	40,6	84,2
7	12,0	48,6
8	1,1	30,9
9	0,5	26,0
\bar{X}	13,7	46,6

siderarse que los resultados no son estrictamente comparables puesto que la disolución del precipitado se realiza en solución de cloruro sódico, lo que representa en las condiciones de incubación, una concentración de dicha sal del 0,33 %, mientras que el sobrenadante se incubaba en ausencia de sal.

La existencia de actividad en ambas fracciones indica que, en el extracto de poligalacturonasa obtenido de la aceituna existen al menos dos isoenzimas diferentes que tienen distinto comportamiento cuando no hay sales presentes ya que mientras una precipita la otra permanece en solución. Esta diferencia en sus propiedades y la presencia, ya comentada anteriormente, de microorganismos pectinolíticos hacen pensar que, posiblemente, ambas isoenzimas tienen distinta procedencia, pudiendo alguna de ellas proceder de la flora naturalmente presente en los frutos.

Efecto del valor de pH.

Se ha estudiado, entre 3,5 y 7,0 unidades, la influencia que tiene el valor del pH sobre la actividad de poligalacturonasa en los extractos enzimáticos de aceitunas maduras por considerarse de gran importancia para dilucidar la procedencia de la enzima presente en estos extractos y discernir su posible acción durante la fermentación.

Puesto que el tampón cítrico/citrato, anteriormente utilizado, solo es eficaz hasta un pH de 6,2 unidades, a partir del valor 6,0 se hizo necesario el uso de la solución amortiguadora $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$. Ya que la introducción de nuevos iones podría afectar la actividad de la enzima se realizan medidas con los dos tampones a 6,0 unidades.

Los resultados, prácticamente idénticos, demuestran que ambos pueden utilizarse sin afectar la actividad de la enzima.

Una dificultad se presenta cuando la aceituna posee una elevada actividad de pectinesterasa, ya que esta enzima acompaña a la poligalacturonasa en los extractos e interfiere las medidas de viscosidad a valores de pH próximos al óptimo de la primera, por inestabilización de los geles al desesterificar la pectina usada como sustrato. Esta interferencia puede evitarse, cuando la actividad de pectinesterasa no es alta, mediante la incubación previa del extracto a una temperatura de 40° C, durante un período de 48 horas, que resulta suficiente para inactivarla. En la Tabla XXXVI se recopilan los resultados obtenidos a varios valores de pH con extractos enzimáticos preparados a partir de seis muestras distintas de aceituna: Hojiblanca madura (Gráfico 8). En ella podemos observar que el valor de pH óptimo de los extractos de poligalacturonasa se encuentra alrededor de 6,0 unidades y que si bien las soluciones enzimáticas son activas incluso a un pH de 3,5 unidades, a este valor la actividad se reduce a menos del 50 por ciento de la que presenta a su pH óptimo.

Por otra parte, tanto en el sobrenadante como en el precipitado obtenidos por diálisis de los extractos enzimáticos se ha investigado la influencia del valor de pH sobre la actividad de la enzima y los resultados obtenidos para ambas fracciones, que se recogen en la Tabla XXXVII (Gráficos 9 y 10) confirman que la actividad de Poligalacturonasa de la aceituna se debe a dos isoenzimas diferentes que, si bien catalizan un mismo proceso de hidrólisis del enlace glicosídico en la cadena péctica, poseen propiedades diferentes.

TABLA XXXVI

Influencia de los valores de pH sobre la actividad de poligalacturonasa (% Descenso en viscosidad) en los extractos enzimáticos de aceituna Hojiblanca madura.

<u>Extracto nº</u>	<u>Valor de pH</u>							
	<u>3,5</u>	<u>4,0</u>	<u>4,5</u>	<u>5,0</u>	<u>5,5</u>	<u>6,0</u>	<u>6,5</u>	<u>7,0</u>
1	55,8	76,1	87,1	92,4	Gel	Gel	-	-
2	46,5	63,7	81,6	89,4	Gel	Gel	-	-
3	-	46,0	-	-	83,2	-	-	10,1
4	-	30,2	-	36,7	-	64,2	-	42,0
5	-	59,7	-	90,7	-	-	92,4	86,0
6	34,7	35,7	-	75,4	-	79,9	-	-

GRAFICO 8.-Influencia de los valores de pH sobre la actividad de poligalacturonasa en los extractos enzimáticos de aceituna Hojiblanca madura.

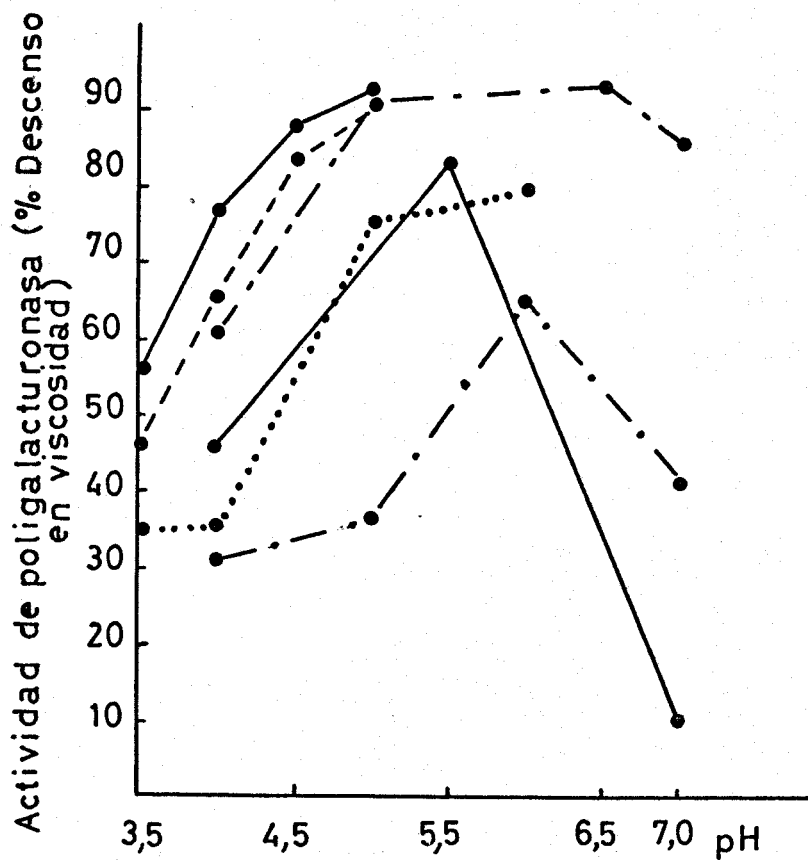


TABLA XXXVII

Influencia del valor de pH sobre la actividad de poligelacturonasa (% Descenso en viscosidad) de las fracciones obtenidas por diálisis.

Extracto nº	Fracción diálisis	Valor de pH						
		3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
1	P	3,6	12,0	5,1	-	1,1	-	-
	S	44,2	48,6	82,1	-	Gel	-	-
2	P	-	40,6	34,6	-	10,4	-	-
	S	-	84,2	91,7	-	Gel	-	-
3	P	-	1,1	0,3	-	0,0	-	0,0
	S	-	30,9	36,3	-	63,5	-	45,0
4	P	5,7	15,7	11,4	-	7,3	-	-
	S	-	36,8	65,0	75,8	86,8	80,2	60,1

P = precipitado S = sobrenadante

GRAFICO 9.- Influencia del valor de pH sobre la actividad de poligalacturonasa presente en el precipitado obtenido por diálisis.

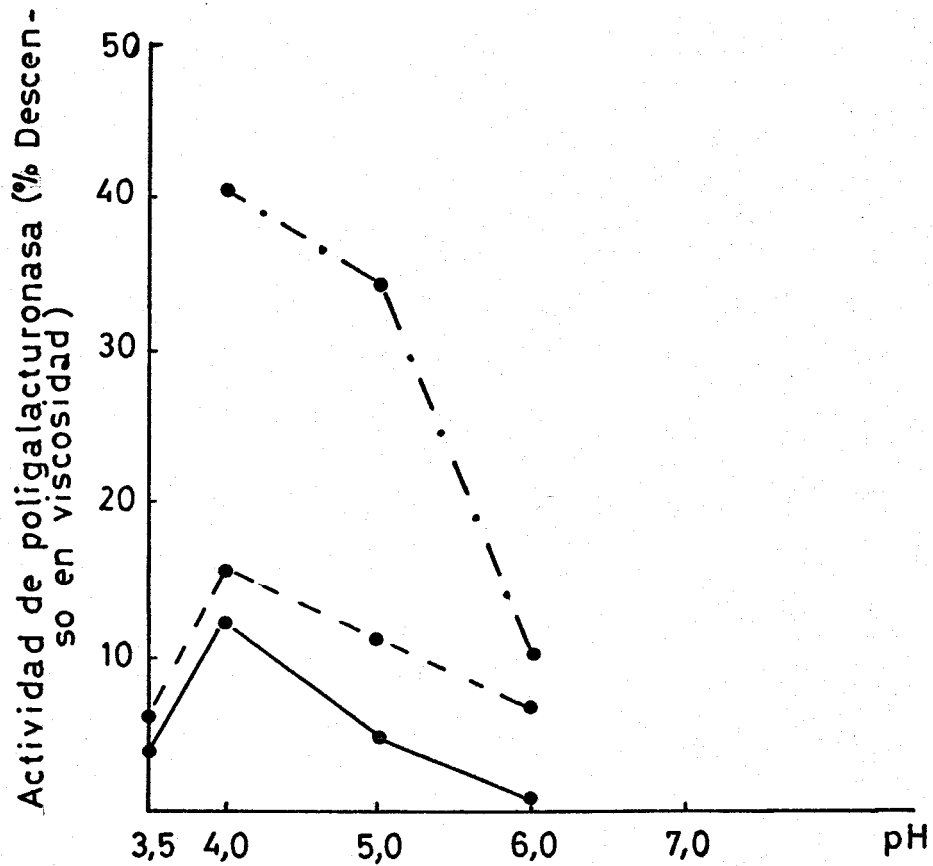
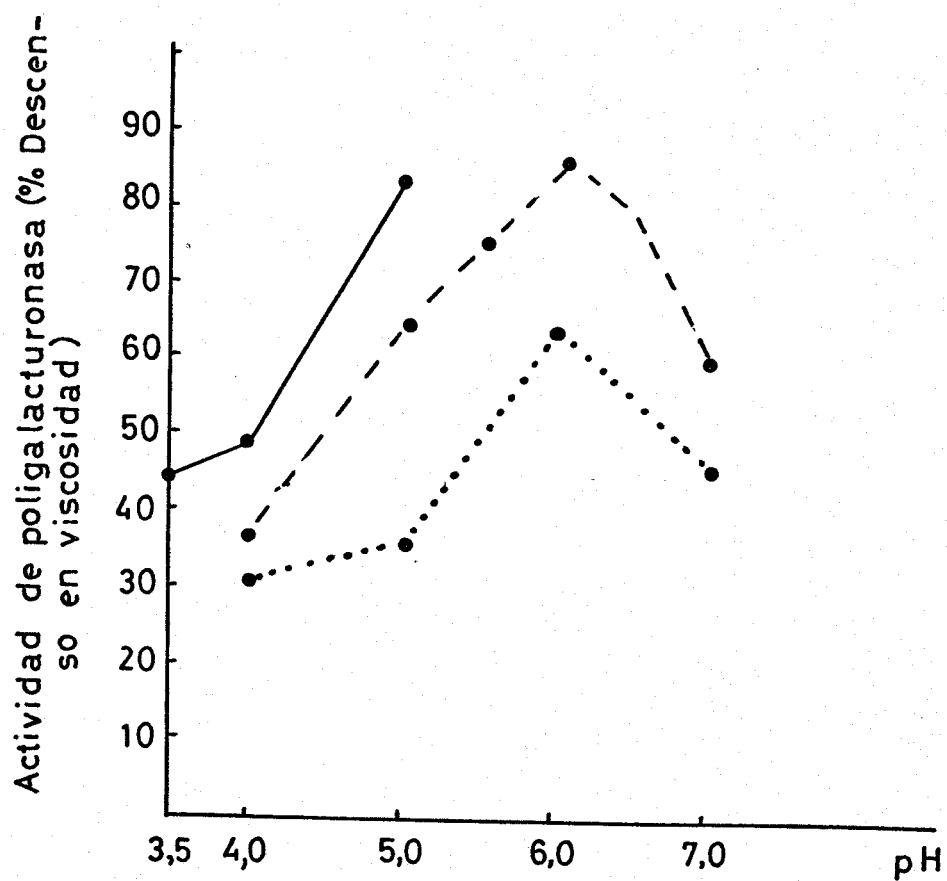


GRAFICO 10.-Influencia del valor de pH sobre la actividad de poligalacturonasa presente en el sobrenadante obtenido por diálisis.



Este hecho lo demuestra no solo el distinto comportamiento de ausencia de sales, ya comentado anteriormente, sino también la diferente variación de la actividad con el valor de pH, ya que mientras la poligalacturonasa del precipitado tiene su pH óptimo alrededor de 4,0 unidades la del sobrenadante lo presenta a 6,0 unidades aproximadamente. La coincidencia entre el valor de pH óptimo de ésta última fracción y el del extracto bruto antes de la diálisis, ratifica la mayor importancia cuantitativa de la actividad del sobrenadante, ya apuntada anteriormente.

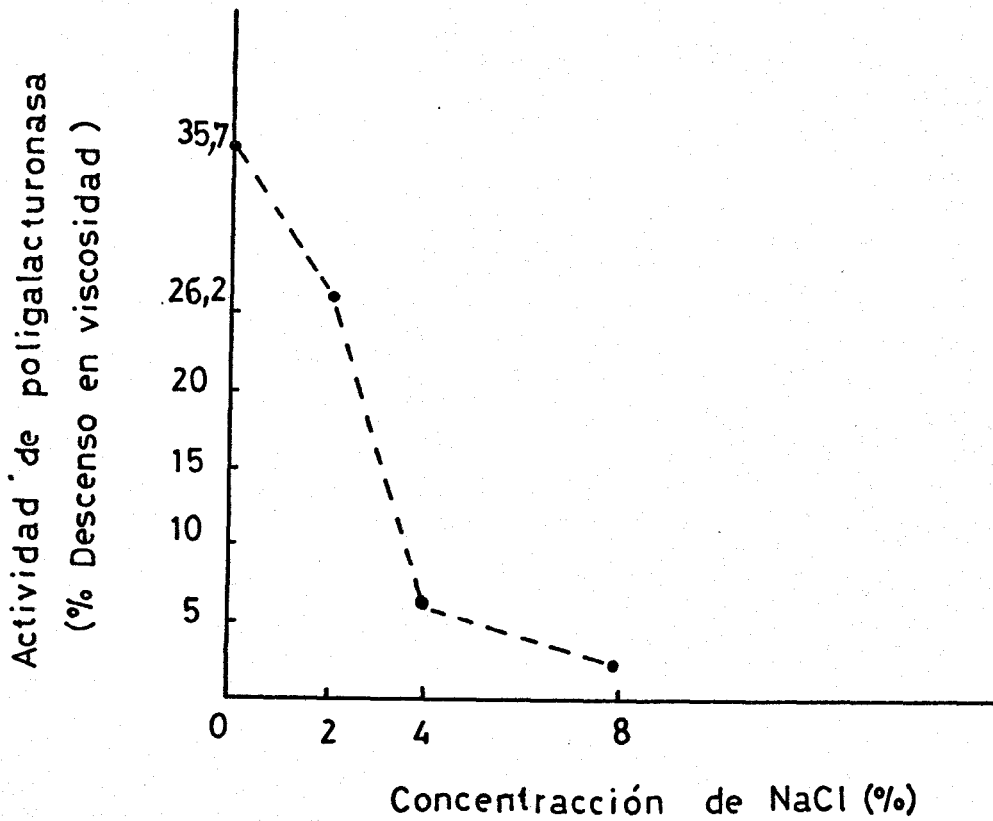
Efecto del cloruro sódico.

Con objeto de comprobar si la poligalacturonasa de la aceituna puede actuar o no a los niveles de sal utilizados en la fermentación, se ha estudiado la actividad de los extractos enzimáticos en presencia de diferentes concentraciones de cloruro sódico.

Los resultados obtenidos, correspondientes a un extracto típico de aceitunas sin dializar medido a un valor de pH de 4,0 unidades, se representa en el Gráfico 11, en el cual puede verse que la actividad disminuye rápidamente con la concentración de la sal presente en la solución de pectina utilizada como sustrato, siendo suficiente que se encuentre al 8 % para reducirla hasta aproximadamente un 5 % del valor obtenido cuando no hay cloruro sódico en dicho sustrato.

Un estudio similar se ha realizado, después de la diálisis de los extractos enzimáticos, con las isoenzimas presentes en el sobrenadante y precipitado obtenidos en esta operación. Los resultados indican que ambas son afectadas por la concentración de cloruro sódico, aunque en distinto grado cada una de ellas, como puede compro-

GRAFICO 11.-Influencia de la concentración de NaCl sobre la actividad de poligalacturonasa del extracto de aceituna Hojiblanca madura a un valor de pH de 4,0 unidades.



barse en la Tabla XXXVIII y Gráfico 12. Se han utilizado como valores de pH en la incubación los óptimos para cada una de las isoenzimas, de 4 y 6 unidades para el precipitado y sobrenadante, respectivamente. En estas condiciones, para una concentración de cloruro sódico del 4 % la enzima del precipitado es ya totalmente inactiva, mientras que la del sobrenadante, cuantitativamente más importante en los dos extractos estudiados, conserva, incluso en presencia de un 8 % de cloruro sódico más del 50 % de su actividad original en ausencia de sal.

Estos resultados inducen a pensar que el efecto inhibitor del cloruro sódico para la fracción sobrenadante es muy inferior al que presenta el extracto no sometido a diálisis y en el cual se encuentran presentes ambas isoenzimas (Gráficos 11 y 12).

Sin embargo, hay que tener presente que el valor de pH utilizado en estos ensayos ha sido de 4 y 6 unidades respectivamente, lo cual podría ser la causa del distinto efecto que sobre la enzima muestra el cloruro sódico.

Por ello se investigó el comportamiento de la isoenzima presente en el sobrenadante a un valor de pH de 4 unidades, análogo al empleado en extractos sin dializar y a distintos niveles de sal.

Los resultados obtenidos, Gráfico 13, demuestran que a este valor de pH, la actividad de la poligalacturonasa del sobrenadante, sigue una marcha paralela a la observada en aquellos extractos, y que a un 6 % de cloruro sódico es ya prácticamente inactiva.

Se pone de manifiesto así el importante papel que desempeña el efecto combinado del cloruro sódico y pH para evitar la acción de la poligalacturonasa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que

TABLA XXXVIII

Influencia de la concentración de cloruro sódico sobre la actividad de poligalacturonasa de las fracciones obtenidas por diálisis de los extractos enzimáticos de aceituna Hojiblanca madura.

<u>Extracto nº</u>	<u>Fracción diálisis</u>	<u>Valor de pH</u>	<u>Concentración de cloruro sódico</u>				
			<u>0%</u>	<u>2%</u>	<u>4%</u>	<u>6%</u>	<u>8%</u>
1	P	4,0	2,8	0,0	0,0	-	-
	S	6,0	73,4	69,5	65,6	60,4	48,1
2	P	4,0	8,7	2,7	0,0	0,0	-
	S	6,0	74,0	69,3	62,8	51,5	48,3

P = precipitado

S = sobrenadante

GRAFICO 12.- Efecto del NaCl sobre la actividad de poligalacturonasa de las fracciones obtenidas por diálisis de los extractos enzimáticos de aceituna Hojiblanca madura.

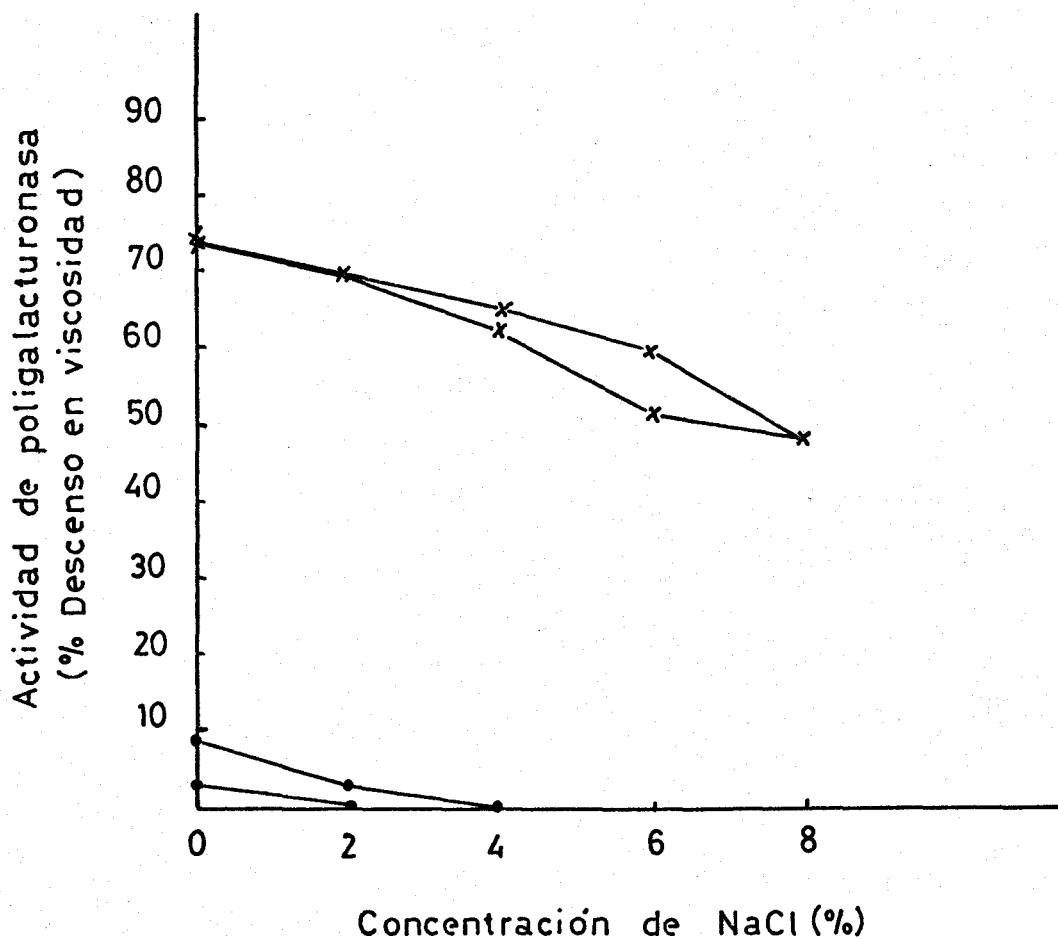
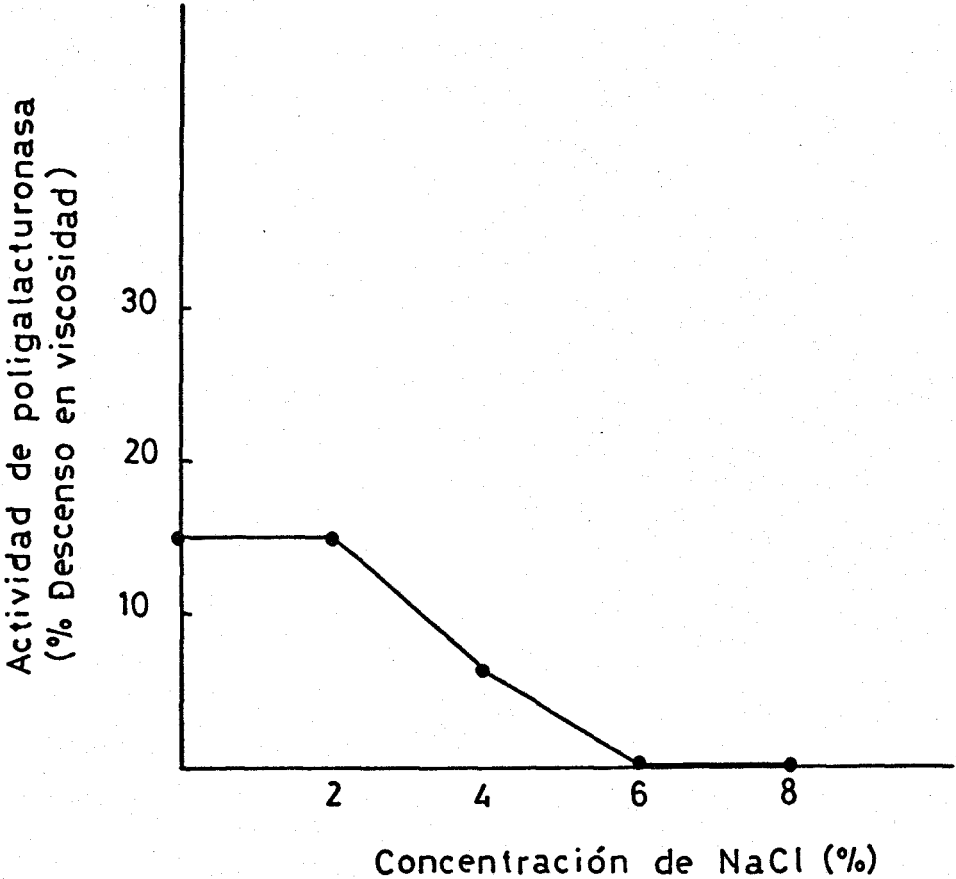


GRAFICO 13. - Efecto del NaCl sobre actividad de poligalacturonasa en la fracción sobrenadante a pH 4,0.



las enzimas pueden actuar afectando los materiales pécticos durante el periodo previo al equilibrio fruto-salmuera. Es necesario destacar que una de las isoenzimas mencionadas se encuentra en condiciones óptimas de actividad y que además una actividad residual de la enzima, cuantitativamente poco importante, puede tener en cambio un gran significado a largo plazo dado los prolongados periodos en los cuales actua durante la fermentación y conservación.

Inhibidores presentes en la aceituna.

El hecho de que los extractos de poligalacturonasa obtenidos directamente de la pulpa de aceitunas no presenten actividad (apartado 4.2.3.) parece indicar que durante los lavados con agua destilada, que se llevan a cabo en la preparación de las soluciones enzimáticas por el método habitual, se eliminan sustancias inhibidoras de dicha enzima, las cuales, una vez aisladas y caracterizadas, podrían utilizarse de la forma más conveniente en la posterior elaboración de la aceituna para evitar la degradación de la pectina.

Para investigar esta hipótesis se plantean inicialmente experiencias que consisten en incubar durante 72 horas a 30° C 25 ml de solución de pectina al 2 %, utilizada como sustrato, con 5 ml del extracto enzimático, añadiendo 5 ml de solución inhibidora obtenida por trituración de las aceitunas deshuesadas con agua destilada y posterior filtración.

Este filtrado puede extraerse con hexano y acetato de etilo para eliminar los lípidos presentes sin afectar sensiblemente los resultados.

Paralelamente se preparan, como referencia, muestras sustituyendo la solución inhibidora por igual cantidad de agua destilada al objeto de mantener la dilución final. En todos y cada uno de los ensayos se dispusieron los blancos correspondientes con 5 ml de la solución enzimática previamente inactivada, como ya se ha indicado anteriormente, por calentamiento en baño maría a 80° C durante 10 minutos.

El desarrollo de las experiencias puede esquematizarse de la forma siguiente:

	<u>Solución pectina 2 %</u>	<u>Extracto enzimático</u>	<u>Blanco</u>	<u>Agua destilada</u>	<u>Solución inhibidora</u>
Muestra	25 ml	5 ml	-	5 ml	-
Blanco	25 ml	-	5 ml	5 ml	-
Muestra	25 ml	5 ml	-	-	5 ml
Blanco	25 ml	-	5 ml	-	5 ml

Los resultados obtenidos con tres extractos diferentes en estos ensayos fueron los siguientes:

<u>Extracto nº</u>	<u>% Descenso en viscosidad</u>		<u>% Inhibición</u>
	<u>Con inhibidor</u>	<u>Sin inhibidor</u>	
I	17,6	20,3	13,3
II	37,7	41,7	9,4
III	77,9	85,1	8,5

Si bien la actividad de poligalacturonasa se reduce solo en un 10 % aproximadamente, hay que tener en cuenta que en la solución utilizada la concentración de las sustancias inhibidoras es muy inferior a la que se presenta en la pulpa del fruto.

Una vez demostrada la existencia en la aceituna de inhibidores naturales que se extraen fácilmente con agua destilada, se han dializado alpechín y extractos obtenidos directamente de la pulpa sin lavados previos. Las incubaciones realizadas mostraron que ni en uno ni en otro caso existía actividad enzimática antes de la diálisis. Después de ella, tanto el sobrenadante como el precipitado presentan actividad como puede verse por los resultados que se dan a continuación:

Muestra	% Descenso en viscosidad		
	Extracto bruto	Alpechín	
		Muestra 1	Muestra 2
Antes diálisis	0,0	0,0	0,0
Precipitado	34,0	15,3	51,6
Sobrenadante	39,3	29,6	78,7

Los valores obtenidos confirman la existencia de sustancias inhibitoras que, por eliminarse durante la diálisis deben poseer bajo peso molecular, lo que explica los incrementos de actividad enzimática que generalmente ocurren durante esta operación.

Posteriormente, para estudiar la naturaleza, competitiva o no, de la inhibición se investiga la variación que experimenta la actividad enzimática con la concentración de sustrato en presencia y ausencia de inhibidor.

La experiencia se efectúa según el esquema siguiente:

<u>Concentración de la solución de pectina (25 ml)</u>	<u>Extracto enzimático</u>	<u>Blanco</u>	<u>Agua destilada</u>	<u>Solución inhibidora</u>
0,75 %	5 ml	-	5 ml	-
0,75 %	-	5 ml	5 ml	-
1,50 %	5 ml	-	5 ml	-
1,50 %	-	5 ml	5 ml	-
2,00 %	5 ml	-	5 ml	-
2,00 %	-	5 ml	5 ml	-
2,50 %	5 ml	-	5 ml	-
2,50 %	-	5 ml	5 ml	-
0,75 %	5 ml	-	-	5 ml
0,75 %	-	5 ml	-	5 ml
1,50 %	5 ml	-	-	5 ml
1,50 %	-	5 ml	-	5 ml
2,00 %	5 ml	-	-	5 ml
2,00 %	-	5 ml	-	5 ml
2,50 %	5 ml	-	-	5 ml
2,50 %	-	5 ml	-	5 ml

Inicialmente se realiza el estudio con un extracto enzimático sin dializar y en el Gráfico 14 se representa el porcentaje de descenso en viscosidad frente a la concentración de sustrato en presencia y ausencia de inhibidor. Posteriormente se realizan experiencias similares con las fracciones de precipitado y sobrenadante obtenidos por diálisis (Gráficos 15 y 16) y con un extracto enzimático sin dializar en el cual en otro estudio realizado en paralelo se comprobó

GRAFICO 14.- EXPERIENCIA DE INHIBICION EN EL
EXTRACTO ENZIMATICO

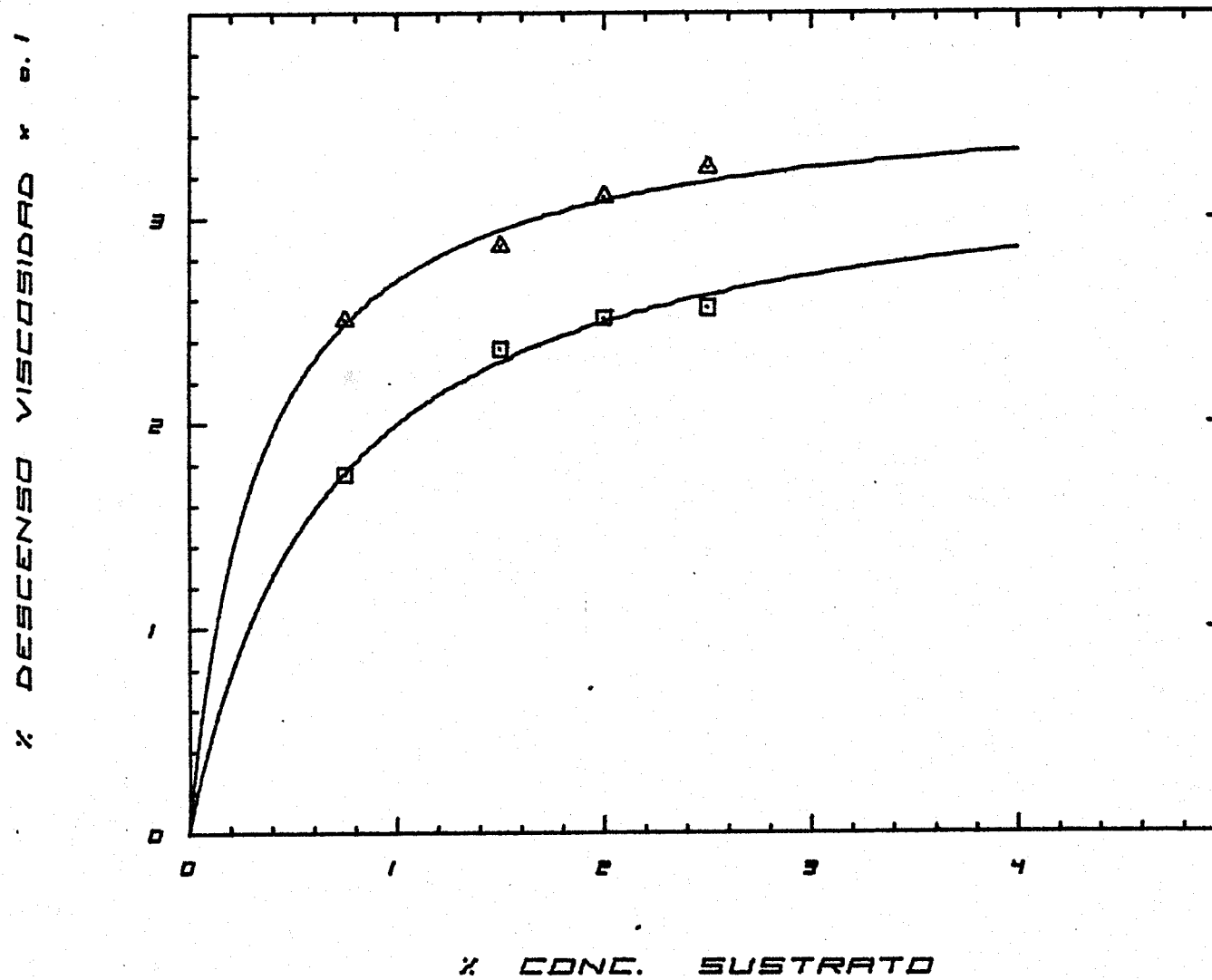


GRAFICO 15.- EXPERIENCIA DE INHIBICION EN EL

PRECIPITADO DE LA DIALISIS

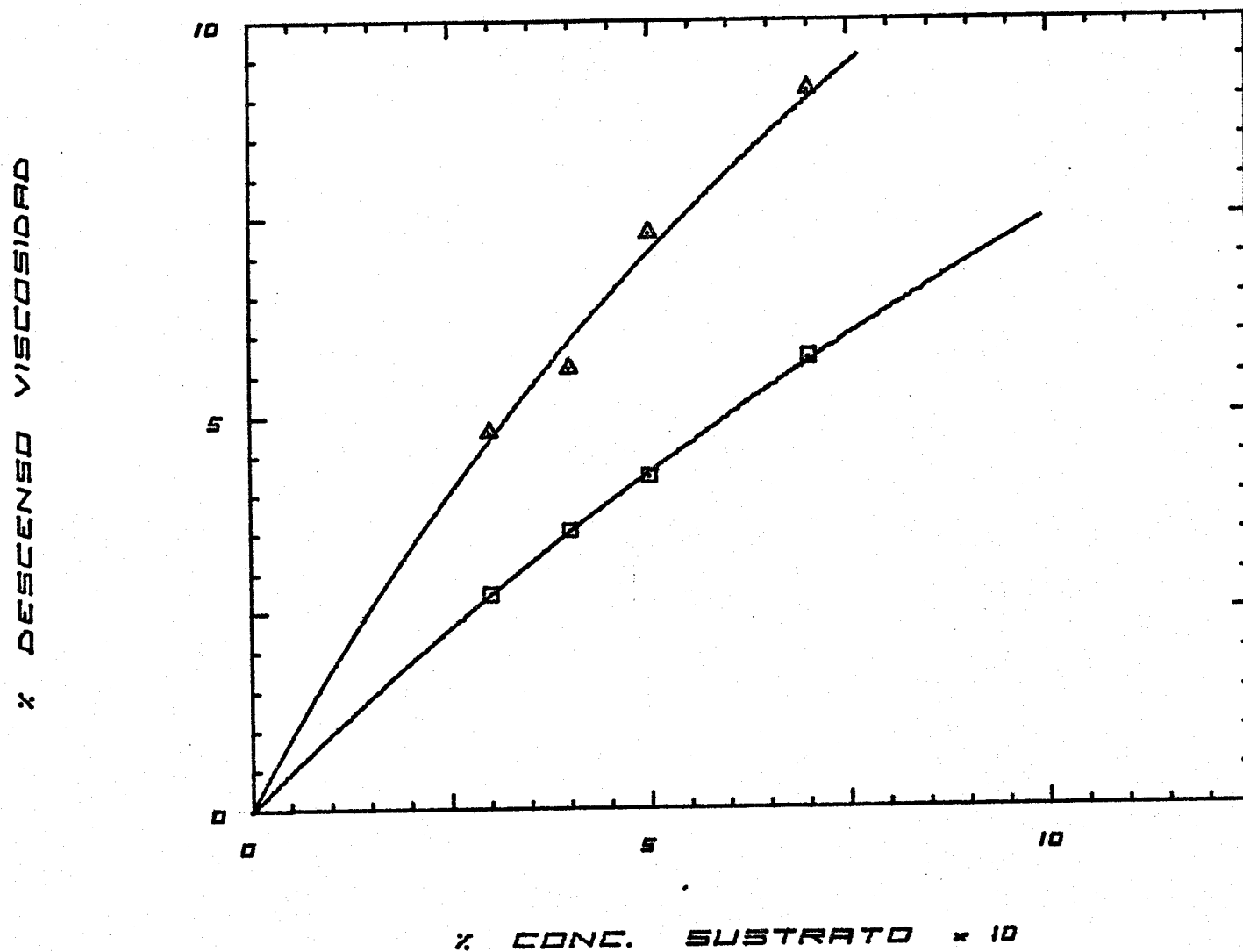
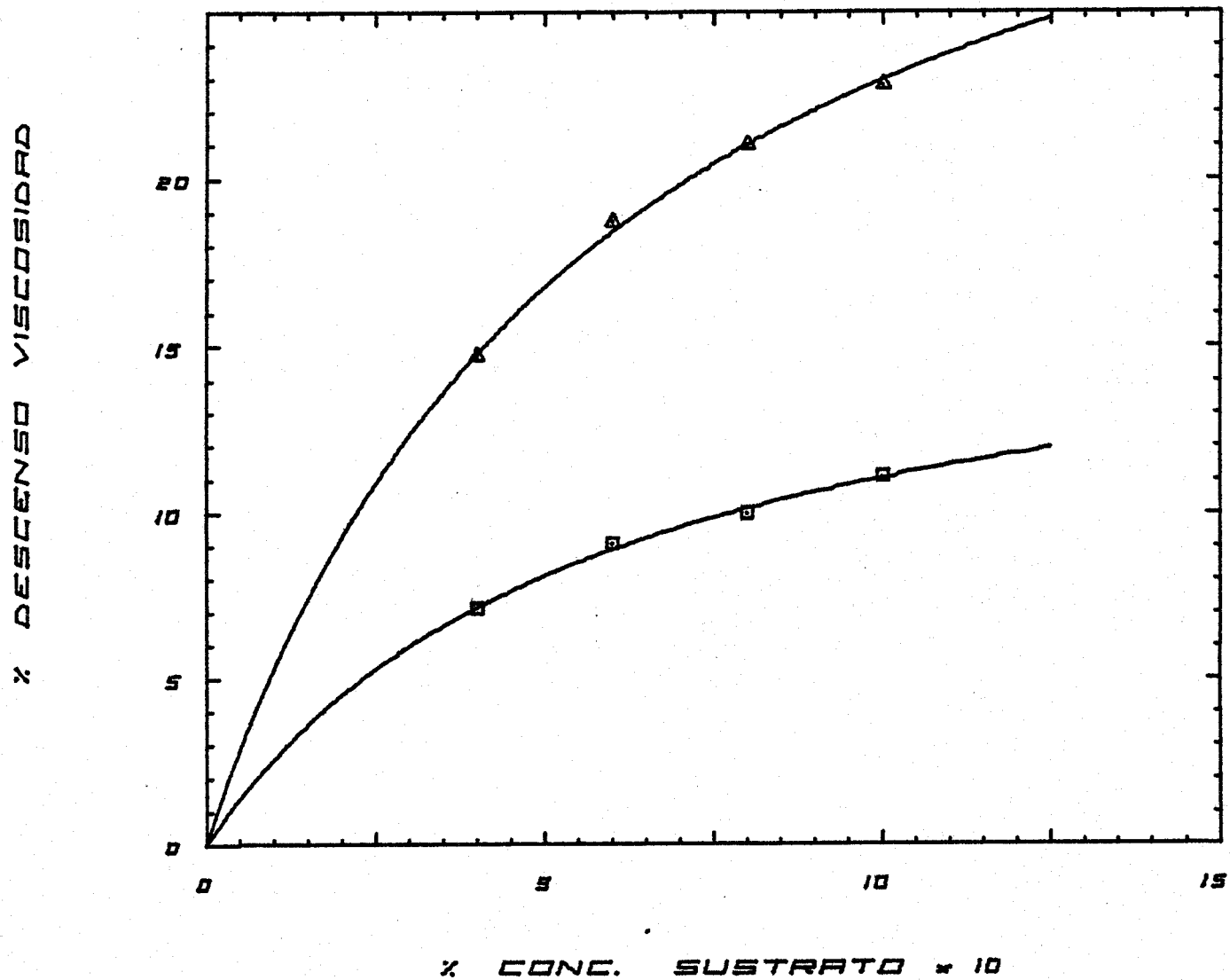


GRAFICO 16. - EXPERIENCIA DE INHIBICION EN EL SOBRENADANTE DE LA DIALISIS



por diálisis que no tenía actividad en el precipitado por lo que toda la actividad medida puede atribuirse a la isoenzima del sobrenadante (Gráfico 17).

Puede observarse en todos los casos que el porcentaje de descenso en viscosidad se incrementa con la concentración de sustrato hasta aproximarse de modo asintótico a un máximo para el cual la enzima se encuentra saturada por dicho sustrato. La representación es por tanto de tipo hiperbólico y demuestra que ambas isoenzimas de la poligalacturonasa siguen una cinética de Michaelis-Menten. En el intervalo utilizado para las determinaciones el porcentaje de descenso en viscosidad corresponde a una medida de la velocidad de reacción ya que depende directamente del número de enlaces glicosídicos hidrolizados durante el tiempo de incubación constante de 72 horas.

Puesto que ambas isoenzimas siguen una cinética típica de saturación, para investigar que tipo de inhibición tiene lugar, se aplica la transformación algebraica de la ecuación de Michaelis-Menten debida a Lineweaver-Burk con lo que puede ponerse en la forma:

$$\frac{1}{d} = \frac{K_M}{D} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{D}$$

donde:

d = % descenso en viscosidad.

D = % descenso en viscosidad máximo.

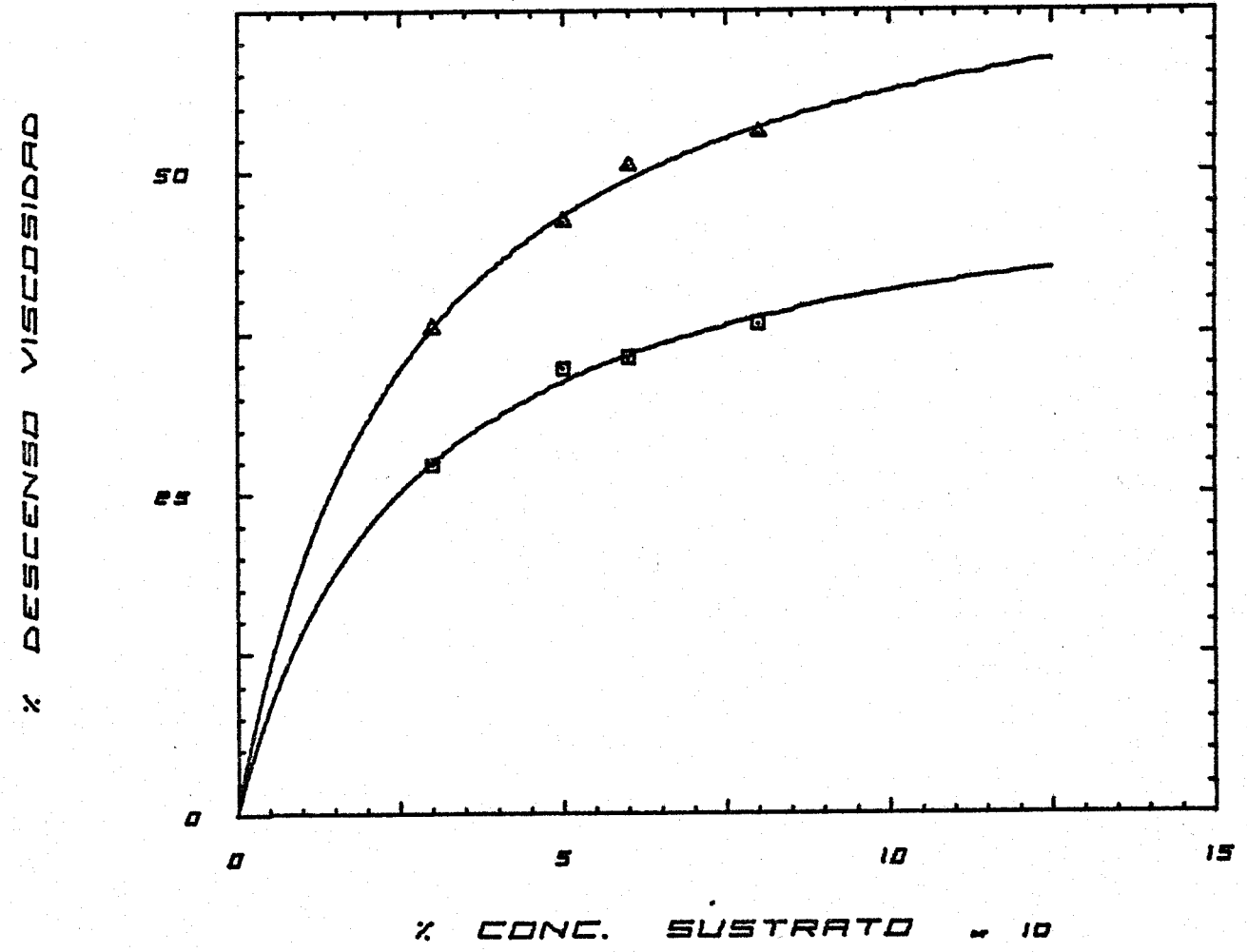
$[S]$ = Concentración de sustrato.

K_M = Constante de Michaelis-Menten.

Esta ecuación, cuando se representa en abcisas $1/S$ y en ordenadas $1/d$, corresponde a una línea recta cuya pendiente es K_M/D y su

GRAFICO 17.- EXPERIENCIA DE INHIBICION EN EL

SOBRENADANTE < CONC. NaCl 0.28 % >



intersección con el eje $1/d$ es la inversa del porcentaje de descenso máximo en viscosidad. La intersección sobre la abscisa en esta representación de Lineweaver-Burk es $-1/K_M$.

En la Tabla XXXIX se incluyen, con las transformaciones adecuadas para su representación (Gráfico 18), los resultados obtenidos, a pH 4,0, con el extracto enzimático sin diálisis previa que contiene ambas isoenzimas y una concentración final de cloruro sódico del 0,28 % y cuya actividad se representó, frente a la concentración de sustrato, en el Gráfico 14.

De la observación del mencionado Gráfico 18, en el que se encuentran representadas las líneas de regresión correspondientes a estos valores, no pueden obtenerse deducciones acerca del tipo de inhibición que tiene lugar, ya que éste no se ajusta a ninguno de los modelos, sea o no competitivo.

Para la isoenzima del precipitado se realiza un estudio similar, igualmente a pH = 4,0, cuyos resultados se presentan en la Tabla XL.

Las líneas de regresión obtenidas, en presencia y ausencia de inhibidor, al representar al inverso del descenso en viscosidad frente a la inversa de la concentración se dan en el Gráfico 19. Esta representación, doblemente recíproca, nos permite establecer, el valor de las constantes de la fórmula de Michaelis-Menten así como el tipo de inhibición experimentado por la enzima.

En nuestras condiciones experimentales (30° C; pH = 4,0; NaCl 0,28 %) la K_M de la isoenzima del precipitado, puesto que el punto de corte con el eje de abscisas en ausencia de inhibidor se encuentra en $-0,656$ tiene un valor de 1,53 %.

TABLA XXXIX

Variación de la actividad de poligalacturonasa en el extracto enzimático, con la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de inhibidor. (pH = 4,0; Temperatura = 30°C; Concentración NaCl = 0,28 %).

<u>c</u>	<u>1/c</u>	<u>d</u>	<u>d_I</u>	<u>1/d</u>	<u>1/d_I</u>
0,75	1,33	25,00	17,50	0,040	0,057
1,50	0,67	28,60	23,60	0,035	0,042
2,00	0,50	31,00	25,10	0,032	0,040
2,50	0,40	32,40	25,60	0,031	0,039

c = Concentración de la solución de pectina utilizada como sustrato (%)

d = Porcentaje de descenso en viscosidad en ausencia de inhibidor

d_I = Porcentaje de descenso en viscosidad en presencia de inhibidor

GRAFICO 18.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER - BURK
PARA EL EXTRACTO ENZIMATICO

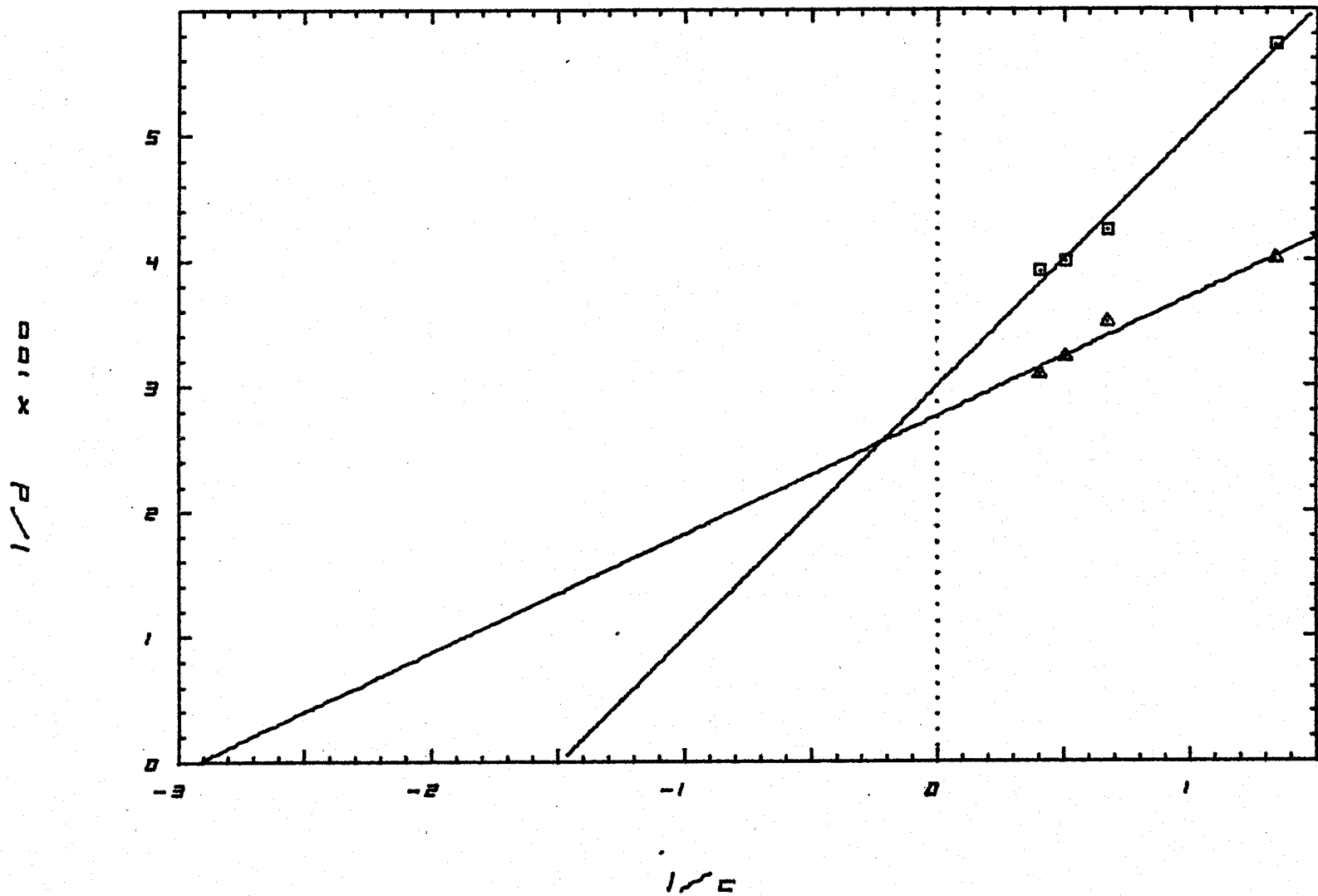


TABLA XL

Variación de la actividad de poligalacturonasa en el precipitado obtenido por diálisis, con la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de inhibidor. (pH = 4,0; Temperatura = 30° C; Concentración NaCl = 0,28 %).

<u>c</u>	<u>1/c</u>	<u>d</u>	<u>d_I</u>	<u>1/d</u>	<u>1/d_I</u>
0,30	3,33	4,80	2,73	0,208	0,366
0,40	2,50	5,60	3,54	0,179	0,282
0,50	2,00	7,30	4,24	0,137	0,236
0,70	1,43	9,10	5,73	0,110	0,175

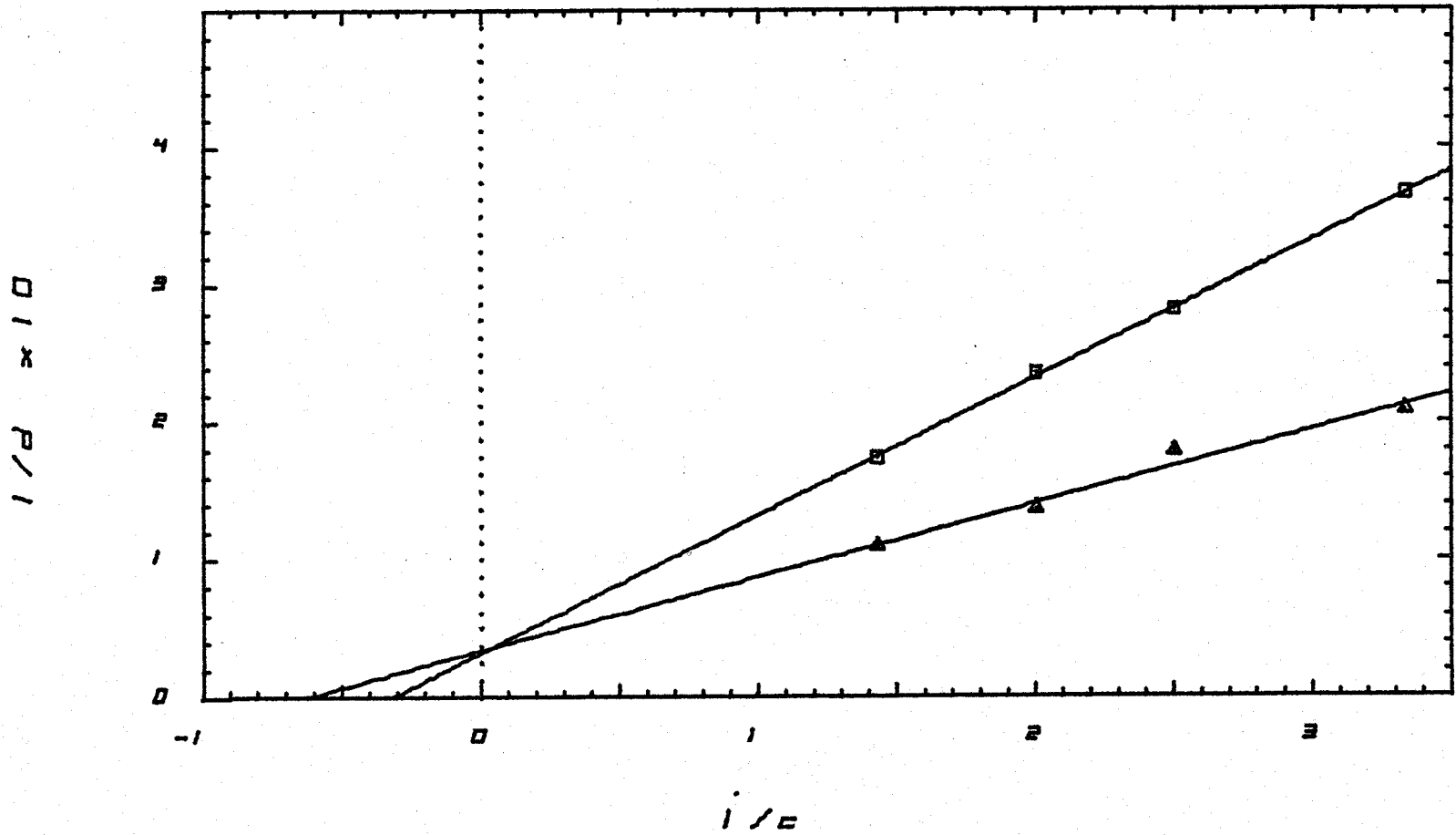
c = Concentración de la solución de pectina utilizada como sustrato (%)

d = Porcentaje de descenso en viscosidad en ausencia de inhibidor

d_I = Porcentaje de descenso en viscosidad en presencia de inhibidor

GRAFICO 19.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK

PARA LA P.G. DEL PRECIPITADO



El punto de corte de esta misma recta con el eje de ordenadas nos dá un valor para el inverso del descenso máximo en viscosidad igual a 0,035 por lo que dicho máximo se encuentra a 28,61 %. Respecto a la inhibición de la isoenzima del precipitado puede observarse que las rectas correspondientes a la representación de $1/d$ frente a $1/c$ en presencia y ausencia del inhibidor coinciden prácticamente en el punto de corte sobre el eje de ordenadas por lo que la inhibición es competitiva. El inhibidor debe reaccionar con la enzima en el centro normal de unión del sustrato ocupando el lugar de este e impidiendo así la formación del complejo enzima-sustrato y el porcentaje de inhibición es función de la relación entre las concentraciones de inhibidor y sustrato, más bien que de la concentración absoluta del inhibidor por sí solo. En realidad, el porcentaje de descenso máximo en viscosidad no se altera prácticamente por la presencia de este inhibidor competitivo pero la K_M aparente se incrementa hasta 3,03 % (abcisa en el origen - 0,330).

En el caso del sobrenadante la representación de $1/d$ frente a $1/c$ en presencia y ausencia de inhibidor cuyos valores se presentan en la Tabla XLI se ha realizado en el Gráfico 20.

De los puntos de corte de la recta obtenida en ausencia de inhibidor podemos deducir la K_M y el porcentaje de descenso máximo en viscosidad.

La constante de Michaelis-Menten tiene para esta isoenzima un valor de 0,59 % (pH = 4,0; 30° C; ausencia de sales) correspondiente a una abcisa en el origen de - 1,698.

Puesto que $1/D$, ordenada en el origen vale 0,0274 el porcentaje de descenso máximo en viscosidad es de 36,54 %.

TABLA XLI

Variación de la actividad de poligalaturonasa en el sobrenadante obtenido por diálisis, con la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de inhibidor. (pH = 4,0; Temperatura = 30° C; Concentración de NaCl = 0 %).

<u>c</u>	<u>1/c</u>	<u>d</u>	<u>d_I</u>	<u>1/d</u>	<u>1/d_I</u>
0,40	2,50	14,70	7,14	0,068	0,140
0,60	1,67	18,70	9,09	0,053	0,110
0,80	1,25	21,10	10,00	0,048	0,100
1,00	1,00	22,80	11,11	0,044	0,090

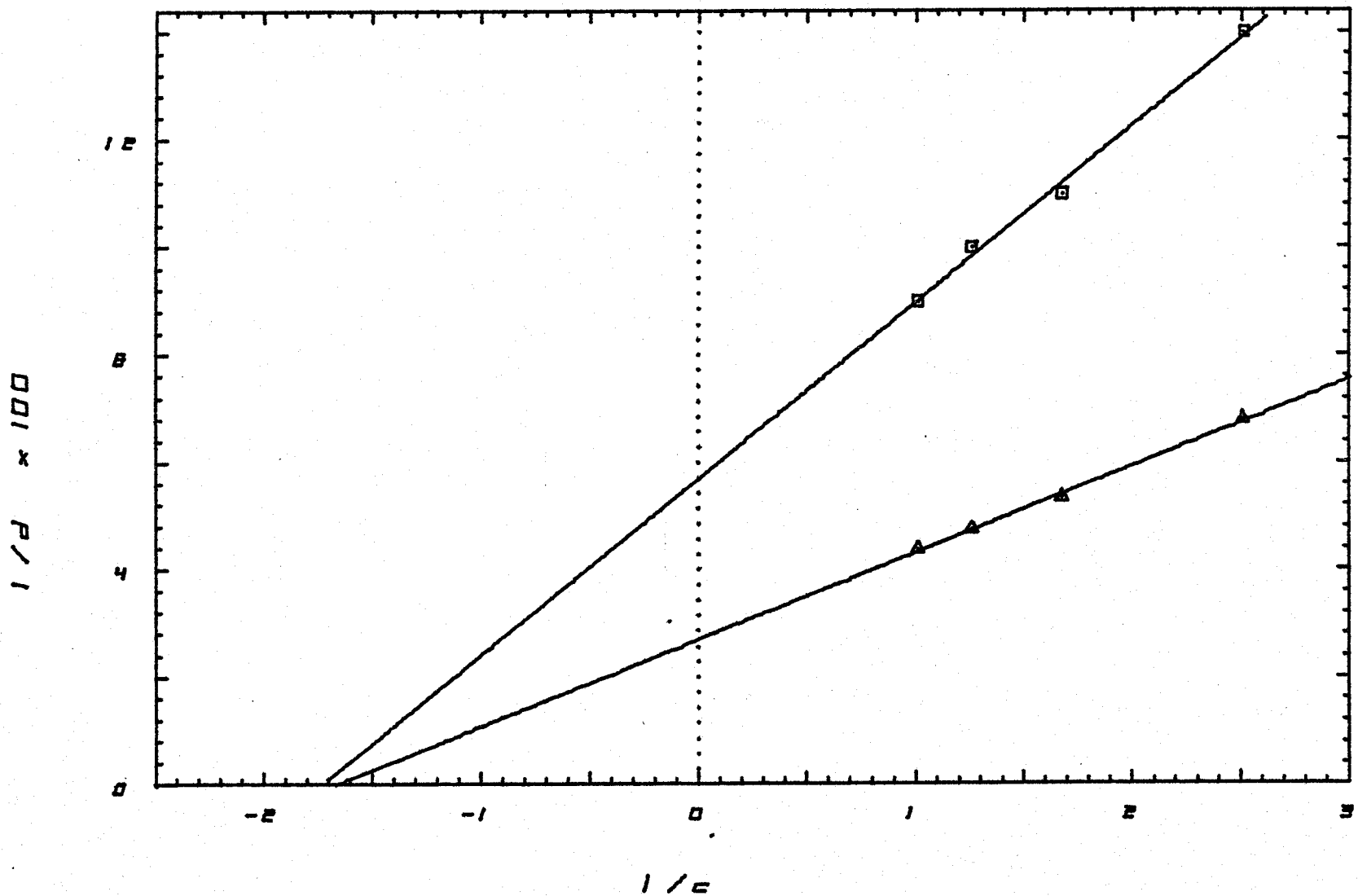
c = Concentración de la solución de pectina utilizada como sustrato(%)

d = Porcentaje de descenso en viscosidad en ausencia de inhibidor

d_I = Porcentaje de descenso en viscosidad en presencia de inhibidor

GRAFICO 20.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER - BURK

PARA LA P. G. DEL SOBRENADANTE



Según el significado teórico de la K_M , a esta concentración de sustrato se alcanza la mitad del descenso máximo; puede observarse que en la práctica para el 0,60 % de concentración de pectina, valor muy próximo a la K_M obtenida, el descenso medido es 18,70 % que corresponde aproximadamente a la mitad del descenso máximo en viscosidad calculado.

En la experiencia de inhibición se demuestra que, a diferencia de la isoenzima del precipitado, es de tipo no competitiva. En efecto, ambas rectas coinciden prácticamente sobre el eje de abscisas; este tipo de inhibición no resulta invertida por un aumento en la concentración de sustrato.

El punto de corte con el eje de ordenadas lógicamente es diferente para ambas rectas y está situado en presencia de inhibidor en 0,0574, lo que indica que D vale en este caso 17,42 % mucho menor que cuando no hay inhibidor presente.

En este tipo de inhibición los descensos máximos en viscosidad, en presencia (D) y ausencia (D') de inhibidor se relacionan por las fórmulas:

$$\frac{1}{D'} = \frac{1}{D} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

en la que $[I]$ representa la concentración del inhibidor y K_i la constante de inhibición.

Sustituyendo en la fórmula anterior D y D' por sus correspondientes valores se calcula la relación:

$$\frac{(I)}{K_i} = \frac{0,0573}{0,0273} - 1 = 1,09$$

Estos resultados presentados para ambas isoenzimas no son exactamente comparables al estar realizados los ensayos correspondientes al precipitado a un 0,28 % de concentración final de sal y los del sobrenadante en ausencia de ella. No obstante, se ha realizado un estudio análogo a los anteriores con el extracto enzimático sin dializar cuya representación de actividad frente a concentración de sustrato se presentó en el gráfico 17. Como se indicó entonces, en otro estudio realizado en paralelo se comprobó que este extracto no tenía actividad de poligalacturonasa en el precipitado por lo que todo el descenso en viscosidad puede atribuirse a la acción de la isoenzima del sobrenadante. Por tanto, los valores que se presentan en la Tabla XLII corresponden a dicha isoenzima del sobrenadante en presencia de una concentración de cloruro sódico de 0,28 %, igual a la utilizada en el caso del precipitado.

En el gráfico 21 se realiza la representación doblemente recíproca para este extracto; en él puede verse que la ordenada en el origen en ausencia de inhibidor es 0,014 que corresponde a un descenso máximo en viscosidad de 71,09 %. Este valor es muy distinto al calculado anteriormente para la isoenzima del sobrenadante no sólo porque se encuentra en diferentes condiciones en este caso sino también porque se trata de extractos distintos y por tanto no poseen la misma concentración de la enzima.

TABLA XLII

Variación de la actividad de poligalacturonasa del sobrenadante con la concentración de sustrato, en presencia y ausencia de inhibidor. (pH = 4,0; Temperatura = 30° C; Concentración NaCl = 0,28 %):

<u>c</u>	<u>1/c</u>	<u>d</u>	<u>d_I</u>	<u>1/d</u>	<u>1/d_I</u>
0,30	3,33	37,87	27,30	0,0264	0,0366
0,50	2,00	46,07	34,74	0,0217	0,0288
0,60	1,67	50,43	35,58	0,0198	0,0281
0,80	1,25	52,99	38,21	0,0189	0,0262

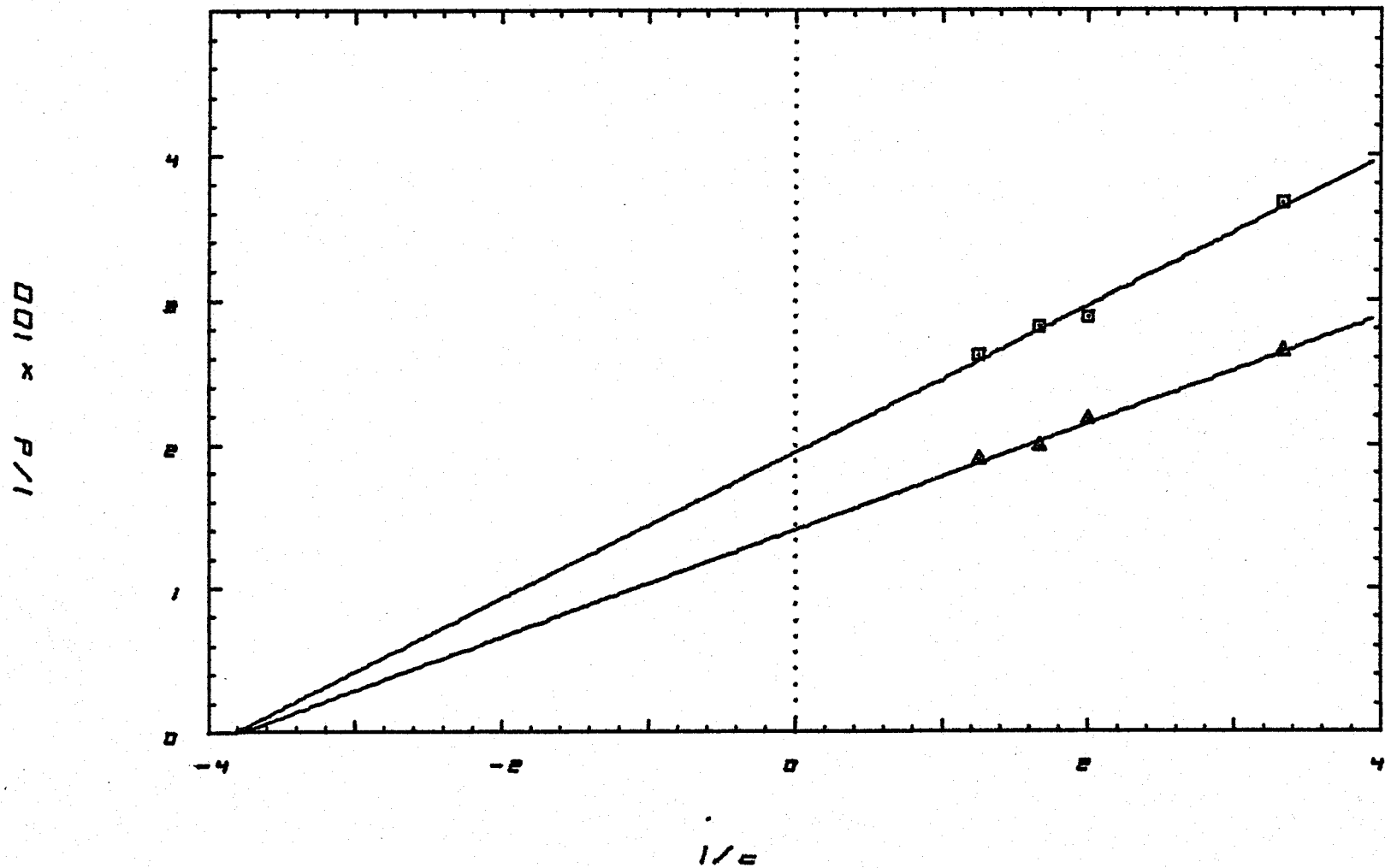
c = Concentración de la solución de pectina utilizada como sustrato (%)

d = Porcentaje de descenso en viscosidad en ausencia de inhibidor

d_I = Porcentaje de descenso en viscosidad en presencia de inhibidor

GRAFICO 21.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK

PARA LA P.G. DEL SOBRENADANTE < N.º CL 0.28 % >



De mayor interés es la determinación de la constante K_M ya que no depende de la concentración de la enzima presente en el extracto. La abcisa en el origen tiene un valor de 3,802 por lo cual K_M en estas condiciones ($\text{pH} = 4,0$; temp. 30°C ; $\text{ClNa } 0,28 \%$) corresponde a una concentración de pectina del $0,26 \%$. Es necesario resaltar que este valor es notablemente más bajo que el obtenido en total ausencia de sal después de la diálisis lo que nos indica una mayor afinidad de la isoenzima del sobrenadante por la pectina en estas condiciones y por tanto una mayor eficacia en su papel catalítico. Esta mayor afinidad puede deberse bien a la existencia de alguna sustancia que actúe como coenzima bien a la presencia del cloruro sódico que a la baja concentración empleada podría activar a la enzima, en cuyo caso tendría importancia en una primera etapa de la elaboración, tras la colocación del fruto en salmuera, durante la cual el cloruro sódico se difunde lentamente desde dicha salmuera hasta la pulpa y se encuentra a baja concentración en el interior del fruto.

Comparativamente, la isoenzima del sobrenadante posee, tanto en ausencia como en presencia de sal, un valor de K_M inferior a la del precipitado que nos permite deducir una mayor afinidad por el sustrato de aquella isoenzima y una mayor eficacia catalítica a bajas concentraciones de pectina.

En presencia de inhibidor el descenso máximo en viscosidad se reduce hasta un $51,40 \%$ (correspondiente a una ordenada en el origen de $0,0195$) y puede verse, como en el estudio realizado en ausencia de sal, que ambas rectas coinciden igualmente sobre el eje de abcisas lo cual confirma la existencia de inhibición no competitiva.

Una vez concoidos los diferentes mecanismos de inhibición de las isoenzimas del sobrenadante y precipitado pueden explicarse fácilmente los resultados presentados en el gráfico 18 que corresponden a la resultante de las distintas inhibiciones experimentadas por ambas isoenzimas presentes en aquel extracto.

Como en el caso anterior podemos deducir que:

$$\frac{[I]}{K_i} = \frac{0,0195}{0,0140} - 1 = 0,39$$

Comparando este valor con el obtenido anteriormente para esta isoenzima del sobrenadante en ausencia de sal:

$$\frac{[I]}{K_i} = 1,09$$

y teniendo en cuenta que la concentración de inhibidor puede considerarse aproximadamente igual en ambos casos, se deduce que el valor de K_i es mayor antes de la diálisis, con un 0,28 % de sal presente, que después de realizada esta operación, en ausencia de cloruro sódico; por tanto, en estas condiciones la ausencia de iones influye disminuyendo la afinidad de la enzima por el inhibidor y haciendo por consiguiente menos eficaz la acción de éste.

Así pues, en la aceituna Hojiblanca madura existen sustancias con actividad inhibidora de la poligalacturonasa, solubles en agua y de bajo peso molecular, que de acuerdo con la información proporcionada por la bibliografía podrían estar relacionadas con polifenoles, compuestos que se encuentran en este fruto en concentración relativamente elevada..

Esta inhibición ocurre para cada una de las isoenzimas aisladas, procedentes probablemente una del fruto y otra de los microorganismos en él presentes, por un mecanismo diferente, de tipo competitivo para la isoenzima del precipitado, insoluble en ausencia de sales, y no competitivo para la del sobrenadante, de más baja K_M y por tanto de mayor afinidad por el sustrato.

A la vista de estos resultados se considera de gran interés la continuación del estudio para aislar e identificar estas sustancias con actividad inhibidora así como para investigar su localización y la de ambas isoenzimas con la finalidad de comprobar su acción y la posibilidad de añadirlas a las salmueras durante la fermentación y conservación de los frutos para evitar la degradación de sus constituyentes pécticos.

En la Tabla XLIII se presentan, finalmente, las líneas de regresión correspondientes a las experiencias de inhibición descritas en este apartado y realizadas con los extractos enzimáticos de distinta naturaleza objeto de esta investigación. Así mismo, se incluyen los coeficientes de correlación correspondientes a dichas líneas y su grado de significación.

TABLA XLIII

Líneas de regresión y coeficientes de correlación, correspondientes a las experiencias de inhibición, realizadas con distintos extractos enzimáticos.

<u>Naturaleza del extracto</u>	<u>Línea de regresión</u>	<u>Coefficiente de correlación</u>	<u>Grado de significación</u>
Sin dializar	$y = 0,009 x + 0,027$ $y' = 0,021 x + 0,030$	$r = 0,985$ $r = 0,995$	$0,02 > P > 0,01$ $0,005 > P > 0,001$
Precipitado	$y = 0,053 x + 0,030$ $y' = 0,100 x + 0,033$	$r = 0,987$ $r = 0,999$	$0,02 > P > 0,01$ $P < 0,001$
Sobrenadante	$y = 0,016 x + 0,027$ $y' = 0,033 x + 0,057$	$r = 0,999$ $r = 0,997$	$P < 0,001$ $0,003 > P > 0,001$
Sobrenadante (en presencia de 0,28 % NaCl)	$y = 0,004 x + 0,014$ $y' = 0,005 x + 0,019$	$r = 0,996$ $r = 0,993$	$0,004 > P > 0,001$ $0,01 > P > 0,001$

y = experiencia sin inhibidor.
 y' = experiencia con inhibidor.

5.4.- Actividad pectinolítica de microorganismos.

Anteriormente se ha indicado que en los frutos de pimientos no se ha encontrado actividad pectinolítica apreciable, aunque hay que tener en cuenta que el estudio ha sido realizado sólo sobre frutos comprendidos en el intervalo de madurez normalmente empleado en la industria del aderezo.

No obstante en dicha industria son considerables las pérdidas ocasionadas por problemas de ablandamiento del fruto elaborado, según el sistema tradicional, problemas que fácilmente se pueden subsanar con un adecuado control del proceso, evitando las contaminaciones accidentales de mohos, crecimiento de levaduras superficiales, descenso del contenido en ClNa, etc.

Otra forma de elaboración de estos frutos es por fermentación anaeróbica en salmueras de baja graduación, aciduladas con ácido láctico. La flora microbiana responsable de esta fermentación son únicamente las levaduras, por lo cual se consideró de interés estudiar si dichos microorganismos pueden ser productores de enzimas pectinolíticas, si bien en principio no era de esperar por la buena textura que presentaban los frutos sometidos a este proceso.

Se ensayaron las especies de levaduras más representativas de dicha fermentación, utilizando el medio descrito en el apartado 4.3.2.3 para el desarrollo de la enzima, preparado a dos valores de pH de 3,5 y 5,0 unidades respectivamente, realizándose los ensayos de pectinesterasa y poligalacturonasa a los treinta días de la inoculación por el procedimiento de formación de geles de pectato cálcico especificado en el mismo apartado.

Entre las levaduras inoculadas *Hansenula anomala* y *Saccharomyces cerevisiae* producen durante su desarrollo una fuerte elevación del valor de pH del líquido basal que llega a alcanzar, para el medio de pH inicial de 5,0 unidades hasta valores finales de 6,8 y 6,4 respectivamente; *Hansenula subpelliculosa* sólo lo eleva moderadamente (hasta 5,3) mientras que *Saccharomyces lactis* y *Kloeckera apiculata* producen un descenso hasta 4,1 y 4,6 respectivamente. En el medio preparado a pH de 3,5 unidades, este valor evoluciona, durante el desarrollo de los microorganismos inoculados, de forma análoga al del medio anteriormente comentado.

La elevación del pH del medio producida por algunas de las especies podría ser la causa de la desesterificación encontrada por Bell y Etchells (58) ya que en la presente Tesis en la que el pH del medio no alcanzó el valor 7,0 en ningún caso, las pruebas de formación de gel de pectato cálcico no confirman los resultados obtenidos por ellos al no encontrarse actividad enzimática en ninguna de las especies estudiadas.

Así mismo, se han realizado medidas de actividad a dos valores distintos de pH (4,0 y 7,5) en las salmueras de los fermentadores de pimientos inoculados con estas especies a los cinco meses de fermentación, conservados en condiciones óptimas, para detectar la presencia de pectinesterasa procedente bien de microorganismos, bien del fruto, no encontrándose a ninguno de estos valores de pH actividad enzimática lo que confirma los resultados obtenidos en los cultivos anteriormente descritos.

Para la aceituna el estudio se orientó de forma distinta ya que la actividad de poligalacturonasa encontrada por el procedi-

miento de medidas de viscosidad en la incubación de los extractos activos del fruto, hace pensar en la existencia de dos fuentes distintas del enzima al encontrarse dos pH óptimos diferentes para la medida de actividad y un comportamiento distinto de ambas isoenzimas en las experiencias de diálisis.

Por consiguiente se consideró de interés estudiar la posible flora microbiana inicial que pudiera estar presente en el fruto fresco, para lo cual se realizó una siembra de la solución obtenida por maceración de las aceitunas previamente trituradas con agua estéril. El análisis microbiológico correspondiente indica que de los microorganismos investigados se encuentran presentes bacterias Gram-negativas y del género *Bacillus* no detectándose la presencia de levaduras. Realizados los aislamientos correspondientes, el estudio se inicia sobre catorce cepas de bacterias Gram-negativas y quince del género *Bacillus*, empleándose para la medida de actividad el método de formación de halo incluido en el apartado 4.3.2.3. Las bacterias se incuban durante quince días a 30° C en el medio líquido, que contiene pectina como inductor de la actividad enzimática y transcurrido este periodo de tiempo se comprueba la pureza del cultivo mediante una siembra microbiológica y se centrifuga a 5° C y 15.000 r.p.m. para separar las células. En el "caldo metabólico" claro obtenido se investiga la actividad enzimática por el procedimiento antes mencionado.

Los resultados obtenidos para las catorce cepas de bacterias Gram-negativas aisladas, que se incluyen en la Tabla XLIV, demuestran que cinco de las catorce cepas aisladas son productoras de poligalacturonasa, lo que ha sido confirmado por el método de descenso de viscosidad a un valor de pH de 7,0 unidades.

TABLA XLIV

Actividad de poligalacturonasa de bacterias Gram - negativas.

<u>Cultivo nº</u>	<u>Actividad pectinolítica</u>
1	-
2	-
3	+++
4	-
5	-
6	++
7	++
8	-
9	-
10	++
11	-
12	-
13	-
14	+

Para el estudio de la producción de poligalacturonasa por las cepas aisladas del género *Bacillus* se ha utilizado como testigo el *B. polymyxa* por su conocida actividad pectinolítica (126), empleándose los mismos procedimientos seguidos para las bacterias Gram-negativas.

Los resultados obtenidos, que se presentan en la Tabla XLV, muestran que de las quince cepas aisladas tres de ellas producen una alta actividad pectinolítica comprobada también por el procedimiento de descenso de viscosidad a un valor de pH de 7,0 unidades.

TABLA XLV

Actividad de poligalacturonasa de bacterias del género *Bacillus*.

<u>Cultivo nº</u>	<u>Actividad pectinolítica</u>
1	-
2	-
3	+++
4	-
5	-
6	-
7	+++
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	+++
<i>Bacillus polymyxa</i>	+++

6.- RESUMEN

6. - Resumen.

Los problemas de ablandamiento, que frecuentemente se producen durante el aderezo de aceitunas negras al natural en salmuera y en la preparación del pimiento empleado para el relleno, causan grandes pérdidas económicas por disminución en los rendimientos y depreciación de los productos que no mantienen un adecuado grado de calidad.

Puesto que estos problemas están estrechamente relacionados con los cambios sufridos por las sustancias pécticas, que representan el constituyente principal de la llamada lámina media, en la presente Tesis se ha estudiado, en primer lugar, el contenido en pectinas y la composición de éstas en dichos productos del aderezo profundizándose en los cambios que estos materiales experimentan durante la elaboración y conservación. A continuación, se ha investigado la actividad de las enzimas pectinesterasa y poligalacturonasas que, actuando sobre las cadenas pécticas, producen su degradación, y la presencia de inhibidores naturales de éstas últimas en la aceituna negra madura. Por último, se han realizado experiencias para detectar la posible actividad pectinolítica producida por las levaduras implicadas en la fermentación del pimiento y por las bacterias Gram-negativas y del género *Bacillus* presentes en la pulpa de la aceituna Hojiblanca madura antes de su elaboración.

Por lo que respecta al contenido en pectinas totales se presentan los resultados obtenidos, por los métodos de valoración y carbazol, para el pimiento crudo, pelado y elaborado por fermentación y para la aceituna Hojiblanca madura antes y después de su preparación como negra al natural en salmuera. Aunque ambos

procedimientos muestran una buena concordancia, existe en general una tendencia a obtener valores más altos por el del carbazol cuyas causas se estudian en el apartado de Metodología. Entre ellas cabe destacar la existencia en el hidrolizado de las sustancias pécticas, que se utiliza para llevar a cabo el análisis por el procedimiento del carbazol, de azúcares neutros como glucosa y galactosa que dan lugar a errores por exceso en la determinación de ácido anhidrogalacturónico.

Establecido el contenido en pectinas del pimiento se estudia su composición y las variaciones que experimenta durante el pelado, realizado bien por tratamiento alcalino con hidróxido sódico, bien por el método tradicional a fuego directo, fermentación y conservación, en lo que respecta a grado de esterificación, porcentaje de acetilos y contenido de ácido anhidrogalacturónico, observándose la correspondencia existente entre la disminución de textura y el porcentaje presente de dicho ácido.

La composición péctica de la pulpa del pimiento no sufre grandes alteraciones ni durante el pelado ni en la posterior fermentación y conservación, cuando en las distintas etapas del proceso de elaboración existe un control adecuado. Sin embargo, en frutos que han sufrido fenómenos de ablandamiento, se ha puesto de manifiesto que la pérdida de textura va acompañada de un acusado descenso en el contenido en ácido anhidrogalacturónico, porcentaje de esterificación y porcentaje de acetilos.

En la aceituna Hojiblanca se ha estudiado la evolución de los materiales pécticos con diversos factores que pueden afectar la calidad del producto final obtenido en la industria del aderezo.

Entre ellos, es de importancia el estado de madurez en que se recolecta el fruto ya que con la maduración el contenido en ácido anhidrogalacturónico, siempre superior en la pulpa que en la piel, disminuye progresivamente. También el grado de esterificación, que por el contrario es superior en la piel, disminuye durante dicho proceso de maduración llegando a desaparecer totalmente en la aceituna excesivamente madura.

Un descenso análogo en el porcentaje en ácido anhidrogalacturónico, acompañado de una total desesterificación de la pectina, ocurre igualmente durante la fermentación cuando la textura del producto final obtenido es deficiente.

Otro factor que altera considerablemente la composición péctica es la conservación prolongada de los frutos en trojes, durante la cual el grado de esterificación de los grupos carboxilos llega a hacerse cero dentro de los doce primeros días, mientras que, por el contrario, el porcentaje de acetilos experimenta un sensible aumento.

La investigación realizada sobre las enzimas que pueden alterar la composición de estas sustancias pécticas comprende, en primer lugar, el estudio de la actividad de pectinesterasa en el pimientito y en distintas variedades de aceituna. Por lo que al pimientito empleado para el relleno de aceitunas se refiere en todas las muestras analizadas, con distinto grado de desarrollo de color, cuando se detecta actividad es siempre en frutos prácticamente inaceptables o de escasa calidad para la industria del aderezo, bien por su baja textura bien por su deficiente color.

En aceitunas, la actividad de pectinesterasa se ha investigado en las variedades Gordal, Manzanilla, Lechín y Hojiblanca en distintos estados de madurez. Mientras que en las tres primeras variedades antes mencionadas la actividad de la enzima es prácticamente despreciable en todas las fases de la maduración, en la Hojiblanca es notablemente más elevada cuando se encuentra madura. Por ello se ha profundizado en su estudio para comprobar la influencia de diversos factores que pueden incidir en esta actividad. Así, con la maduración se incrementa la concentración de pectinesterasa en una primera etapa hasta alcanzar un máximo y a partir de él, cuando la madurez progresa y la textura disminuye, va decreciendo hasta anularse prácticamente en la aceituna sobremadura.

Otro aspecto de gran interés es la evolución de la actividad de pectinesterasa con el tiempo de conservación, puesto que con frecuencia la elaboración de los frutos no se realiza inmediatamente después de la recolección. En aceitunas recogidas directamente del árbol y conservadas en cámara a 15° C se observa una primera etapa de incremento en la actividad, que desciende posteriormente de forma paulatina. Sin embargo, cuando se parte de frutos previamente almacenadas en fábrica la actividad de pectinesterasa disminuye progresivamente durante la conservación a 15° C, posiblemente por haber transcurrido la fase inicial antes de la recogida de las muestras.

Durante la conservación de la aceituna en trojes se ha comprobado igualmente una disminución de la actividad de esta enzima paralelamente al descenso del contenido en ésteres antes estudiado.

Como purificación de la pectinesterasa se ha utilizado la diálisis quedando la enzima de aceituna Hojiblanca durante esta operación en la fracción sobrenadante lo que permite separarla de otras sustancias que precipitan en ausencia de sales.

El estudio detallado sobre la influencia del valor de pH, realizado en la zona comprendida entre 4,5 y 7,5 unidades, ha demostrado que la actividad se incrementa con el aumento de pH y es muy reducida en el intervalo considerado más idóneo para la fermentación, entre 4,5 y 5,0 unidades aproximadamente.

En cuanto al cloruro sódico presenta, a un pH de 7,5 unidades, un marcado efecto inhibitor de la actividad, moderado para bajos niveles de sal y más acentuado cuando se alcanza un 6,0 % de la misma.

En relación con la actividad de la enzima poligalacturonasa, en todas las muestras de pimiento investigadas los resultados han sido negativos, lo que concuerda con las pequeñas variaciones que el contenido en pectinas y su composición experimentan durante la elaboración de estos frutos como se vió anteriormente.

En las aceitunas de la variedad Hojiblanca que, como ya se ha indicado, frecuentemente presentan graves problemas de ablandamiento en su preparación como negra al natural en salmuera, se ha investigado la influencia de diversos factores sobre esta enzima.

Por lo que respecta al estado de madurez del fruto, al avanzar éste se incrementa la actividad de poligalacturonasa, y así, mientras en la aceituna recolectada verde o durante el envero no se detecta prácticamente la presencia de esta enzima, su concentración se incrementa sucesivamente para los frutos maduros y sobremaduros, empleados comunmente durante la fermentación.

De modo análogo al estudio realizado en el caso de la pectinesterasa se ha investigado la influencia del tiempo de almacenamiento, observándose que con su prolongación, en muestras con actividad de poligalacturonasa inicialmente moderada, ésta se incrementa de forma paulatina. Las experiencias de diálisis realizadas han puesto de manifiesto la existencia de dos isoenzimas diferentes de la poligalacturonasa, posiblemente de distinta procedencia, de las cuales una de ellas queda en el sobrenadante mientras la otra permanece insoluble en ausencia de sales. El efecto del valor de pH se ha investigado, entre 3,5 y 7,0 unidades, tanto en extractos brutos de poligalacturonasa como en las fracciones obtenidas por diálisis. El valor óptimo, para los extractos de poligalacturonasa, está alrededor de 6,0 unidades y si bien las soluciones enzimáticas son activas incluso a un pH de 3,5 unidades, a este valor la actividad se reduce a menos del 50 % de la que presenta a dicho óptimo.

El estudio sobre la influencia del pH realizado con las fracciones de precipitado y sobrenadante obtenidas por diálisis ratifica la existencia de dos isoenzimas diferentes que tienen distintas propiedades. Así, mientras la que precipita durante la diálisis tiene su óptimo a un pH de alrededor de 4,0 unidades, la del sobrenadante lo posee a 6,0 unidades aproximadamente, que coincide por tanto con el obtenido anteriormente para los extractos globales sin dializar; este hecho parece demostrar una mayor importancia cuantitativa de esta última enzima en las condiciones de medida empleadas.

La actividad de los extractos brutos de poligalacturonasa a un valor de pH de 4,0 unidades, disminuye rápidamente con la concentración de cloruro sódico que al 8,0 % la reduce hasta un 5,0 % de su valor original. El mismo efecto fuertemente inhibitorio posee la sal, al pH antes mencionado, sobre la isoenzima del precipitado obtenido por diálisis. Sin embargo, la poligalacturonasa del sobrenadante muestra un comportamiento muy diferente según el valor de pH elegido para su estudio ya que mientras a pH 4,0 es rápidamente inhibida por el cloruro sódico, a su pH óptimo, de 6,0 unidades, es mucho más resistente a la inhibición e incluso para un 8,0 % de sal conserva más del 50 % de su actividad.

Caracterizadas en sus propiedades las isoenzimas de la poligalacturonasa presentes en la aceituna Hojiblanca madura, se ha abordado el estudio de los inhibidores naturales que pudieran existir en este fruto. Para ello se han realizado experiencias utilizando soluciones acuosas de dichos frutos obteniéndose porcentajes de inhibición de alrededor del 10 % a pesar de la fuerte dilución respecto a la concentración inicial en la pulpa. La existencia de estos inhibidores naturales se ha confirmado también dializando extractos brutos y alpechines que antes de esta operación no poseían prácticamente actividad de poligalacturonasa pero después de ella la presentan tanto en la fracción del sobrenadante como en la del precipitado; por tanto los inhibidores presentes en el fruto, solubles en agua, deben poseer bajo peso molecular.

Posteriormente para estudiar la naturaleza, competitiva o no, de la inhibición se investiga la variación que experimenta la actividad de poligalacturonasa con la concentración de sustra-

to en presencia y ausencia de inhibidor, Las líneas de regresión, obtenidas al representar el inverso del descenso en viscosidad frente a la inversa de la concentración, nos permiten establecer el valor de la constante de Michaelis-Menten y el porcentaje de descenso máximo en viscosidad así como la naturaleza de la inhibición.

Las experiencias realizadas con la isoenzima del precipitado obtenido por diálisis demuestran que para ella la inhibición es competitiva ya que ambas rectas de regresión, obtenidas en presencia y ausencia de inhibidor, coinciden prácticamente sobre el eje de ordenadas. Por el contrario la poligalacturonasa del sobrenadante en las experiencias de inhibición se ajusta a un modelo no competitivo.

Comparativamente esta isoenzima tiene un valor de la constante de Michaelis inferior a la del precipitado lo que indica que posee una mayor afinidad por el sustrato y por tanto una mayor eficacia catalítica a bajas concentraciones de éste.

Por último, se ha investigado la actividad pectinolítica de los diversos microorganismos que pueden estar presentes en los productos estudiados. En el pimiento, de cuya fermentación las levaduras son las únicas responsables, se han seleccionado para el estudio las especies más representativas encontrándose que no son productoras de enzimas pectinolíticas, al menos en las condiciones ensayadas.

En las aguas de lavado de la aceituna negra madura de la variedad Hojiblanca se han aislado bacterias contaminantes Gram-negativas y del género *Bacillus* cuyo carácter pectinolítico se

ha puesto de manifiesto tanto por formación de halo en geles pécticos como por descenso en viscosidad.

7.- CONCLUSIONES

7.- Conclusiones.

1.- Se ha establecido el contenido y composición de las pectinas, tanto en el fruto fresco como en el elaborado, para dos productos españoles de gran interés industrial y comercial: pimiento empleado en el relleno y aceituna negra madura de la variedad Hojiblanca.

2.- El estudio comparativo entre los métodos de carbazol y valoración ha puesto de manifiesto que el primero de ellos dá errores por exceso debido a la presencia de azúcares neutros en el hidrolizado de pectinas mientras que el segundo, más reproducible, proporciona una información más completa por lo que se ha elegido para el desarrollo de la investigación.

3.- La pulpa del pimiento no sufre una gran alteración, en cuanto a su composición péctica, durante el proceso de pelado, manteniendo prácticamente a lo largo de la fermentación y conservación posterior el contenido inicial de dichos componentes, siempre que la elaboración haya sido debidamente controlada. Sin embargo, si dicha conservación no es la adecuada, el fruto, además de tener una sensible pérdida de textura, sufre un acusado descenso en el contenido en ácido anhidrogalacturónico, porcentaje de esterificación y porcentaje de acetilos.

4.- En la aceituna tanto el contenido en ácido anhidrogalacturónico como el porcentaje de acetilos son siempre superiores en la pulpa que en la piel. Por el contrario son las pectinas de la piel las que presentan un grado de esterificación notablemente más elevado.

5.- El contenido en pectinas de la pulpa decrece a medida que avanza el estado de madurez del fruto.

Una marcha análoga se observa en el grado de esterificación, que llega incluso a anularse en la aceituna excesivamente madura.

6.- Cuando la textura se deteriora como consecuencia de una elaboración deficiente, los frutos experimentan un descenso en el contenido en ácido anhidrogalacturónico y una desesterificación de los materiales pécticos, fenómenos semejantes a los observados en el pimiento en mal estado de conservación.

7.- La evolución de estos mismos parámetros de composición, durante el estudio del almacenamiento de aceitunas en trojes, demuestra la degradación progresiva con el tiempo de la cadena péctica.

8.- Las medidas de actividad de pectinesterasa realizadas en extractos de pimientos rojos, tanto frescos como pelados, han dado siempre resultados negativos.

9.- La presencia de la enzima pectinesterasa se ha investigado en aceitunas de las variedades Lechín, Gordal, Manzanilla y Hojiblanca.

El estudio, realizado en distintos estados de madurez, demuestra que únicamente la Hojiblanca presenta valores significativos de actividad, siendo ésta despreciable para las otras tres variedades.

10.- En una primera etapa la actividad de pectinesterasa se incrementa con la madurez, alcanzando un máximo que coincide, aproximadamente, con el estado en que tanto la textura como el

color del fruto son óptimos para la elaboración como aceituna negra al natural en salmuera. A partir de este momento la actividad de la enzima decrece y llega a anularse totalmente en el fruto excesivamente maduro.

11.- El tiempo de almacenamiento del fruto, una vez recolectado, ejerce una influencia decisiva sobre la actividad de la enzima, la cual aumenta en una primera fase decreciendo posteriormente, de forma paulatina, hasta anularse por completo. Esta conducta es de suma importancia a efectos de la elaboración.

12.- Durante la diálisis de los extractos la pectinesterasa de aceituna Hojiblanca madura no precipita y se mantiene por tanto en la fracción sobrenadante.

13.- La actividad de la enzima en la aceituna negra madura crece paralelamente con el pH dentro del intervalo comprendido entre 3,5 y 7,5 unidades, alcanzando a éste último valor el máximo de actividad. En la zona considerada como más idónea para la fermentación, entre 4,5 y 5,0 unidades, dicha actividad es muy reducida.

14.- El cloruro sódico presenta un efecto inhibitor sobre la actividad de pectinesterasa, moderado para bajos niveles de sal y acusado cuando se adiciona al sustrato un 6,0 % de la misma.

15.- Los resultados negativos obtenidos en la investigación de la enzima poligalacturonasa en muestras de pimientos, con distinto grado de desarrollo de color, indican que este fruto no es fuente de dicha enzima.

16.- En la aceituna Hojiblanca recolectada verde o durante el envero no se detecta prácticamente la presencia de la enzima, mien-

tras que su concentración toma valores crecientes para los frutos maduros y sobremaduros, empleados comunmente en la fermentación.

17.- A un valor de pH de 4,0 unidades se observa que la actividad de poligalacturonasa, moderada inicialmente, se incrementa rápidamente al prolongarse el almacenamiento de los frutos, incluso a temperatura controlada, lo que demuestra una vez más la importancia del tiempo que transcurre desde la llegada del fruto a fábrica hasta su utilización.

18.- Las experiencias de diálisis han demostrado la existencia de actividad de poligalacturonasa, tanto en el precipitado como en el sobrenadante, debida a la presencia de dos isoenzimas diferentes, posiblemente de distinta procedencia, una de las cuales precipita en ausencia de sales mientras la otra permanece soluble.

19.- El valor de pH óptimo de los extractos de poligalacturonasa se encuentra alrededor de 6,0 unidades. No obstante las soluciones enzimáticas son activas incluso a 3,5 unidades, si bien en este caso dicha actividad se reduce a menos del cincuenta por ciento.

20.- El estudio realizado sobre la influencia del pH en la actividad de las fracciones de precipitado y sobrenadante, obtenidos por diálisis, demuestra que mientras que la primera de ellas presenta su pH óptimo alrededor de 4,0 unidades, la segunda lo tiene a 6,0 unidades aproximadamente, lo cual confirma que la actividad de poligalacturonasa de la aceituna se debe a dos isoenzimas diferentes, que si bien catalizan un mismo proceso poseen distintas propiedades.

21.- El cloruro sódico tiene un efecto inhibitor, tanto sobre los extractos globales de poligalacturonasa como sobre las isoenzimas separadas por diálisis, siendo más marcado este efecto para la del sobrenadante a pH 4,0 que a su valor óptimo.

De esta observación se concluye el importante papel que desempeña el efecto combinado del cloruro sódico y del pH para evitar la acción de la poligalacturonasa, si bien en la práctica pueden encontrarse dificultades para conseguir la acción conjunta de ambos factores, debido a la lenta difusión de la sal hacia el interior del fruto.

22.- La existencia de inhibidores naturales en la aceituna Hojiblanca madura, solubles en agua y de bajo peso molecular, se ha puesto de manifiesto, tanto por experiencias con soluciones acuosas de los frutos, como por diálisis de extractos brutos y alpechines que, antes de esta operación, no mostraban actividad de poligalacturonasa y después la presentan tanto en el precipitado como en el sobrenadante.

23.- Esta inhibición ocurre para cada una de las isoenzimas aisladas por un mecanismo diferente, competitivo para la del precipitado y no competitivo para la del sobrenadante.

24.- Las levaduras responsables de la fermentación del pimiento no son productoras de enzimas pectinolíticas en las condiciones ensayadas.

25.- El estudio de la flora microbiana inicial, presente en el fruto fresco de aceituna negra, indica que se encuentran bacterias Gram-negativas y del género Bacillus que son productoras de poligalacturonasa.

8.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cruess, W.V.- The Fruit Products Journal and American Food Manufacturer 27 (1947) 244-45.
- 2.- Vaughn, R.H.- "Lactic acid fermentation of cucumbers, sauerkraut and olives". Un capítulo en "Industrial Fermentations". Vol. II. Ed. por L.A. Underkofler y R.J. Hickey.- Chemical Publishing Co. Inc. New York (1954) 417-478.
- 3.- Fernández Díez, M.J.- "The Olive".- Un capítulo en The Biochemistry of Fruits and their products. Vol. 2 Ed. por A.C. Hulme.- Academic Press. Londres (1971) 255-279.
- 4.- Sancho Gómez, J. y Colbs. "Pimiento y pimentón. Estudio fisico-químico". Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Sureste. Murcia (1962).
- 5.- Powers, J.J.; Pratt, D.E.; Downing, D.L. y Powers, I.T.- Food Technol. 15 (1961) 67-74.
- 6.- Supron, M.K.; Powers, J.J.; Rao, P.V.; Dornseifer, T.P. y King, P.H.- Food Technol. 20 (1966) 117-122.
- 7.- Fernández Díez, M.J.; Mínguez Mosquera, M.I. y Castillo Gómez, J.- Grasas y Aceites, 25 (1974) 331-340.
- 8.- Castillo Gómez, J.; Cordón Casanueva, J.; Fernández Díez, M.J.; Fernández Quintana, G.; González Cancho, F.; Márquez González, J.; Mínguez Mosquera, M.I.; Nosti Vega, M. y Perez Paz, C.M.- "El pimiento para el relleno de aceitunas". Ponencia presentada a la XI Asamblea de Miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados. Sevilla, Mayo, 1975.
- 9.- Mínguez Mosquera, M.I.; Castillo Gómez, J. y Fernández Díez, M. J.- Grasas y Aceites 27 (1976) 27-32.
- 10.- Fernández Díez, M.J.; Mínguez Mosquera, M.I. y Castillo Gómez, J.- "Pectic Substances in Pickling Products Related to Softening Problems". IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Madrid. España, Septiembre 1974.

- 11.- Fernández Díez, M.J.; González Cancho, F.; Mínguez Mosquera, M.I.; Márquez González, J. y Perez Paz, C.M.- Grasas y Aceites, 20 (1969) 119-125.
- 12.- Mínguez Mosquera, M.I.; González Cancho, F.; Perez Paz, C.M.; Márquez González, J. y Fernández Díez, M.J.- Grasas y Aceites 21 (1969) 342-348.
- 13.- Kertesz, Z.I.- "The Pectic Substances".- Interscience Publishers, Inc. New York (1951).
- 14.- Ulrich, R.- "La vie des fruits".- Masson et Cie. Editeurs. Paris (1952).
- 15.- Meyer, L.H.- "Food Chemistry".- Reinhold Publishing Corporation. New York (1961).
- 16.- Kawabata, A. y Sawayama, S.- Eiyo To Shokuryo 28 (1) (1975) 17-24.
- 17.- Blaim, K. y Szynal, J.- Acta Agrobot. 27 (1) (1974) 29-37.
- 18.- Igamberdiera, M.I.; Rakhimov, D.A. y Ismailov, Z.F.- Khim. Prir. Soedin. 1974, (4), 429-32.
- 19.- Tishchenko, V.P.- Uch. Zap.- Mord. Gos. Univ. 105 (1973) 44-51.
- 20.- McCready, R.M. y McComb, E.A.- Anal. Chem. 24 (1952) 1986-1988.
- 21.- Rouse, A.H. y Atkins, C.D.- Technical Bull. 570 University of Florida. Agr. Exp. Sta. Gainesville. Florida (1955).
- 22.- Rouse, A.H.; Atkins, C.D. y Moore, E.L.- Proc. of the Florida State Horticultural Society. 75 (1962) 307-311.
- 23.- Rouse, A.H.; Atkins, C.D. y Moore, E.L.- J. Food Sci. 27 (1962) 419-425.
- 24.- Thibault, J.F. y Robin, J.P.- Ann Technol Agric. 24 (1) (1975) 99-110.

- 25.- Gee, M.; McComb, E.A. y McCready, R.M.- Food Res. 23 (1958) 72-75.
- 26.- McComb, E.A. y McCready, R.M.- Anal. Chem. 29 (1957) 819-821.
- 27.- Luh, B.S. y Dastur, K.D.- J. Food Sci. 31 (1966) 178-183.
- 28.- Dolendo, A.L.; Luh, B.S. y Pratt, H.K.- J. Food Sci 31 (1966) 332-336.
- 29.- Schultz, T.H. Determination of acetyl in pectin. In "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. 5, ed. Whistler, R.L. p 187. Academic Press, New York. 1965.
- 30.- Pilnik, W. y Voragen, E.G.J.- "Pectic Substances and other Uronides". Un capítulo en "The Biochemistry of Fruit and their Products". Vol. 1. Ed. for A.C. Hulme. Academic Press. Londres (1970) 53-87.
- 31.- Wodmansee, C.W.; Clendon, H. y Sommer, G.F.- Food Research 24 (1959) 503.
- 32.- McCready, R.M. y McComb, E.A.- Food Research 19 (1964) 530-535.
- 33.- Stier, E.F.; Ball, C.O. y Maclin, W.A.- Food Technol. 10 (1956) 39.
- 34.- Von Loescke, H.W. (1950) Banana 2ª Ed. Interscience Publishers, New York.
- 35.- Colins, J.L.- J. Food Science 35 (1970) 1.
- 36.- Hultin, H.O. y Levine, A.S.- J. Food Science 30 (1965) 917-921.
- 37.- Flores, M.C.; L.P. Paiz; M. de Ortega; Ortiz, J. Deshpande, S. y Rolz C. A.T.A. 11 (4) (1971) 594-603.
- 38.- Chang, Y.S. y Smith, C.J.B.- J. Food Sci. 38 (4) (1974) 646-648.
- 39.- Smith, C.J.B. y Bryant, E.F.- J. Food Sci. 32 (1967) 197.

- 40.- Heri, W.; Neukom, H. y Deuel, H.- 1961 a. *Helv. Chim. Acta* 44, 1939.
- 41.- Heri, W.; Neukom, H. y Deuel, H.- 1961 b. *Helv. Chim. Acta* 44, 1945.
- 42.- Biale, J.B.- *Advances in Food Research* 10 (1960) 293.
- 43.- Phaff, H.J. y Joslyn, M.A.- The newer knowledge of pectic enzymes. *Wallerstein Lab. Comm.* 10, nº 30, (1947) 133.
- 44.- Kertesz, Z.I.- *Food Enzymes*. H.W. Schultz (Ed) The Avi Publishing Co., Inc. Westport EE.UU. (1960).
- 45.- Kertesz, Z.I.- *Food Research* 3, (1938) 481.
- 46.- Wehmer, C. y Hadders, M.P. *Handbuch der Pflanzenanalyse:IV: Parte II y III*. 887, J. Springer, Vienna, 1933.
- 47.- Kertesz, Z.I.- *Ergeb. Enzymforsch.* 5 (1936) 233.
- 48.- Lineweaver, H. y Ballou, G.A.- *Arch. Biochem.* 6 (1945) 373.
- 49.- McDonnell, L.R.; Jansen, E.F. y Lineweaver, H.- *Arch. Biochem.* 6 (1945) 389.
- 50.- McCulloch, R.J.; Moyer, J.C. y Kertesz, Z.I.- *Arch Biochem* 10 (1946) 479.
- 51.- Hills, C.H. y Mottern, H.H.- *J. Biol. Chem.* 168 (1947) 651.
- 52.- Pithawala, H.R.; Savur, G.R. y Screenivasan, A.- *Arch. Biochem.* 17 (1948) 235.
- 53.- Kertesz, Z.I.- *J. Biol. Chem.* 121 (1937) 589.
- 54.- McCulloch, R.J. y Kertesz, Z.I.- *Arch. Biochem.* 13 (1947) 217.
- 55.- Bell, T.A.; Etchells, J.L. y Jones, I.D.- *Arch. of Biochem. and Bioph* 31 (1951) 431-441.

- 74.- Cabrera, L.- Mex. Cienc. Farm. 5 (1974) 17-22.
- 75.- Somogyi, L.P. y Romani, R.J.- J. Food Sci. 29 (1964) 366.
- 76.- Cabrera, M.L.; Cuevas, J. y D eshpande, S.N. (1970). Presentado al 3^{er} Congreso Internacional de Ciencia y Tecnologia de Alimentos. Washington.
- 77.- Hobson, G.E.- Biochem. J.- 86 (1963) 358-365.
- 78.- Paton, J.B.- J. Bot. 8 (1921) 471-501.
- 79.- Matus, J.- Ber. Schweiz. Botan. Ges. 58 (1948) 319.
- 80.- Bell, T.A.- The Botanical Gazette 113 (1951) 216-221.
- 81.- Fish, V.B. y Dustman, R.B.- J. Am. Chem. Soc. 67 (1945) 1155-1157.
- 82.- Jansen, E.F.; McDonnell, L.R. y Jong, R.- Arch. Biochem. 8 (1945) 113-118.
- 83.- Lineweaver, H; Jong, R. y Jansen, E.F.- Arch. Biochem. 20 (1949) 137-152.
- 84.- Pallmann, H.; Matus, J.; Deuel, H. y Weber, F.- Rec. Trav. Chim. Pays Bas. 65 (1946) 633-640.
- 85.- Etchells, J.L.; Bell, T.A. y Jones, I.D.- Paper presented at Institute of Food Technologists Annual Meeting. Los Angeles (1954).
- 86.- Etchells, J.L.; Bell, T.A.; Monroe, J.; Masley, P.M. y Demain, A.L.- Applied Microbiol. 6 (1958) 427-440.
- 87.- Paynter, V.A. y Jen, J.J.- J. Food Sci. 39 (1974) 1195-1199.
- 88.- Zamberman, G. y Schiffmann-Nadel, M.- Phytopathology 64 (1974) 188-190.
- 89.- Sommer, N.F.; Buchanan, J.R. y Fortlage, R.J.- Calif. Agric. 28 (1974) 8.

- 56.- Bell, T.A.; Etchells, J.L. y Jones, I.D.- Food Technol. 4 (1950) 157-163.
- 57.- Etchells, J.L. y Bell, T.A.- Food Technol. 4 (1950) 77-83.
- 58.- Bell, T.A. y Etchells, J.L.- Applied Microbiol. 4 (1956) 196-201.
- 59.- Lineweaver, H. y Ballou, G.A.- Arch Biochem, 6 (1945) 373.
- 60.- Willama, J.J. y Hills, C.H.- U.S. Patent 2.358.429 (1944).
- 61.- Felleberg, T.- Biochem. Z. 85 (1918) 45.
- 62.- Lineweaver, H. y Jansen, E.F.- Adv. Enzymology 11 (1951) 267.
- 63.- Rouse, A.H.- Proc. Fla. State Hort. Soc. 62 (1949) 170-173.
- 64.- Jansen, E.F. y McDonnell, L.P.- Arch. Biochem. 8 (1945) 97.
- 65.- Hasegawa, S.; Maier, V.P.; Haszycki, H.P. y Crawford, S.K.- J. Food Sci. 34 (1969) 4.
- 66.- Deuel, H.; Helv. Chim. Acta 30 (1947) 1523.
- 67.- McDonnell, L.R.; Jang, R.; Janse, E.F. y Lineweaver, H. Arch. Biochem. 28 (1950) 268.
- 68.- Neuberg, C. y Ostendorf, C.- Biochem. Z. 229 (1930) 464.
- 69.- Kertesz, Z.I.- Food Research 4 (1939) 113.
- 70.- Rothschild, G.; Moyal, Z. y Karsenty, A.- J. Food Technol. 9 (1974) 471-5.
- 71.- Holden, M.- Biochem. J.- 40 (1946) 103.
- 72.- Belli - Dönini, M.L. y Stornaivolo, M.R.- J. Food Sci. 34 (1969) 511-512.
- 73.- Rouse, A.H. y Dennison, R.A.- J. Food Sci 33 (1968) 258.

- 90.- Luh, B.S.; Peupier, L.H. y Liu, Y.K.- Calif. Agric. 28 (1974) 4-6.
- 91.- Luh, B.S. y Phaff, H.J.- Arch. Biochem. and Biophys. 33 (1951) 212-227.
- 92.- Luh, B.S. y Phaff, H.J.- Arch. Biochem. and Biophys. 48 (1954) 23-37.
- 93.- Luh, B.S. y Phaff, H.J.- Arch. Biochem. and Biophys. 51 (1954) 102-113.
- 94.- Demain, A.L. y Phaff, H.J.- J. Biol. Chem. 210 (1954) 381-393.
- 95.- Roelofsen, P.A.- Biochim. et Biophys. Acta 10 (1953) 410-413.
- 96.- Nortje, B.K. y Vaughn, R.H.- Food Research 18 (1953) 57-69.
- 97.- Vaughn, R.H.; Levinson, J.H.; Nagel, C.W. y Krumperman, P.H.- Food Research 19 (1954) 494-502.
- 98.- Karbassi, A.- Diss. Abstr. Int. B 35 (1974) 1811.
- 99.- Ulrich, J.M.- Physiol. Plant Pathol. 5 (1975) 37-44.
- 100.- Garibaldi, A. y Bateman, D.F.- Phytopathol. Mediterr. 12 (1973) 30-35.
- 101.- Mottern, H.H. y Hills, C.H.- Ind. Eng. Chem. 38 (1946) 1153.
- 102.- Weber, F. y Deuel, H.- Mitt. Lebensm. Hyg. 36 (1945) 368.
- 103.- Baker, G.L. y Goodwin, M.W.- Del Agr. Exp. Sta. Bull. 216 Techn. 23 (1939).
- 104.- Owens, H.S.; Lotzkar H.; Menill, R.C. y Peterson, M.- J. Am. Chem. Soc. 66 (1944) 1178.
- 105.- Hislop, E.C.; Shellis, C.; Fielding, A.H.; Bourne, F.J. y Chilow, J.W.- J. Gen. Microbiol. 83, Pt. 1 (1974) 135-143.

- 106.- Rexova-Benkova, L. y Tibensky, V.-Czech 152, 110 (Cl. Co7g)
15 Feb. 1974, Appl. 7784-70, 18 Nov. 1970; 2 pp Addn. to
Czech 147, 984 (CA 79; 50315h).
- 107.- Sato, M. y Kaji, A.- Agric. Biol. Chem. 39 (1975) 819-824.
- 108.- Lanzarini, G. y Zamorani, A.- J. Sci. Food Agric. 26 (1975)
197-205.
- 109.- Paynter, V.A. y Jen, J.J.- Biochem. Physiol. Pflanz. 167 (1975)
219-231.
- 110.- Etchells, J.L.; Bell, T.A. y Williams, C.F.- Food Technol. 12
(1958) 204-208.
- 111.- Porter, W.L.; Scwartz, B.H.; Bell, T.A. y Etchells, J.L.- J.
Food Sci. 26 (1961) 600-605.
- 112.- Smart, W.W.G.; Bell, T.A.; Stanley, N.W. y Cope, W.A.- J. Dairy
Sci. XLIV (1961) 1945-1946.
- 113.- Bell, T.A.; Etchells, J.L.; Singleton, J.A. y Smart, W.W.G.-
J. Food Sci. 30 (1965) 233-239.
- 114.- Hunter, R.E.- Physiol. Plant Pathol. 4 (1974) 151-159.
- 115.- Vidhyasekaran, P.- Indian J. Exp. Biol. 11 (1973) 473-475.
- 116.- Pilnik, W.; Vöragen, A.G.J. y Rombouts, F.M.- Comunicación
presentada al IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecno-
logía de Alimentos (1 b 18) Madrid, Septiembre 1974.
- 117.- Mueller, P.W.- Proc. Int. Symp. Convers. Manuf. Foodst. Microor-
ganinms 1971. (Pub. 1972) 113-114. Saikon Publ. Co. Ltd. Tokyo,
Japan.
- 118.- Mínguez Mosquera, M.I.; Nosti Vega, M.; González Cancho, F. y
Fernández Díez, M.J.- Grasas y Aceites, 24 (1973) 1-10.
- 119.- González Cancho, F.; Mínguez Mosquera, M.I. y Fernández Díez,
M.J.- Microbiol. España. 25 (1972) 81-90.

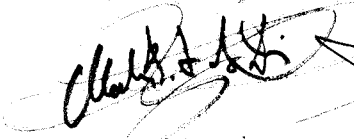
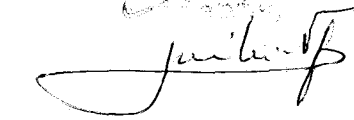
- 120.- Kertesz, Z.I.- Un capitulo en Methods in Enzimology. Vol. 1 (1955) Ed. por S.P. Colowick y N.O. Kaplan. Academic. Press Inc., Publishers. New York, 10, N.Y. 158-166.
- 121.- McComb, E.A. y McCreedy, R.M.- Anal. Chem. 24 (1952) 1630-1632.
- 122.- Keijbets, M.J.H. y Pilnik, N.- Potato Res. 17 (1974) 169-177.
- 123.- Hough, L.- Nature (1950) 400.
- 124.- Rachinskii, V.V. y Knyazyatova, E.E.- Doklady Akad. Nand. S.S.R.R. 85 (1952) 1119-1122.
- 125.- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rabers, P.A. y Smith, F.- Anal. Chem. 28 (1956) 350-356.
- 126.- Nagel, C.W. y Vaughn, R.H.- Arch. Biochem. and Biophys, 93 (1961) 344-352.
- 127.- Chung, J.I.; Sakamura, S. y Luh, B.S.- Confructa, 19 (1974), nº 5, 227-235.

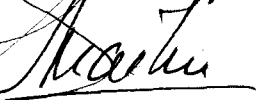
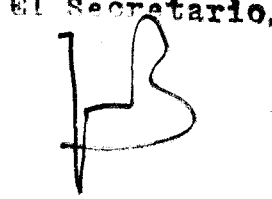
FACULTAD DE CIENCIAS

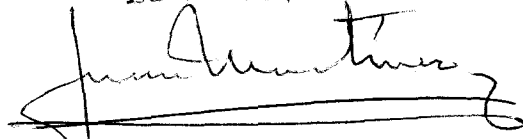
Reunido el Tribunal integrado por los señores [illegible]
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. ~~José Antonio Castelló Jerez~~
titulada "~~Composición peptídica y enzimas peptidolíticas~~
~~presentes en productos alimentados españoles~~"

acordó otorgarle la calificación de Exemplar con Lode.

Sevilla, 14 de ~~Enero~~ 1.978

El Vocal,

El Vocal,


El Vocal,

El Secretario,


El Vocal,

El Doctor,
