1206505/7

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

T 11124

POLISACARIDOS EN ACEITUNAS DE LAS VARIEDADES "MANZANILLA" Y "GORDAL". AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

Trabajo presentado por el Licenciado D. Antonio M. Gil Serrano para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA FACULTAD DE QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

V° B°

EL Catedrático Padrino

Fdo.: M. Gómez Guillén

Catedrático de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla.

V° B°

El Director de la Tesis

Fdo.: J.M. Fernández-Bolaños Vázquez.

Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Químicas de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Prof. Dr. D. José M. Fernández-Bolaños Vázquez, Profesor de Investigación del C.S.I.C.

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento: Al Prof. Dr. D. Manuel Gómez Guillén, padrino de esta Tesis; al Prof. Dr. D. José M. Fernández-Bolaños Vázquez por su dirección y constante ayuda; al Prof. Dr. D. Matías Fernández-Díez por las sugerencias y facilidades que nos ha dispensado; a la Empresa Medina Garvey por el suministro de las muestras de aceitunas; al Dr. D. Manuel Rivas Moreno, a la Lcda. Doña Teresa Pérez Romero y muy especialmente a la Lcda. Doña Pilar Tejero Mateo por su colaboración; a todos los compañeros de laboratorio por su constante ayuda y estímulo.

1. INTRODUCCION

El objeto de este trabajo es el aislamiento y purificación de los polisacáridos que existen en las aceitunas verdes deshuesadas de las variedades "manzanilla" y "gordal".

Una revisión bibliográfica sobre la química y bioquímica de los hidratos de carbono en la aceituna (1,2) pone de manifiesto el papel fundamental que estos compuestos desempeñan en la biogénesis del aceite de oliva, en el aspecto y conservación del fruto y en los procesos fermentativos. De esta revisión se deduce lo limitado que es aún el conocimiento sobre la naturaleza y composición de los hidratos de carbono en este fruto.

Los trabajos que hasta ahora se han realizado sobre los polisacáridos en aceitunas, se limitan a determinaciones globales de ellos. Corrao (3) determina el contenido en pectina de la pasta de aceituna. Luh y colb. (4) relacionan los cambios en el contenido total de pectinas con la textura de la aceituna. Fernández-Díez y colb. (5,6,7) determinan el contenido de pectinas en aceitunas verdes, la variación de la composición péctica durante su elaboración y la relación entre las

enzimas pectinolíticas con el ablandamiento de los productos del aderezo. Ultimamente A. Heredia y M. Fernández-Díez (8-11) analizan el contenido de celulosa, lignina y fibra en aceitunas verdes y aderezadas de distintas variedades.

Sin embargo no se han realizado estudios estructurales, desconociéndose la naturaleza de las hemicelulosas, pectinas o sustancias relacionadas en aceitunas verdes. Solamente Ragazzi y colb. (12), investigando los componentes solubles en el agua de vegetación (alpechín) aislan un polisacárido complejo formado por galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y ácido galacturónico, además de un pigmento constituido por macromoléculas de catecol-melaninas enlazadas con azúcares.

Esta memoria se ha estructurado en siete capítulos. El primero corresponde a la introducción. En el segundo se estudia la naturaleza, composición y nomenclatura de los polisacáridos en los tejidos vegetales y se hace una revisión de los métodos de aislamiento y purificación que se emplean en la química de estos compuestos.

En los capítulos tercero y cuarto, se estudian los polisacáridos que se extraen con agua y con solu -

ciones alcalinas de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla". El capítulo tercero comprende varios apartados, donde se describe el aislamiento de una arabinogalactana, su purificación por cromatografía sobre geles porosos y el análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía gas-líquido de los monosacáridos y ácido galacturónico que la constituyen. Se estudia su homogeneidad y se determina su peso molecular medio por cromatografía sobre gel. El capítulo cuarto comprende también varios apartados. En los primeros, se describe el aislamiento de una arabinogalactana y de hemicelulosas A y B con estructuras de xiloglucana y galactoglucomanana con ramificaciones de arabinosa y xilosa respectivamente. En otros apartados de este mismo capítulo se inicia el estudio de las estructuras de estas hemicelulosas mediante hidrólisis parcial, distribución de los pesos moleculares en función del tiempo de hidrólisis y acetolisis.

En los capítulos quinto y sexto se estudia el aislamiento, purificación y composición de una arabinogalactana, una galactoglucomanana y una galactoglucana, que se extraen con agua y con soluciones alcalinas de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "gordal".

Por último, en el capítulo séptimo se detallan las conclusiones.

2. POLISACARIDOS EN TEJIDOS VEGETALES

2.1. Naturaleza y nomenclatura

Los polisacáridos son polímeros de monosacáridos que se unen mediante enlaces glicosídicos con pérdida de moléculas de agua entre los hidroxilos hemiacetálicos y otros no hemiacetálicos, de acuerdo con la ecuación:

$$nC_6H_{12}O_6 \longrightarrow (C_6H_{10}O_5)_n + (n-1)H_2O$$

en el caso de polímero de hexosas.

El término polisacáridos se limita a aquellos polímeros que contienen más de diez unidades de monosacáridos. Cuando el número es menor se denominan oligosacáridos.

El peso molecular de los polisacáridos es variable, pero la mayoría de los polisacáridos naturales son de peso molecular alto, oscilando el número de unidades que contienen entre algunos cientos y varios miles.

Los polisacáridos pueden formarse por la polimerización de un monosacárido o por la polimerización de dos o más monosacáridos diferentes. En el primer caso se denominan homopolisacáridos y en el segundo heteropolisacáridos.

Los homopolisacáridos sencillos son los que están constituidos por moléculas lineales. Los más complejos son ramificados.

Los heteropolisacáridos sencillos son los que se forman por la polimerización de dos monosacáridos diferentes, bien constituyendo una estructura lineal o bien originándose una cadena lineal de un monosacárido con ramificaciones de otro monosacárido. Las estructuras se complican en razón a las posibilidades de combinación de los monosacáridos, las posiciones de los enlaces y la naturaleza de los mismos.

Se nombran sustituyendo el sufijo "osa" en el nombre específico del azúcar, por el sufijo "ana". Así, una arabana es un polímero de arabinosa, una glucana un polímero de glucosa y una galactomanana un polímero de galactosa y manosa.En los heteropolisacáridos se coloca en último lugar la raíz del nombre del azúcar que forma la cadena principal. Así, una arabinoxilana es un polisacárido formado por una cadena principal de xilosa con cadenas laterales de arabinosa. En polisacáridos más complejos, las raíces de los nombres de los azúcares suelen colocarse en orden alfabético, colocando al final la palabra "glicana" que es el nombre genérico de los polisacáridos.

Algunos polisacáridos conservan todavía los nombres tradicionales, como sucede con la celulosa, inulina, pectinas, amilopectinas etc. A muchos polisacáridos de estructura aún desconocida se les da el nombre que indica su origen.

Los polisacáridos desempeñan diversas funciones en los tejidos vegetales. En las plantas, la celulosa, las hemicelulosas y pectinas actúan como sustancias de sostén en las paredes celulares y el almidón como sustancia de reserva.

Las hemicelulosas constituyen un grupo muy heterogéneo que hace necesaria algunas puntualizaciones.

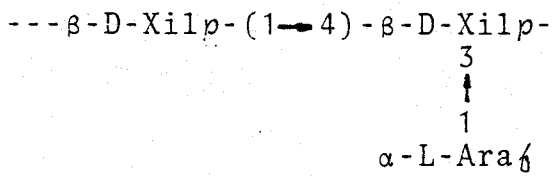
El nombre de hemicelulosa fue dado en 1891 -- (13) por Schulze para designar los polisacáridos de -- planta extraídos con soluciones alcalinas. Este autor consideraba que estos componentes de las paredes celulares estaban relacionados química y estructuralmente con la celulosa y de ahí su nombre.

El término hemicelulosa se sigue utilizando en la actualidad con diferente significado según los autores. La mayoría de ellos designa con este nombre a los polisacáridos de las paredes celulares, insolubles en agua, que no son ni la celulosa ni las pectinas. Con

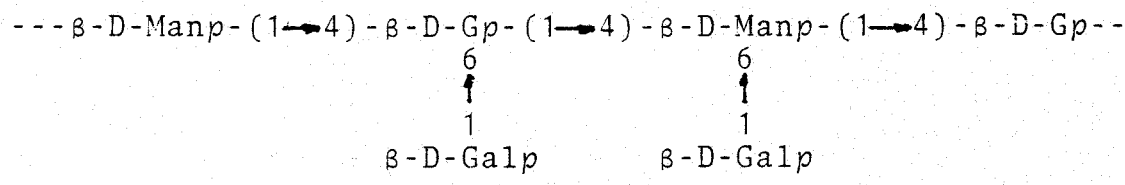
esta definición quedan excluidos los almidones y los exudados. Otros, definen las hemicelulosas como polisacáridos que se encuentran normalmente en los tejidos de las plantas junto a la celulosa, y que pueden ser aislados del material original o deslignificado por extracción con agua o más frecuentemente con soluciones alcalinas.

En estos últimos años, se va imponiendo el criterio de definir y clasificar los polisacáridos teniendo en cuenta los monosacáridos que los constituyen.

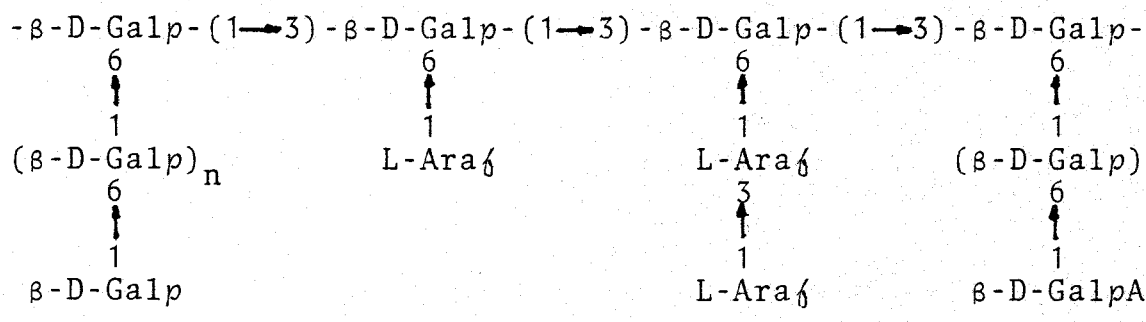
A continuación se formulan algunos de los polisacáridos que se incluyen en el grupo de las hemicelulosas:



Xilana



Galactoglucomanana



Arabinogalactana

Bibliografía abundante sobre la estructura de polisacáridos de plantas encontramos en las obras de Whistler (14), Aspinall (15) y Monties (16).

2.2. Aislamiento y purificación

La extracción de los polisacáridos de los tejidos vegetales debe hacerse de manera que sea lo más completa posible evitando que se originen transformaciones o reacciones de degradación.

En una primera fase, la pulpa de los tejidos se estabiliza y extrae con etanol del 80% a ebullición, con el fin de detener los procesos fermentativos y eliminar los compuestos de peso molecular bajo, como ácidos carboxílicos, aminoácidos, fenoles, azúcares y glicósidos. Este tratamiento elimina parte de las grasas que posteriormente se completa mediante extracción con

hexano, mezclas de cloroformo-metanol o etanol-benceno. Después de esta primera etapa, hay diversos procedimientos de extracción que dependen del material vegetal y de la presencia mayor o menor de lignina (16). Los más usados son:

a) La extracción con agua o con soluciones acuosas alcalinas diluidas sin deslignificación previa, que se utiliza en la obtención de arabinogalactanas y xilanas.

b) La extracción con soluciones alcalinas concentradas que se utiliza en la obtención de las hemicelulosas A y B. Este proceso va ordinariamente precedido de un tratamiento de deslignificación, que varía según el porcentaje de lignina. Si éste es reducido, algunos autores (17-19) recomiendan la extracción previa con NaOH al 1% en etanol al 50%. Si la cantidad de lignina es apreciable se emplean ordinariamente soluciones tamponadas de clorito sódico-ácido acético a 75°(20).

Las extracciones con soluciones alcalinas deben hacerse en atmósfera de nitrógeno, o en presencia de reductores como los borohidruros alcalinos, con el fin de minimizar los procesos de degradación. Después de la extracción, los polisacáridos disueltos en la solución alcalina se aislan por precipitación con etanol o acetona. De esta manera se obtienen mezclas de polisacáridos que hay que fraccionar y purificar.

Para eliminar sales y desionizar se utiliza la diálisis ó electrodiálisis y las resinas cambiadoras - de iones (21).

El fraccionamiento de las hemicelulosas se realiza en una primera etapa neutralizando las soluciones alcalinas con ácido acético (22). De esta manera precipita la hemicelulosa A, constituida por polisacáridos de peso molecular elevado. En solución queda la hemicelulosa B, constituida por polisacáridos de peso molecular bajo y que ordinariamente llevan unidades de ácidos urónicos. Su aislamiento se efectúa por precipitación con etanol o acetona.

La purificación y posterior fraccionamiento,-- con el fin de conseguir homogeneidad, se realiza por diversos procedimientos, siendo los más empleados los que a continuación se mencionan:

Precipitación fraccionada con etanol (23).

Fraccionamiento en columnas de celulosa y de -- dietilaminoetilcelulosa (24,25).

Cromatografía de filtración sobre geles porosos. (26,27).

Fraccionamiento mediante la formación de com-- plejos insolubles de cobre (28), de bario (29) y la - precipitación con sales de amonio cuaternario (30). Es

tos procedimientos son de especial utilidad en la separación de polisacáridos ácidos y neutros y en el fraccionamiento de polisacáridos que contienen manosa y -- glucosa.

3. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "MANZANILLA". POLISACARIDOS SOLUBLES EN AGUA.

En este capítulo se estudian los polisacáridos que se extraen con agua de la pulpa de aceitunas deshuesadas, previamente extraída con etanol del 80% y con disolventes orgánicos.

Se han utilizado aceitunas de la variedad "manzanilla", recogidas en fincas de la Provincia de Sevilla en las fechas que se indican:

Muestra A: 20 de Octubre de 1976.

Muestra B: 1 de Noviembre de 1979.

La muestra A se ha utilizado en el análisis sobre la composición de los polisacáridos solubles en agua, y la muestra B en la determinación de sus pesos moleculares.

3.1. Aislamiento de polisacáridos solubles en agua. Muestra A.

3.1.1. Preparación de la pulpa.

La pulpa fresca de aceitunas deshuesadas(5 Kg correspondientes a 7 Kg de fruto) se estabiliza y se extrae con etanol del 96%(18 l) calentando a ebullición durante 3 h y 30 min.El sólido filtrado y seco se vuelve a extraer con etanol del 80% y posteriormente con hexano,en un extractor Sohxlet.El sólido resultante(260 g)supone un 5% respecto a la pulpa deshuesada y un 3,5% respecto al fruto.

En este tratamiento se eliminan los azúcares libres,glicósidos,grasas,fenoles y otros componentes de bajo peso molecular,quedando insolubles e inalterados los polisacáridos.

3.1.2. Análisis.

Se ha determinado el nitrógeno por el método de Kjeldahl (31)en escala semimicro,siendo el contenido del 2,6%.

Se determinan los azúcares totales por cromatografía gas-líquido (32) y el contenido es del 16,8%.

3.1.3 Extracción con agua. Fracción A-1.

Se ha utilizado el agua y soluciones alcalinas de concentración creciente. Con el agua se extraen polisacáridos del tipo de las arabanas, arabinogalactanas y pectinas (16).

La extracción con agua se ha realizado de la siguiente forma:

La pulpa preparada, como se ha descrito en el apartado 3.1.1 (50 g), se extrae de nuevo con agua (500 ml) agitando a la temperatura ambiente durante 48 horas. A continuación se filtra y el filtrado se concentra en un rotavapor a temperatura inferior a 50°hasta un volumen aproximado de 50 ml. Se añade etanol del 96% hasta que la concentración final sea del 80%. De esta manera se forma un precipitado de aspecto gelatinoso, fácil de filtrar, que una vez seco aparece como un polvo marrón claro. El rendimiento de esta operación es del 10%.

En el producto obtenido y en el filtrado no se detectan azúcares libres. En el sólido el contenido en nitrógeno es nulo y el contenido en cenizas es del 19,5%.

3.1.4. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos y ácidos urónicos.

3.1.4.1. Hidrólisis.

El material polisacarídico soluble en agua(250 mg) se disuelve en ácido sulfúrico N (25 ml). Se calienta a ebullición durante 5 horas y se neutraliza con carbonato de bario. El filtrado neutro se lleva a pH 8,5-9 con hidróxido potásico 0,1 M,para convertir las posibles lactonas de los ácidos urónicos en sus correspondientes sales y se pasa la solución por columnas de Amberlita IR-120 H^+ e IRA-400 AcO^-. Los azúcares neutros se eluyen con agua empleando diez veces el volumen del lecho. Los ácidos urónicos se eluyen de la columna aniónica con ácido acético al 10% pasando dieciséis veces el volumen de la columna (33). Ambas disoluciones se concentran a presión reducida y se analizan por cromatografía sobre papel.

3.1.4.2. Cromatografía sobre papel.

En este apartado se detalla el método de la cro

matografía sobre papel que se utiliza en todo el trabajo.

Se emplea la técnica descendente sobre papeles Whatman números 1, 3 y 3MM. Las tiras de papel tienen una longitud de 58 ó 49 cm según el tamaño del tanque cromatográfico utilizado. La anchura depende del número de muestras aplicadas, dejándose intervalos de 2,5 cm entre cada punto y 3 cm de los bordes del papel. Las disoluciones de referencia se preparan con azúcares comerciales a la concentración del 2% para los monosacáridos y del 5% para los oligosacáridos. Los desarrolladores usados son: n-Butanol-acetona-agua (2:7:1) (34,35), (desarrollador A) para los monosacáridos y acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) (36), (desarrollador B) para los ácidos urónicos.

Los reveladores han sido:

a) Nitrato de plata-hidróxido sódico (37).

El reactivo se prepara diluyendo una solución saturada de $AgNO_3$ (1 ml) en acetona (200 ml). El cromatograma una vez seco, se sumerge en esta disolución, se evapora la acetona y se introduce en una disolución de NaOH 0,5N en etanol. El exceso de plata se elimina

lavando con $Na_2S_2O_3$ al 20% y posteriormente con agua.

b) Difenilamina-urea y ácido fosfórico (38).

Se prepara mezclando volúmenes iguales de la siguientes disoluciones:

Disolución A: Disolución de difenilamina (2 g) en acetona (100 ml) a la que se ha agregado ácido fosfórico (80-85%) (10 ml).

Disolución B: Disolución de urea (3 g) en n-butanol saturado de agua (100 ml) a la que se ha agregado ácido fosfórico concentrado (10 ml).

El revelado es como sigue: Se sumerge o pulveriza el cromatograma con el revelador, se deja secar al aire y se calienta en una estufa a 95-100°durante 5 -- minutos.

c) Verde de bromocresol (39).

Se utiliza para revelar los ácidos urónicos. El reactivo se prepara disolviendo verde de bromocresol (0,04 g) en etanol del 96% (100 ml) y añadiendo NaOH 0,1 N hasta que aparece color azul. El revelado se realiza sumergiendo el cromatograma seco en la disolución. Inmediatamente aparecen manchas amarillas sobre fondo

azul.

En el análisis del hidrolizado de los polisacáridos solubles en agua se ha utilizado el papel Whatman nº3 y los desarrolladores A y B, identificándose: Ramnosa (R_G 2,55), xilosa (R_G 1,82), arabinosa (R_G 1,52), glucosa (R_G 0,98), galactosa (R_G 0,80) (desarrollador A) y ácido galacturónico (R_{GalA} 1,00). Se detectan --- manchas que consideramos corresponden a ácidos aldobiurónicos. La arabinosa y galactosa son los azúcares más abundantes.

3.1.4.3. Cromatografía gas-líquido.

Para poder aplicar las técnicas de la cromatografía gas-líquido en el análisis de azúcares es necesario convertir éstos en derivados volátiles. Los derivados más usados son los trimetilsilil éteres (TMS), los acetatos de alditoles, los trifluoracetatos y los acetatos de aldonitrilos. En nuestro trabajo se utilizan los TMS éteres y los acetatos de alditoles.

Los TMS éteres se forman por reacción de los alcoholes con trimetilclorosilano y hexametildisilazano según la reacción:

$$3ROH + Me_3SiCl + Me_3SiNHSiMe_3 \longrightarrow 3ROSiMe_3 + ClNH_4$$

Sweeley y colb. (40,41) los utilizan por primera vez en el análisis de mezclas de azúcares. La preparación de los TMS éteres es sencilla y se lleva a cabo en pocos minutos a la temperatura ambiente. Posteriormente el método se generaliza y perfecciona tratando de evitar las dificultades que se presentan, cuando las muestras tienen agua (42-47).

El principal inconveniente que tiene el uso de los TMS éteres, es que cada azúcar puede originar varios picos en el cromatograma, correspondiente a las dos formas anoméricas y a los distintos tamaños de anillo. Por ello se utilizan también otros derivados como los acetatos de alditoles.

La preparación cuantitativa de los acetatos de alditoles fue presentada en 1961 por Gunners y colb. (48,49), pero no se pudo aplicar a la cromatografía de gases hasta que cuatro años mas tarde Sawardeker y colb. (50) introducen una fase cromatográfica, llamada ECNSS-M, capaz de efectuar la separación de estos derivados. A partir de entonces son numerosos los trabajos donde se utilizan estos derivados para el análisis de azúcares en hidrolizados de polisacáridos de plantas (33, 51 y 52).

Preparación de los TMS éteres.

Se sigue el procedimiento descrito por Davison y colb.(45) tal como se expone a continuación.

Los azúcares (300-400 mg) se disuelven en agua (25 ml) y la disolución se deja estar una noche a la temperatura ambiente. Se toma 1 ml y se concentra a sequedad en rotavapor, adicionando benceno para formar azeótropo. El residuo se disuelve en piridina y se le añade hexametildisilazano (0,3 ml) y trimetilclorosilano (0,3 ml), se agita durante cinco minutos y se lleva a sequedad, se adiciona tetracloruro de carbono y se concentra. Esta operación se repite varias veces con objeto de eliminar los reactivos y la piridina, en especial esta última, ya que origina colas en los picos del cromatograma. Después de la última adición de tetracloruro de carbono, se elimina por filtración el cloruro amónico formado y la muestra queda lista para ser inyectada en el cromatógrafo.

Preparación de los acetatos de alditoles.

Seguimos el procedimiento descrito por Richards y colb. (33).Se disuelven los azúcares (20-40 mg) y el patrón interno (inositol) en agua (5 ml), se adiciona borohidruro de sodio (10 mg) disuelto en agua

(2 ml) y la mezcla de reacción se deja estar tres ho-- ras a temperatura ambiente. Se destruye el exceso de - reactivo con unas gotas de ácido acético concentrado y se elimina el catión Na^+ con Amberlita IR-120 H^+ (1 ml de resina por meq de Na^+). El agua y los restos de ácido bórico se eliminan mediante adiciones y evaporaciones sucesivas con metanol. A continuación, se le añade una mezcla de anhídrido acético y piridina en volúmenes iguales y se deja una noche a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina en el rotavapor el exceso de reactivos, con ayuda de adiciones y evaporaciones sucesivas de cloroformo. Por último, se deja disuelto en - este disolvente y se inyecta en el cromatógrafo.

Identificación de monosacáridos.

Cromatografía gas-líquido como TMS éteres.

El análisis cromatográfico de la fracción de -- azúcares neutros, procedentes de la hidrólisis de los polisacáridos solubles en agua, se ha realizado en las siguientes condiciones:

Se ha usado un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo Fraktometer F-7, de ionización de llama.

La columna es de acero inoxidable de 2 m de lon

gitud por 3 mm de diámetro interno y contiene Carbowax 20 M al 0,5% sobre Chromosorb G, AW-DMCS, 80-100 mesh.

El gas portador es nitrógeno a un flujo de 30 ml por minuto.

Las temperaturas son:

Temperatura del bloque de inyección: 240°

Temperatura del detector: 290°

Temperatura de la columna: 170-190°a 2,5°/min y 160°isoterma.

Los cromatogramas realizados a dos temperaturas distintas correspondientes a la muestra y las referencias, se presentan en la figura 1 y 2.

Los tiempos de retención relativos están calculados respecto al pico 4 identificado como α-arabinosa.

Cromatografía gas-líquido de los acetatos de alditoles.

El análisis cromatográfico de los acetatos de alditoles, se realiza en el mismo cromatógrafo descrito anteriormente, equipado con un registrador-integrador Hewlett-Packard modelo 3380 A.

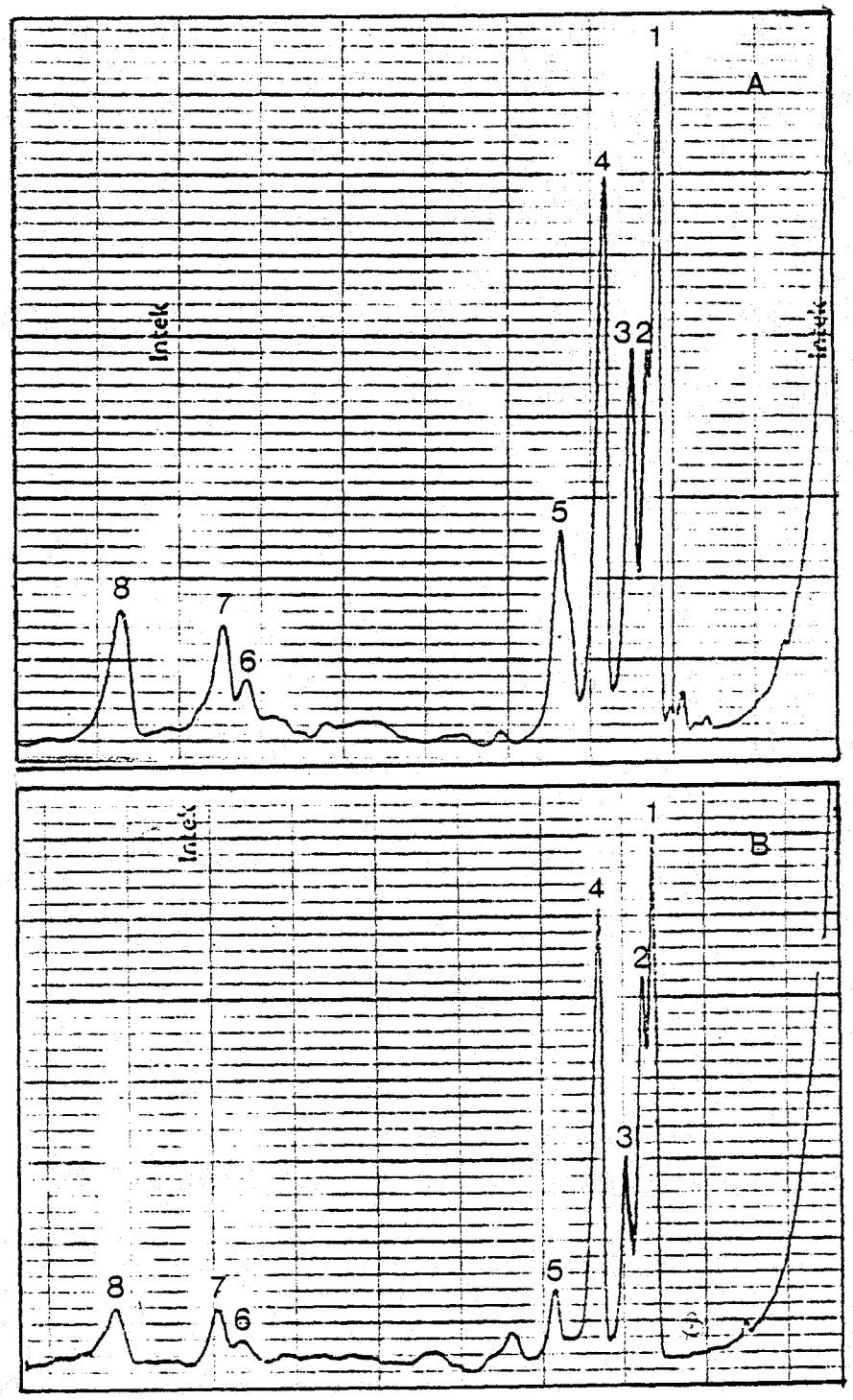


Fig.1. Cromatografía gas-líquido como TMS-éteres: A) Polisacárido sol. en agua (Fracc. A-1). B) Referencias. Los picos correspon--- dientes a cada azúcar y sus tiempos de retención relativos al pico nº4 son: Arabinosa, picos 1(0,82), 3(0,91), 4(1,00) y 5(1,15); ramnosa, pico 2(0,86) y galactosa, picos 6(2,19), 7(2,28) y 8(2,61). Columna: 2m×3mm de Carbowax 20M al 0,5% sobre Chromosorb G,AW-DMCS,80-100 mesh. Temperatura de la columna: 170°-190°a 2,5°/min.

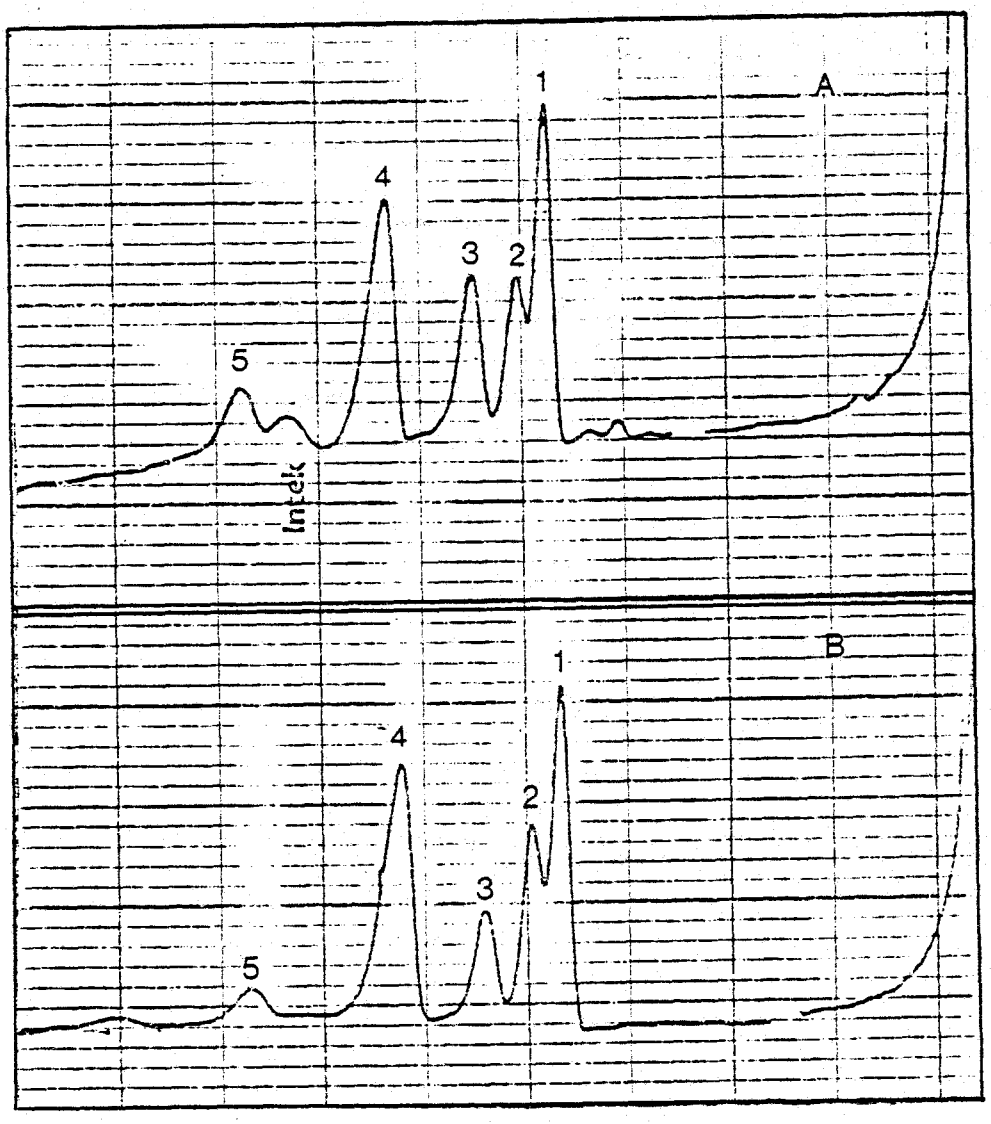


Fig. 2. Cromatografía gas-líquido como TMS-éteres. A) Polisacáridos sol. en agua (Fracc. A-1). B) Referencias. Los picos correspondientes a cada azúcar y sus tiempos de retención relativos al pico nº4 son: Arabinosa, picos 1(0,76), 3(0,88), 4(1,00) y 5(1,21) y ramnosa, pico 2(0,81). Columna: 2m×3mm de Carbowax 20M al 0,5% sobre Chromosorb G, AW-DMCS, 80-100 mesh. Temperatura de la columna: 160°.

La columna de acero inoxidable de 2 m de longitud por 3 mm de diámetro externo, contiene ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom. Q, 100-120 mesh.

Las temperaturas de los distintos elementos son;
Temperatura del bloque de inyección: 250°.
Temperatura del detector: 300°.
Temperatura de la columna: 190° isoterma.

El gas portador es nitrógeno a 30 ml por minuto.

Los cromatogramas de los acetatos de alditoles se reproducen en la figura 3. Los tiempos de retención relativos están calculados respecto al inositol, usado como patrón interno.

Resultado:

En los polisacáridos extraídos con agua de la muestra A, se encuentran los siguientes azúcares: Ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

Determinación cuantitativa por cromatografía gas-líquido.

La determinación cuantitativa de los azúcares que componen los polisacáridos se ha realizado por --

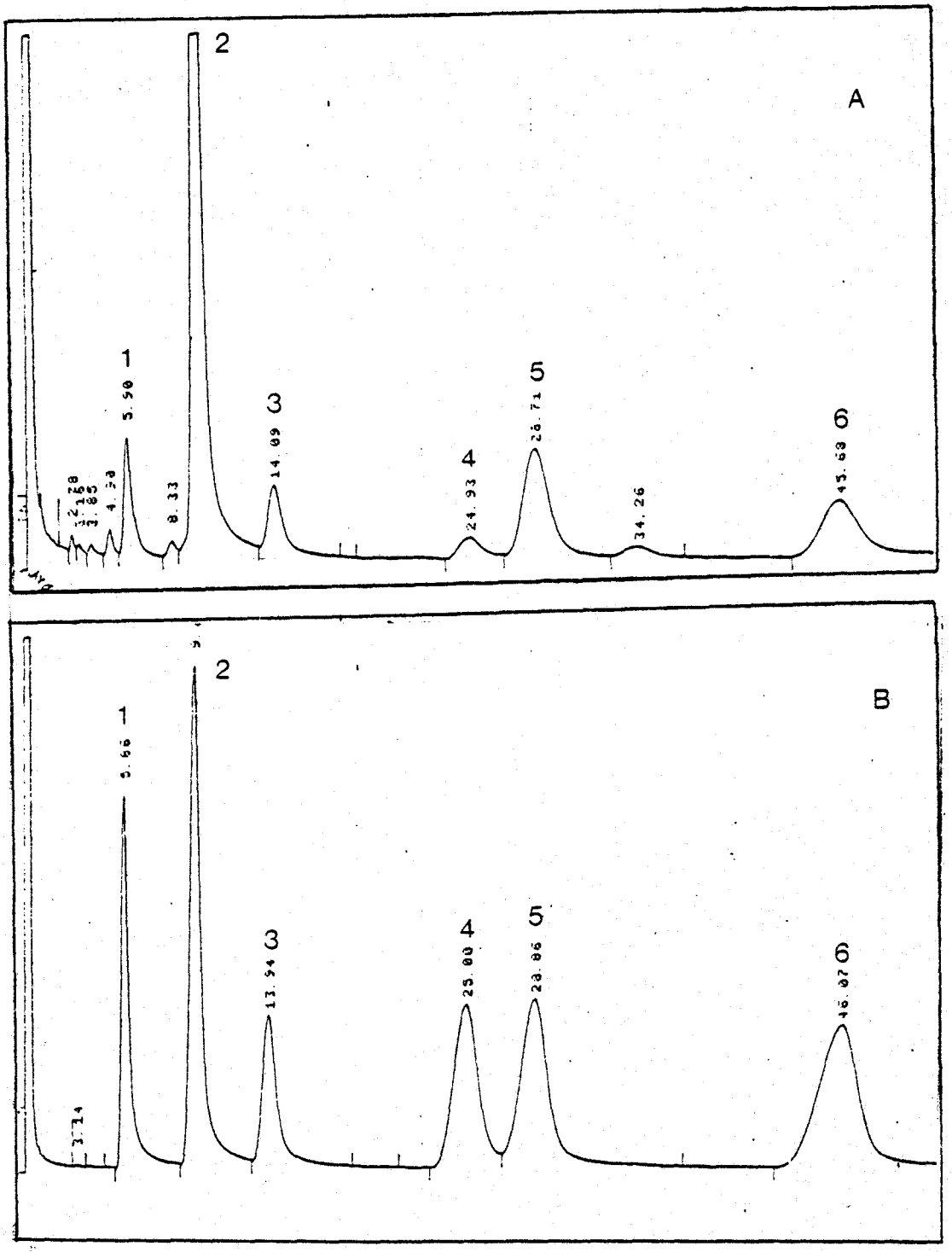


Fig. 3. Cromatografía gas-líquido como acetato de alditoles. A) Polisacáridos sol. en agua (Fracc. A-1). B) - Referencias. Los picos correspondientes a cada azúcar y sus tiempos de retención relativos al inositol son: Ramnosa, pico 1(0,13); arabinosa, pico 2(0,21); xilosa, pico 3(0,30); manosa, pico 4(0,54); galactosa, pico 5(0,63) e inositol, pico 6(1,00). Columna: 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q,100-120 mesh.Temperatura de la columna 190°.

cromatografía gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles. La preparación de derivados, la -- instrumentación y las condiciones cromatográficas son las descritas en este mismo apartado.

El método usado en la determinación cuantitativa ha sido el del patrón interno. Este se añade des--- pués de realizada la separación entre azúcares neutros y ácidos, antes de proceder a la reducción (33). El patrón elegido es el inositol, cuyo pico no coincide con el de ninguno de los azúcares presentes.

Blake y colb. (33) estudian la precisión del método, encontrando que los errores son inferiores al 5%.

El calibrado es como sigue:

En primer lugar,se calculan los factores de respuesta del detector para los distintos azúcares a analizar. Para ello se prepara una muestra de referencia que contiene cantidades conocidas de los azúcares presentes en el hidrolizado, en proporciones análogas a - como se encuentran en la mezcla problema, así como una cantidad también conocida del patrón interno. Se preparan sus derivados,siguiendo el mismo procedimiento que se sigue con el problema y se cromatografía. Se introducen en la memoria del integrador con que va equipado

el cromatógrafo, las cantidades de los azúcares y del patrón interno y éste calcula los factores de respuesta para cada azúcar referidos al patrón interno, valor que guarda en la memoria. Estos factores de respuesta se comprueban cromatografiando otra muestra patrón análoga a la anterior, y se observa que los errores son menores del 5%.

Posteriormente, se cromatografía la muestra problema, a la que se le había añadido una cantidad conocida del patrón interno, y al término del cromatograma, el integrador da directamente las cantidades de cada uno de los azúcares presentes en dicha muestra.

En todo nuestro trabajo, se han realizado al menos tres determinaciones para cada problema y las cantidades que se dan en los análisis, son las medias aritméticas de las determinaciones efectuadas.

En la tabla I se detallan los resultados del análisis cuantitativo del hidrolizado de la fracción soluble en agua (muestra A) (200 mg), al que se le ha añadido inositol (2,59 mg). Se expresan en tantos por ciento del total de muestra y del total de azúcares.

TABLA I

Análisis cuantitativo de la fracción soluble en agua (muestra A).Fracción A-1

Azúcares	Cantidad(mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	1,25	0,62	6,67
Arabinosa	11,55	5,77	61,60
Xilosa	1,49	0,74	7,95
Manosa	0,64	0,32	3,41
Galactosa	3,82	1,91	20,37
Total	18,75	9,37	100,00

Estos resultados demuestran que en la fracción extraída con agua de la pulpa de aceituna se encuentran polisacáridos del tipo de las arabinogalactanas, que son frecuentes en las paredes celulares de las plantas. Sin embargo, el porcentaje de azúcares con relación al peso total de muestra es pequeño (9,34%), por lo que se hace necesario, para el estudio de su estructura, purificar esta fracción.

3.2. Purificación de los polisacáridos solubles en agua por cromatografía sobre geles porosos. Fracciones A-1-1 y A-1-2.

La cromatografía de filtración sobre geles porosos, también conocida como cromatografía sobre tamices moleculares, está basada en la permeabilidad decreciente de las moléculas de un soluto, a través de una red tridimensional de geles hinchados, en función de su peso molecular creciente. Si una solución que contiene una mezcla de solutos de distintos pesos moleculares, se pasa a través de una columna rellena con un gel apropiado, las moléculas más pequeñas penetran en los poros del gel siendo retenidas más tiempo en la columna. Los solutos saldrán por tanto en orden inverso al peso molecular.

En consecuencia, esta técnica es un procedimiento rápido y sencillo para separar sustancias que difieren en el peso molecular y, por consiguiente, sirve para el fraccionamiento y purificación de polisacáridos.

A continuación mencionamos algunos trabajos sobre el tema que nos han servido de guía en nuestro estudio.

Kringstad y colb. (53) fraccionan sobre Sephadex G-100, hemicelulosas extraídas con NaOH al 10% y precipitadas con metanol.

Stacey y colb. (54, 55) usan la cromatografía sobre Sephadex G-100, para separar los polisacáridos extraídos de la soja de sustancias coloreadas de bajo peso molecular.

Barker y colb. (56) purifican un polisacárido extraído de neumococos, por cromatografía sobre Sephadex G-200 eluyendo con NaCl N.

Romanowska (57) purifica un lipopolisacárido de la pared celular de una bacteria, utilizando geles de agarosa.

Brunngraber y colb. (58) purifican sobre Sepha-

dex G-200 una sialoglicosaminoglicana extraída del cerebro de la rata.

Nosotros purificamos, por cromatografía de filtración sobre Sephadex G-50, la fracción soluble en agua de la pulpa de aceituna de la variedad "manzanilla" (muestra A), previamente extraída con etanol del 80% y hexano. Este gel, de la firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, está formado por cadenas de dextranos entrecruzadas con epiclorohidrina, en el que las distintas porosidades se consiguen variando el grado de entrecruzamiento. Presenta un rango de fraccionamiento para polisacáridos de 500-10000 de peso molecular, tiene un tamaño de partícula entre 20 y 80 micras y cada gramo de gel seco proporciona 10 ml de lecho.

Se ha utilizado una columna de vidrio de 1 m de longitud y 2,9 cm de diámetro interno. Para llenar la columna se pesan los gramos de gel seco, para que, teniendo en cuenta el agua que absorbe el gel al hincharse, proporcione los mililitros necesarios para alcanzar la altura deseada. El gel debe hincharse durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación o una hora si se calienta a 90°. En el primer caso y antes de llenar la columna, debe eliminarse el aire que haya podido quedar ocluido succionando con una trompa de agua. Seguidamente se vierte el relleno en la columna, que debe estar perfectamente vertical, teniendo la precaución de que no

queden retenidas burbujas de aire. Se coloca un disco de papel de filtro en la parte superior del lecho y se hacen pasar dos o tres volúmenes de eluyente, en este caso agua, para estabilizar la columna.

La muestra (200 mg) de la fracción soluble en agua, disuelta en agua (5 ml) se coloca en la parte superior del lecho de la columna y se hace pasar el eluyente a una velocidad de 12 ml/hora, recogiéndose fracciones de 10 ml, en un colector automático. El curso de la separación en la columna se sigue mediante la determinación colorimétrica de azúcares, por el método de la antrona, en las fracciones recogidas.

Reactivo de antrona (59):

Se añade lentamente H_2SO_4 (96-97%) (333 ml) sobre agua destilada (140 ml), cuidando que no suba la temperatura por encima de 110°. Se disuelve tiourea (5 g) en esta disolución, se enfría por debajo de 90°y se le añade de antrona (0,25 g). El reactivo debe guardarse a 4° en frigorífico.

Procedimiento: A una parte alícuota de cada fracción recogida (1 ml), se le añade el reactivo (10 ml). El tubo en que se realiza la reacción se tapa, se agita y se calienta en agua a ebullición durante 15 minutos. Se enfría y se mide la absorción en un fotocolorímetro

a 620 nm.

Las absorciones correspondientes a las fracciones recogidas, se incluyen en la tabla II y la representación gráfica en la figura 4.

A la vista de los resultados, podemos agrupar las fracciones recogidas de la siguiente manera:

Fracción A-1-1. Tubos 14 al 20
Fracción A-1-2. Tubos 35 al 45

Ambas fracciones se concentran en un rotavapor, se secan a vacío sobre pentóxido de fósforo y se pesan. La fracción A-1-1 (24 mg) supone un 12% del peso de muestra colocado en la columna, y la fracción A-1-2 (76 mg) supone un 38%. Este fraccionamiento es reproducible. El aspecto físico que presentan ambas fracciones, después de concentradas y secas, es el de escamas brillantes, de color marrón claro para la fracción A-1-1 y más oscuras para la fracción A-1-2.

Dada la naturaleza del Sephadex G-50 utilizado en la separación, las fracciones aisladas son de pesos moleculares muy distintos, debiendo corresponder la eluida en primer lugar a la fracción de peso molecular alto y la segunda a sustancias de peso molecular

Tabla II

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción A-1-1 sobre Sephadex G-50.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
2-12	0,000	26	0,056	40	0,137
14	0,012	28	0,045	42	0,078
16	0,214	30	0,048	44	0,033
18	0,112	32	0,045	46	0,030
20	0,070	34	0,043	48	0,014
22	0,060	36	0,054	50	0,010
24	0,057	38	0,085	52-68	0,000

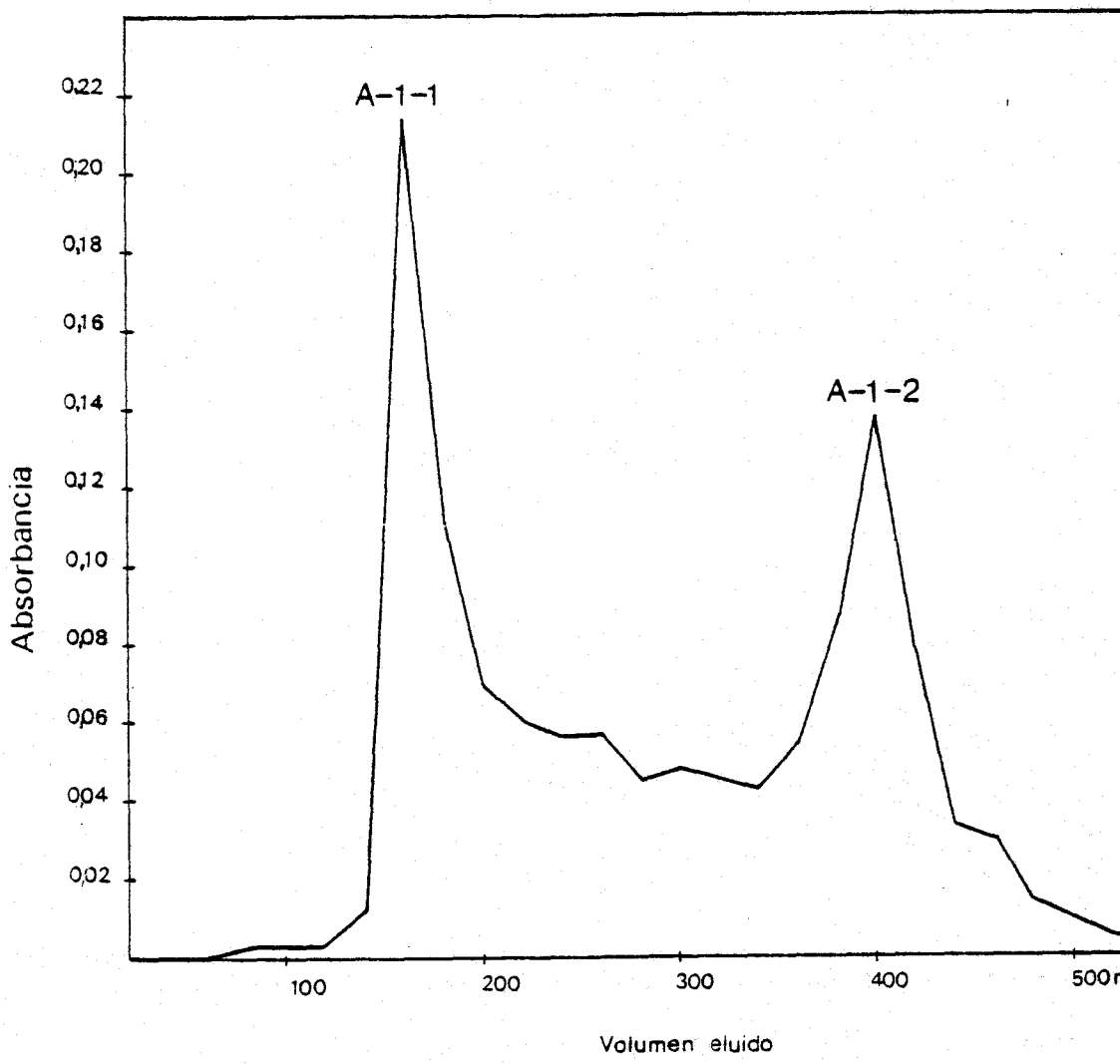


Fig. 4. Purificación de los polisacáridos solubles en agua (Fracc. A-1) sobre Sephadex G-50.

bajo, probablemente productos de degradación de los polisacáridos.

3.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos en la fracción A-1-1.

La fracción A-1-1 (11 mg) se hidroliza, calentando a ebullición con H_2SO_4 N durante 5 horas. Se neutraliza con $BaCO_3$, y la disolución filtrada se pasa a través de dos columnas de Amberlita IR-120 H^+ e IRA-400 AcO^-, se eluye con agua, se concentra a pequeño volumen y se le añade una disolución acuosa de inositol (50 mg por 25 ml), (2 ml). Se preparan los acetatos de alditoles y se cromatografían, como se describe en el apartado 3.1.4.3, siendo la temperatura de la columna 185°.

Uno de los cromatogramas obtenidos se reproduce en la figura 5 y permite identificar, por sus tiempos de retención, a la ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

Los resultados del análisis cuantitativo se detallan en la tabla III.

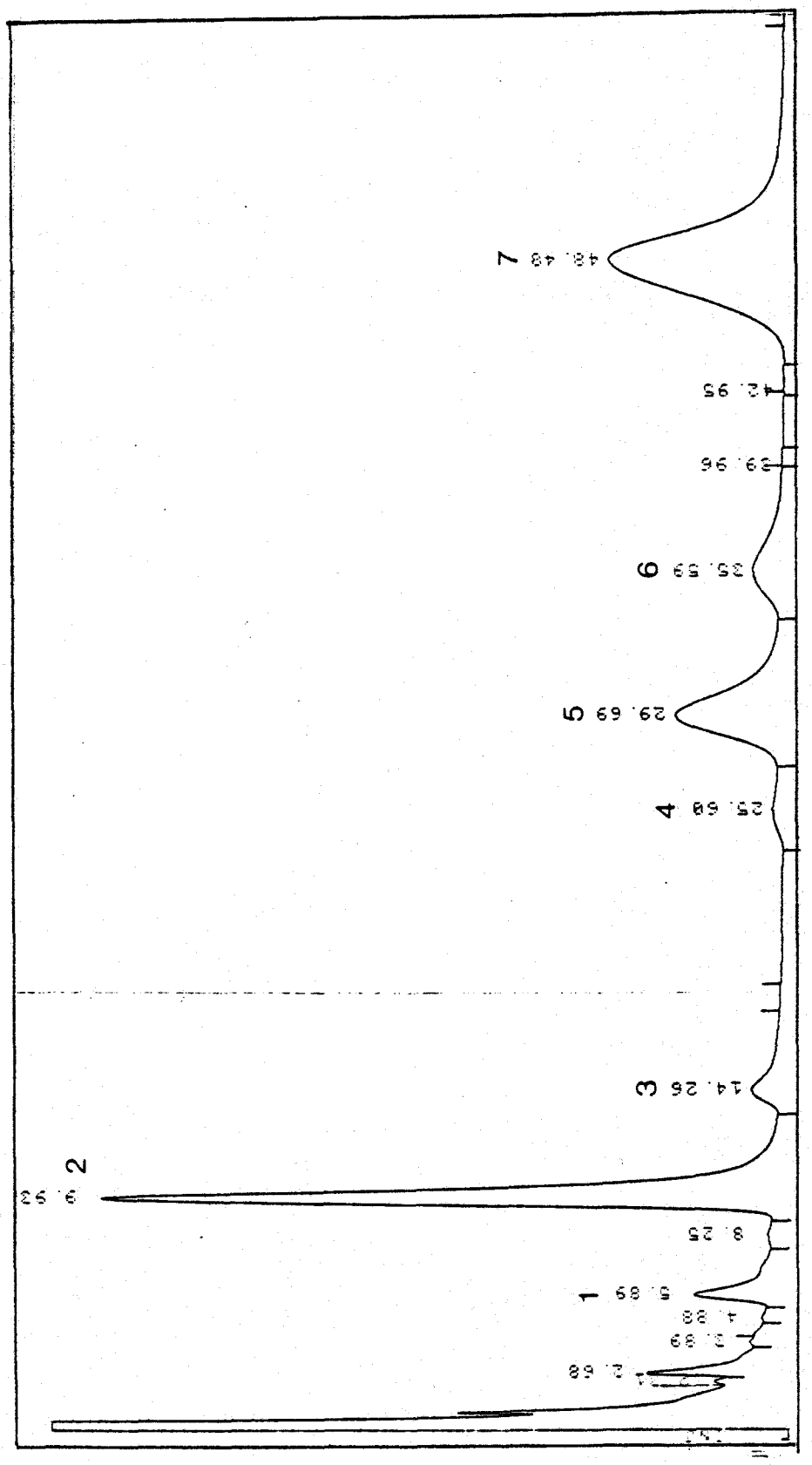


Fig. 5. Cromatografía gas-líquido como acetato de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción A-1-1. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, manosa; 5, galactosa; 6, glucosa y 7, inositol (patrón interno). Columna: 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura de la columna 185°.

Tabla III

Análisis cuantitativo de la fracción A-1-1.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,09	1,73	5,77
Arabinosa	1,86	16,90	56,53
Xilosa	0,12	1,09	3,65
Manosa	0,07	0,64	2,13
Galactosa	0,85	7,73	25,83
Glucosa	0,20	1,82	6,08
Total	3,29	29,95	99,99

3.2.2. Determinación de ácido galacturónico en la fracción A-1-1.

Se realiza por el método del carbazol (60).

Preparación de reactivos:

Disolución A: A H_2SO_4 concentrado (195 ml) se le añade una disolución molar de $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ (5 ml).

Disolución B; Carbazol al 0,1% en etanol.

Los reactivos son estables durante tres meses, si se guardan en la oscuridad en frigorífico.

Procedimiento: Al reactivo A (6 ml) en un tubo de ensayo enfriado a 0° se le añade lentamente y con agitación la disolución problema (1 ml) que contiene ácido galacturónico (4 a 60 µg). Se agita vigorosamente y se calienta en un baño de agua a 100°, durante 15 ó 20 minutos, se deja enfriar a la temperatura ambiente, se le añade el reactivo B (0,2 ml), se agita, se calienta a 100°durante 10 minutos y se deja estar tres horas en la oscuridad. Pasado este tiempo se mide la absorbancia a 530 nm.

Para la determinación cuantitativa es necesario construir una recta de calibrado. Para ello se prepara una disolución de ácido galacturónico (60 mg) en agua destilada (1 l). De esta disolución, mediante diluciones se preparan diez soluciones de referencia. Las referencias y las muestras problemas se someten simultáneamente a la reacción colorimétrica, de manera que las condiciones sean las mismas.

Con los datos de absorbancia y de concentración de ácido galacturónico, que se detalla en la tabla IV, se construye la recta de calibrado que se muestra en la figura 6.

Determinación del ácido galacturónico en la fracción A-1-1: Una muestra de la fracción A-1-1 (20 mg), se hidroliza con H_2SO_4 N. Se neutraliza, se filtra y el filtrado se pasa sucesivamente por columnas que contienen Amberlita IR-120 H^+ e IRA-400 AcO^-. Se eluyen ambas con agua y la aniónica con AcOH 10%. Los eluatos se concentran y se lleva a un volumen exacto de 10 ml. Se toma 1 ml y se diluye a 5 ml, y de esta disolución, se toma 1 ml que denominamos muestra A-1-1-1. Otro ml se diluye a 10 ml y de esta solución se toma 1 ml que denominamos muestra A-1-1-2.

Tabla IV

Concentraciones y absorbancias de las disoluciones de referencia de ácido galacturónico.

Disolución de referencia.	Concentración de ác.galacturónico (µg/ml).	Absorbancia
1	6	0,076
2	12	0,097
3	18	0,168
4	24	0,215
5	30	0,260
6	36	0,315
7	42	0,362
8	48	0,380
9	54	0,453
10	60	0,496

Sometidos a la reacción colorimétrica y medidas las absorbancias, se obtienen los siguientes resultados:

Muestra	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Acido galacturónico (%)
A-1-1-1	0,344	40	10
A-1-1-2	0,178	19	99

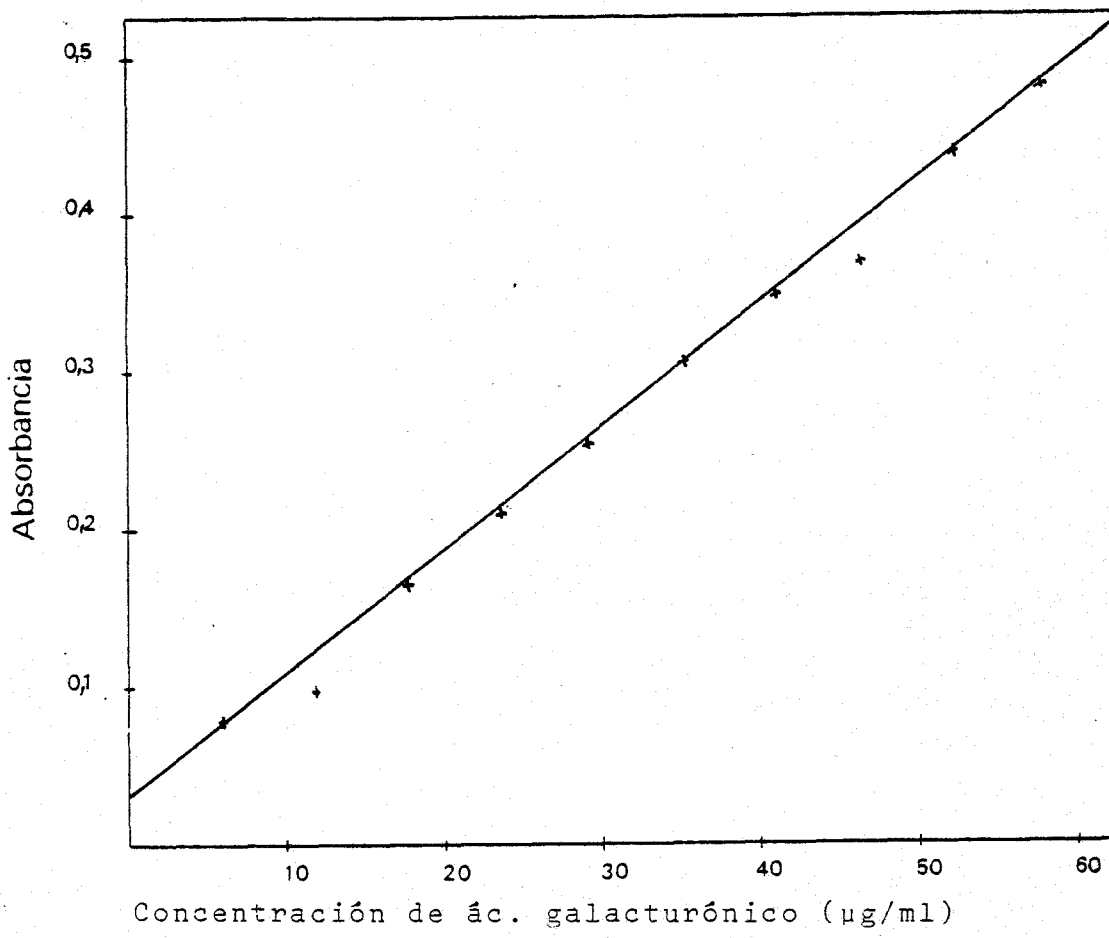


Fig. 6. Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de ácido galacturónico por el método del carbazol.

El resultado de la determinación cuantitativa de los monosacáridos y del ácido galacturónico en la fracción A-1-1 nos lleva a la conclusión de que en ésta se encuentra un polisacárido del tipo de las arabinogalactanas, que en la bibliografía se incluyen entre las hemicelulosas solubles en agua y en soluciones alcalinas diluidas.

3.2.3. Identificación y determinación de monosacáridos en la fracción A-1-2.

Se procede de manera análoga a la descrita en el apartado 3.2.1, para la fracción A-1-1.

Se identifican por cromatografía gas-líquido.

Los resultados cuantitativos se dan en la tabla V. El cromatograma se representa en la figura 7.

3.2.4. Determinación de ácido galacturónico en la fracción A-1-2.

Se procede de manera análoga a la descrita en el

Tabla V

Análisis cuantitativo de la fracción A-1-2.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,08	0,67	10,26
Arabinosa	0,31	2,58	39,74
Xilosa	0,05	0,42	6,41
Galactosa	0,17	1,42	21,79
Glucosa	0,17	1,42	21,79
Total	0,78	6,51	99,99

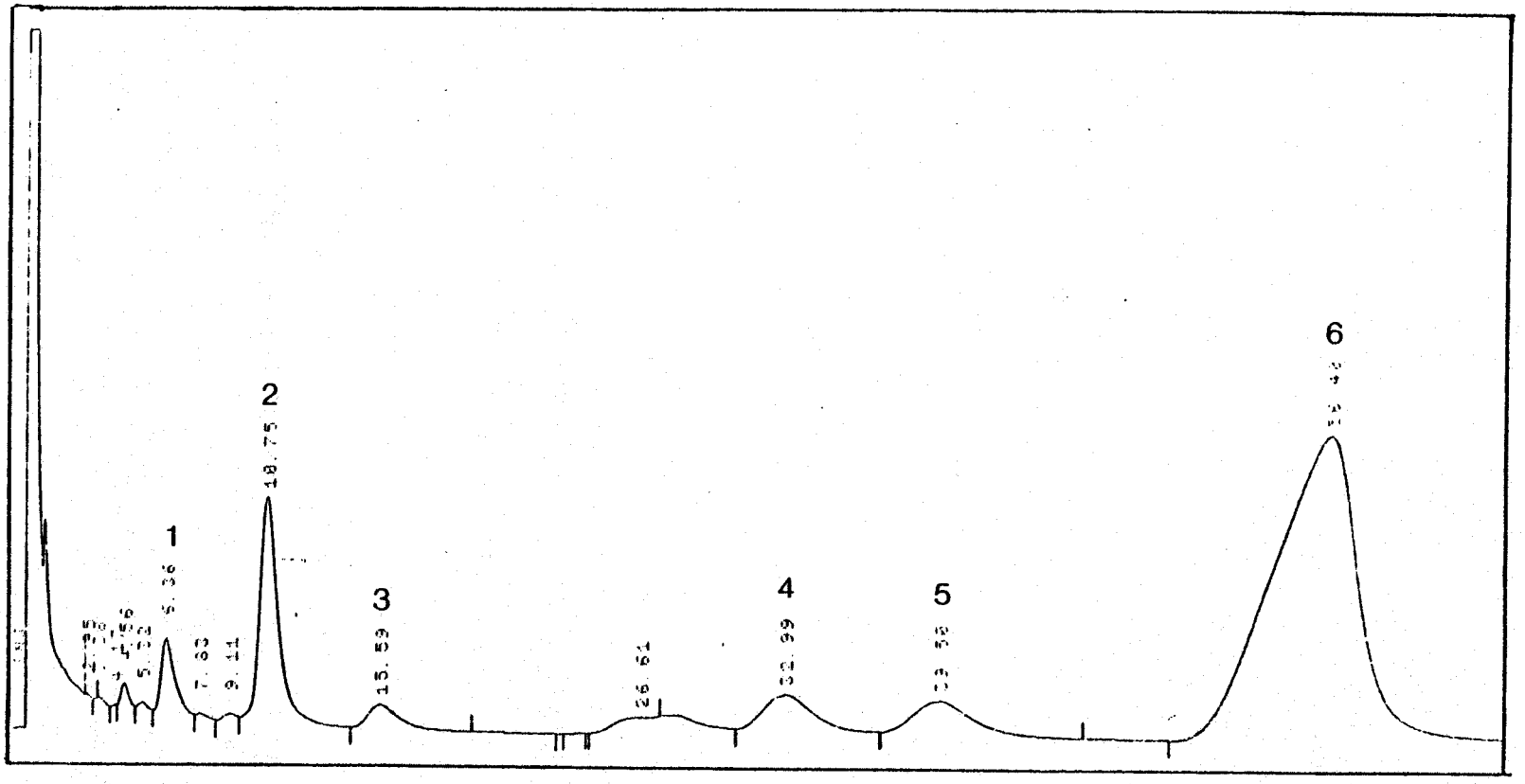


Fig. 7. Cromatografía gas-líquido como acetato de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción A-1-2. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q,100-120 mesh. Temperatura 185°.

apartado 3.2.2, preparándose las muestras A-1-2-1 y A-1--2-2.

Los valores de absorción, concentración y tanto - por ciento se detallan a continuación.

Muestra	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Acido galacturónico (%)
A-1-2-1	0,205	22	5,5
A-1-2-2	0,116	11	5,5

A la vista de los resultados, podemos considerar que la parte de polisacárido de la fracción A-1-2, presenta una composición similar a la fracción A-1-1. Sin embargo, dado su comportamiento en la filtración sobre Sephadex G-50, tiene un peso molecular bajo, por lo que es probable que se trate de fragmentos de la arabinogalactana que se encuentra en la fracción A-1-1.

3.3. Aislamiento de polisacáridos solubles en agua. Muestra B.

3.3.1. Preparación de la pulpa.

La pulpa de aceitunas de la variedad "manzanilla"

recogidas el 1 de Noviembre de 1979, que se ha denominado muestra B, se somete a estabilización y a extracción con etanol del 80% y con disolventes orgánicos, tal como se describe a continuación:

La pulpa deshuesada y triturada (3,8 Kg, que corresponden a 5,5 Kg de fruto), se estabiliza con etanol del 96% (12 l) calentando a ebullición durante 14 horas y media. Se decanta el alcohol, se añade etanol del 80% (12 l) y se continúa el calentamiento durante 22 horas más. Se decanta nuevamente el alcohol, se añade una mezcla de cloroformo y metanol (1:1), (12 l) y se calienta durante 21 horas a 60°. Por último, la pulpa se extrae en un sohxlet con una mezcla de cloroformo-metanol (3:1). El sólido residual (196 g) constituye un 5% respecto a la pulpa y un 3,5% respecto al fruto.

3.3.2. Extracción con agua. Fracción B-1.

La pulpa de la muestra B (50 g), preparada como se indica en el apartado anterior, se extrae a la temperatura ambiente con agua durante 20 horas con agitación. Se filtra y el filtrado se concentra a pequeño volumen y se precipita con 4 volúmenes de alcohol del 96%. Rendi--

miento, 4 g.

3.3.3. Extracción con agua caliente. Fracción B-2.

El resto de pulpa insoluble, después de la extracción con agua a la temperatura ambiente, se extrae con agua a ebullición durante 15 horas. Se filtra, se concentra y se precipita con 4 volúmenes de etanol. Rendimiento, 4,7 g.

3.3.4. Tratamiento con metóxido sódico y extracción con agua caliente. Fracción B-3.

El residuo de pulpa, después de las extracciones anteriores, se trata con metóxido sódico 0,25 M en metanol y se extrae a continuación con agua a 100°.

Este tratamiento de purificación del material hemicelulósico, se hace basándonos en los trabajos de Bacon y colb. (61) y Hartley(62, 63), que demuestran que en las paredes celulares de los tejidos de las plantas, se encuentran ácidos fenólicos (p-cumárico y ferúlico)y otros ácidos carboxílicos, que esterifican hidroxilos de los -

polisacáridos.

El tratamiento con metóxido sódico, libera los -- grupos hidroxilos, facilitando la extracción de los polisacáridos y su purificación (64).

Procedimiento: La pulpa que queda después de las extracciones que se indican en los apartados 3.3.2 y 3.3.3, se trata con metóxido sódico 0.25 M en metanol (1 1) tres veces durante 24 horas cada vez. Se elimina el metóxido sódico, lavando con metanol y se extrae con agua (1 1) a ebullición durante 24 horas. El extracto filtrado se - precipita con etanol, se filtra y se seca. Rendimiento - 1,6 g.

3.4. Cromatografía de filtración sobre geles porosos.

La cromatografía sobre gel se utiliza en la determinación de los pesos moleculares de los polisacáridos. En relación con ello es necesario definir los siguientes conceptos:

Volumen de elución de un soluto, V_e: Es el volumen de fase móvil que es necesario pasar a traves del - lecho cromatográfico hasta que emerge el soluto a tan--

máxima concentración.

Volumen vacío, V_o: Es el volumen de elución de moléculas que se distribuyen solamente en la fase móvil, ya que su tamaño molecular es mayor que los mayores poros del gel. Estas moléculas tienen un peso molecular superior al límite de exclusión del gel.

Volumen de la fase estacionaria, V_i: Es el volumen de disolvente dentro de los poros del gel, que solamente será utilizado por moléculas muy pequeñas.

Una molécula totalmente excluida, dado su gran tamaño, tendrá un volumen de elución $V_e = V_o$.

Una molécula muy pequeña tendrá un volumen de elución $V_e = V_o + V_i$.

Una molécula de tamaño comprendido entre las dos situaciones límites anteriores, tendrá un volumen de elución comprendido entre V_o y $V_o + V_i$.

Para una columna dada, el comportamiento del soluto vendrá determinado por su volumen de elución. Pero esta caracterización tiene el inconveniente de depender del tamaño de la columna. Para evitar esto, se define el comportamiento del soluto en función del coeficiente de

distribución, K_d. Se define K_d como la fracción de fase estacionaria accesible a una determinada molécula de soluto. El volumen de elución vendrá dado por $V_e = V_o + K_d V_i$ de donde se deduce que: $K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$.

Para un soluto que es excluido totalmente, $K_d=0$; para un soluto de tamaño molecular muy pequeño, para el que es igualmente accesible el volumen vacío que el volumen de los poros, $K_d = 1$. Los valores $0 < K_d < 1$, corresponderán a las moléculas cuyo tamaño esté incluido dentro del rango de fraccionamiento del gel utilizado. Valores de K_d superiores a 1, implican la existencia de adsorciones o interacciones iónicas entre las moléculas de soluto y el lecho cromatográfico. El coeficiente de distribución es independiente del tamaño de la columna, del tamaño del lecho y de la densidad del empaquetamiento, siendo por tanto adecuado para comparar el comportamiento de un soluto cuando las experiencias se realizan utilizando distintas columnas o diferentes medios.

En la figura 8 representamos una separación teórica donde se indican los parámetros definidos anteriormente. Se eluyen tres solutos: El soluto A se excluye totalmente de los poros del gel ($K_d=0$); el soluto B se excluye de los poros más pequeños ($K_d=0,5$) y el soluto C no se excluye ($K_d=1$).

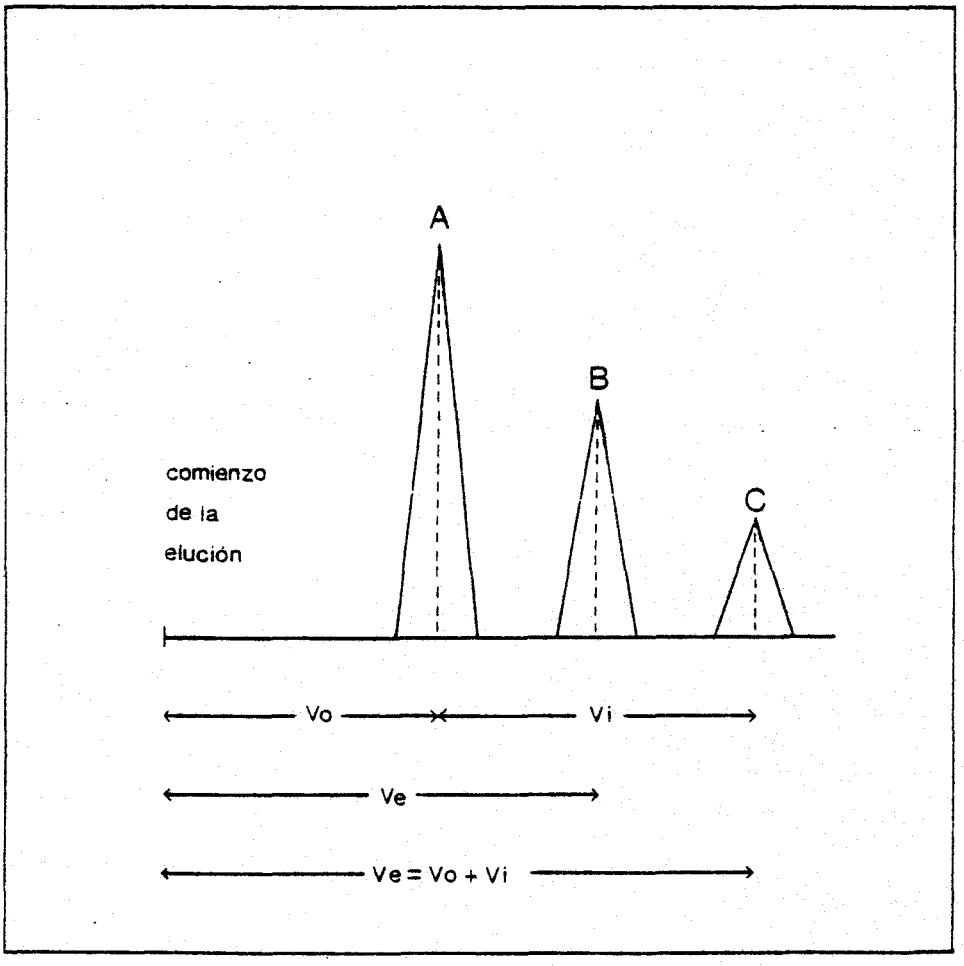


Fig. 8. Elución teórica de tres solutos de distintos pesos moleculares, en una columna de filtración sobre gel. A, se excluye totalmente (K_d=0); B, se excluye de los poros más pequeños (K_d≈0,5) y C, no se excluye (K_d=1).

Según hemos visto, para el cálculo de K_d es necesario conocer V_o y V_i; por ello, lo primero que se hace después de montar una columna es determinar estos valores. Se lleva a cabo de la siguiente forma:

Determinación de V_o: Ordinariamente se usa dextrano azul 2000 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). Es un dextrano de origen bacteriológico, con un colorante azul enlazado químicamente y que tiene un peso molecular de 2×10^6. Se coloca en la columna, se eluye y de las fracciones eluidas la que presenta una coloración más intensa nos da el volumen que corresponde al valor de V_o.

El empleo del dextrano azul permite también examinar cómo ha quedado empaquetada la columna.

Determinación de V_i: Se utiliza glucosa o sacarosa, salvo en aquellos geles de tamaño de poro muy pequeño donde se usa el ión cloruro. Unos miligramos de glucosa se pasan por la columna y se detecta su salida por un método fotocolorimétrico. V_i será: $V_i = V_{e\ glucosa} - V_o$.

En este trabajo se estudia el comportamiento de las fracciones B-1, B-2 y B-3 sobre geles porosos, denominados Sephadex G-50, Sephadex G-75 y Sephacryl S-300 de la firma Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia.

Las características del Sephadex G-50 ya han sido descritas en el apartado 3.2.

El Sephadex G-75 es un gel análogo al anterior, cuyo rango de fraccionamiento va desde 1000 a 50000 de peso molecular. El tamaño de partícula es de 40 a 120 micras y cada gramo de gel seco proporciona de 12 a 15 ml de lecho. El tiempo necesario para hinchar el gel, es de 24 horas a temperatura ambiente o 3 horas si se calienta a 90°.

El Sephacryl S-300 es un gel que ha aparecido recientemente en el mercado. Está formado por cadenas de dextranos que están entrecruzadas con N,N'-metilenbisacrilamida. Su tamaño de partícula es de 40-105 micras y su rango de fraccionamiento va de 1000-750000. La casa comercial lo suministra hinchado en forma de suspensión en agua.

Se usa una columna de vidrio de 2,9 cm de diámetro interno. La altura del lecho ha sido distinta según el relleno, y se especificará en cada caso. La velocidad de flujo es de 0,35 ml/min, para la columna de Sephadex G-50 y de 0,5 ml/min para los otros dos rellenos. En este último caso, la elución fue realizada con la ayuda de una bomba peristáltica modelo P-3 de la casa Pharmacia Fine Chemicals.

Los valores de V_o y V_i se determinan pasando una disolución que contiene dextrano azul 2000 y glucosa.

Se utiliza agua destilada como eluyente en las columnas de Sephadex G-50 y G-75, y NaCl 0,5M en las columnas de Sephacryl S-300. Se recogen fracciones de 10 ml con un colector automático de fracciones y el curso de la separación se sigue mediante el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según Smith y col. (65,66).

Procedimiento: A la muestra (1 ml) que contiene el azúcar (4-40 µg), se le añade una disolución de fenol en agua al 5% (1 ml) y a continuación H_2SO_4 conc. (95-97%) (5 ml), agitando durante la adición. Se deja estar la mezcla durante 30 min y se mide la absorbancia a 490 nm frente a un blanco (1 ml de agua destilada en las mismas condiciones).

3.4.1. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-50.

Se usa una columna con una altura de lecho de 73 cm. Los valores de V_o y V_i calculados son: V_o= 160 ml y V_i= 270 ml.

Tabla VI

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-50.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	25	0,820	43	0,082
14	0,384	28	0,170	44	0,078
15-18(*)	——	30	0,088	45	0,047
19	1,650	35	0,024	46	0,013
20	1,450	40	0,035	47-50	0,000
23	0,860	42	0,072		

(*) Las fracciones 15-18, presentan valores de absorbancia superiores a los que se puede medir en el fotocolorímetro. Dichas fracciones se vuelven a medir y se usa como blanco la fracción 19. La máxima absorbancia corresponde a la fracción 16.

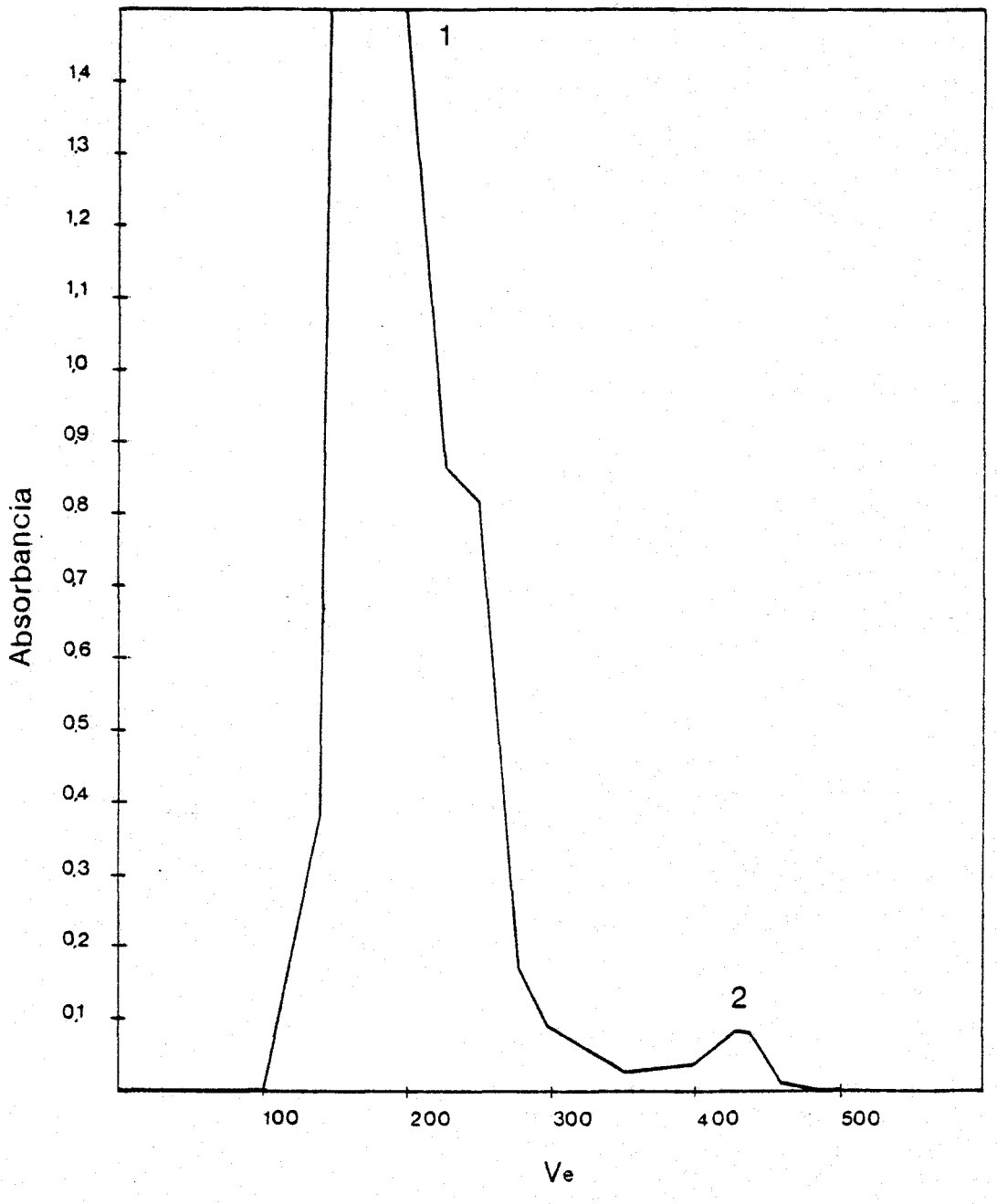


Fig. 9. Diagrama de elución de la fracción B-1, sobre Sephadex G-50.

Se cromatografía la fracción B-1 (100 mg) disuelta en agua (2 ml).

Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se recogen en la tabla VI y se representan, frente al volumen de elución, en la figura 9. En el diagrama de elución hay dos máximos (picos 1 y 2) que presentan los volúmenes de elución y los coeficientes de distribución siguientes:

V_{e1} = 160 ml K_{d1} = 0

V_{e2} = 430 ml K_{d2} = 1

El pico 1 integra la mayor parte de la muestra cromatografiada y de acuerdo con el valor de V_e, se le asigna un peso molecular superior a 10000. El pico 2, supone una pequeña parte de la muestra y por su posición en la gráfica, tiene un peso molecular bajo, menor que el límite inferior del rango de fraccionamiento de de este gel.

3.4.2. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-75.

Se utiliza una columna con una altura de lecho de

Tabla VII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-75.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-12	0,000	26	0,710	38	0,250
13	0,355	27	0,690	39	0,235
14-16(*)	——	28	0,660	40	0,175
17	1,200	29	0,630	41	0,135
18	1,030	30	0,560	42	0,085
19	0,925	31	0,535	43	0,095
20	0,820	32	0,525	44	0,100
21	0,790	33	0,440	45	0,104
22	0,725	34	0,410	46	0,106
23	0,725	35	0,375	47	0,058
24	0,710	36	0,335	48	0,020
25	0,720	37	0,295	49-50	0,000

(*) El máximo valor de absorbancia corresponde a la fracción 15.

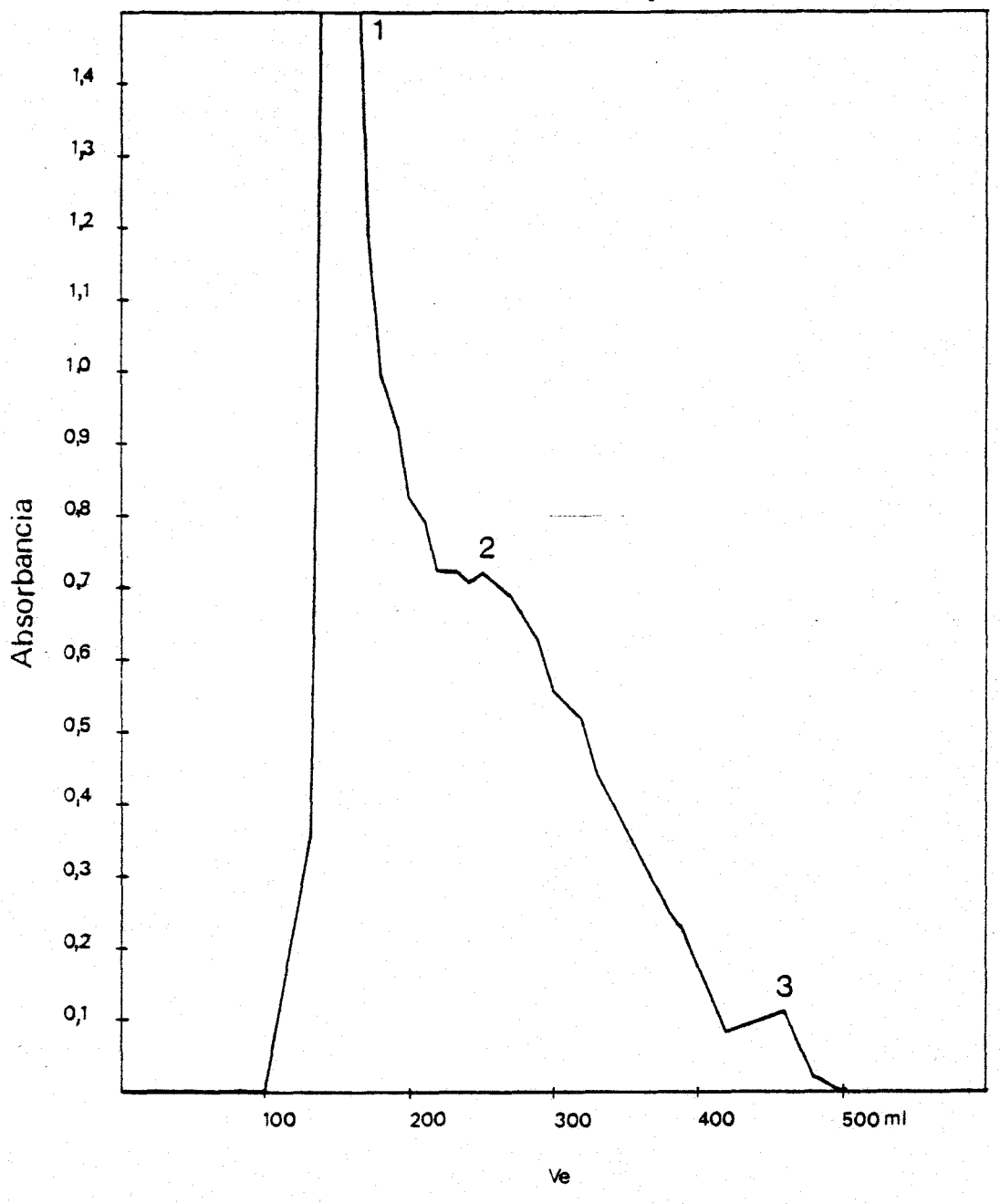


Fig. 10. Diagrama de elución de la fracción B-1, sobre Sephadex G-75.

70 cm. V_o = 150 ml y V_i = 310 ml.

Se cromatografía la fracción B-1 (80 mg) disuelta en agua (5 ml).

Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se recogen en la tabla VII y en la figura 10. En el diagrama de elución hay dos máximos (picos 1 y 3), y un hombro muy pronunciado (pico 2), a los que corresponden los volúmenes de elución y los coeficientes de distribución siguientes:

V_{e1} = 150 ml K_{d1} = 0

V_{e2} = 250 ml K_{d2} = 0,32

V_{e3} = 460 ml K_{d3} = 1

Estos resultados demuestran que una pequeña parte de la fracción B-1 tiene un peso molecular superior a 50000 y que el resto tiene un peso molecular inferior a este valor, aunque los picos no quedan bien resueltos en la gráfica.

3.4.3. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephacryl S-300.

Tabla VIII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-15	0,000	24	0,420	33	0,260
16	0,160	25	0,410	34	0,225
17	0,570	26	0,395	35	0,210
18	0,410	27	0,435	36	0,200
19	0,350	28	0,415	37	0,170
20	0,405	29	0,430	38	0,125
21	0,440	30	0,395	39	0,130
22	0,480	31	0,380	40	0,060
23	0,475	32	0,350	41	0,025
				42-45	0,000

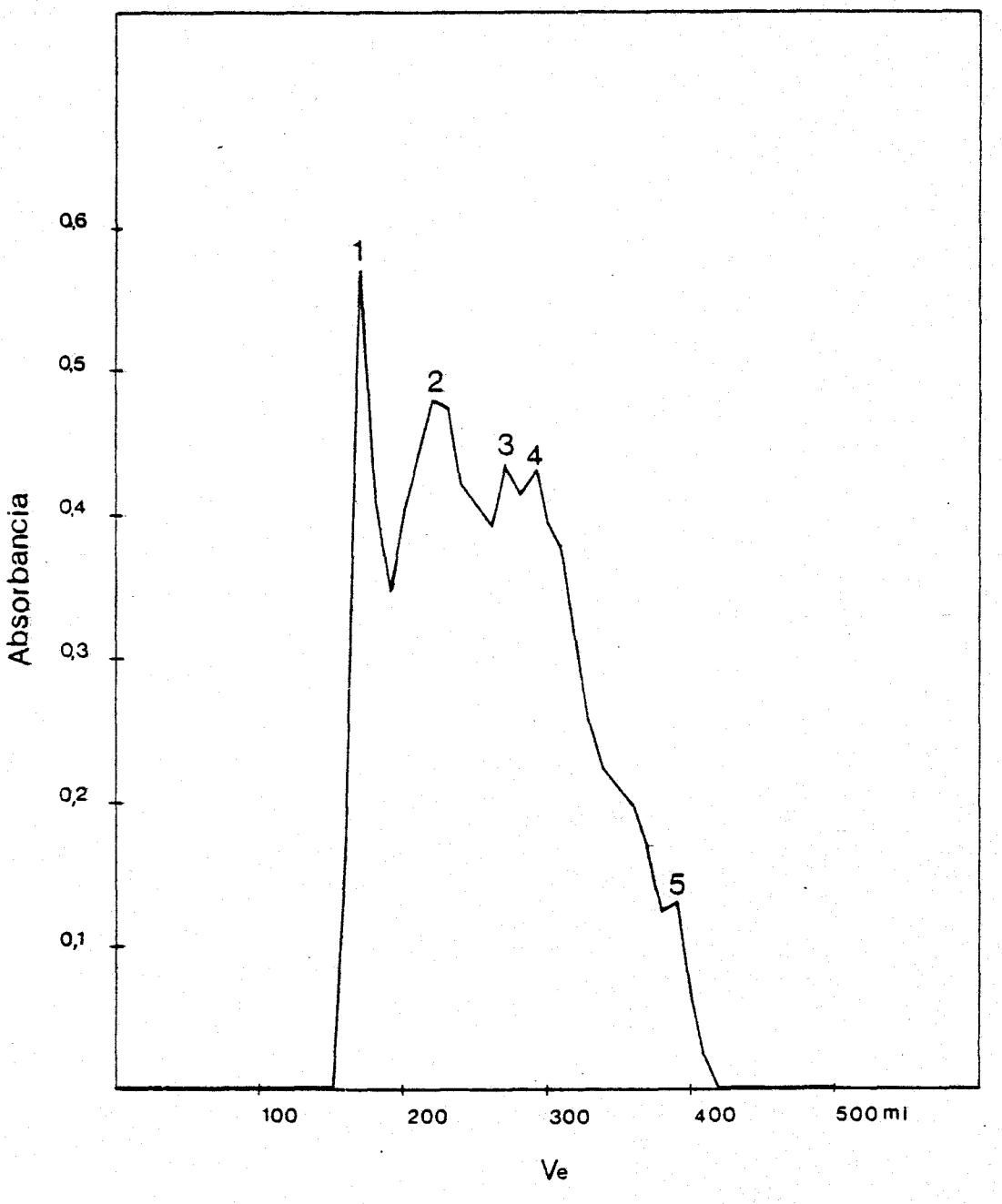


Fig. 11. Diagrama de elución de la fracción B-1, sobre Sephacryl S-300.

Se utiliza una columna con una altura de lecho de 62 cm. V_o = 170 ml y V_i = 230 ml.

Se cromatografía la fracción B-1 (37 mg), disuelta en NaCl 0,5M (3 ml), eluyendo con el mismo disolvente (NaCl 0,5M).

Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se incluyen en la tabla VIII y se representan en la figura 11. En el diagrama de elución hay 5 picos (1--5), a los que corresponden los volúmenes de elución y los coeficientes de distribución siguientes:

V_{e1} = 170 ml $\quad K_{d1} = 0$

V_{e2} = 220 ml $\quad K_{d2} = 0,22$

V_{e3} = 270 ml $\quad K_{d3} = 0,43$

V_{e4} = 290 ml $\quad K_{d4} = 0,52$

V_{e5} = 390 ml $\quad K_{d5} = 0,95$

El análisis de estos resultados demuestra que la fracción de polisacárido B-1 se integra en el rango de fraccionamiento del Sephacryl S-300 que va de 1000 a 750000.

3.4.4. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-50.

Se usa la misma columna que con la muestra B-1. V_o = 160 ml y V_i = 270 ml.

Se cromatografía la fracción B-2 (103 mg) disuelta en agua (5 ml).

Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se incluyen en la tabla IX y se representan frente a los volúmnenes de elución en la figura 12. El diagrama de elución, similar al de la muestra B-1, presenta dos picos con los siguientes valores de V_e y K_d.

V_{e1} = 160 ml $\qquad$ K_{d1} = 0

V_{e2} = 360 ml $\qquad$ K_{d2} = 0,74

El pico,1 que integra la mayor parte de la muestra,tiene un peso molecular superior a 10000. El pico 2 indica que existen oligosacáridos.

3.4.5. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-75.

Se usa una columna con una altura de lecho de 94 cm.

Tabla IX

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-50.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-11	0,000	28	0,375	40	0,345
12	0,318	30	0,365	41	0,236
15-17(*)	——	32	0,365	42	0,165
19	1,220	34	0,421	44	0,083
21	0,560	36	0,460	45	0,045
25	0,405	38	0,385	46-60	0,000

(*) El máximo valor de absorbancia corresponde a la fracción 16.

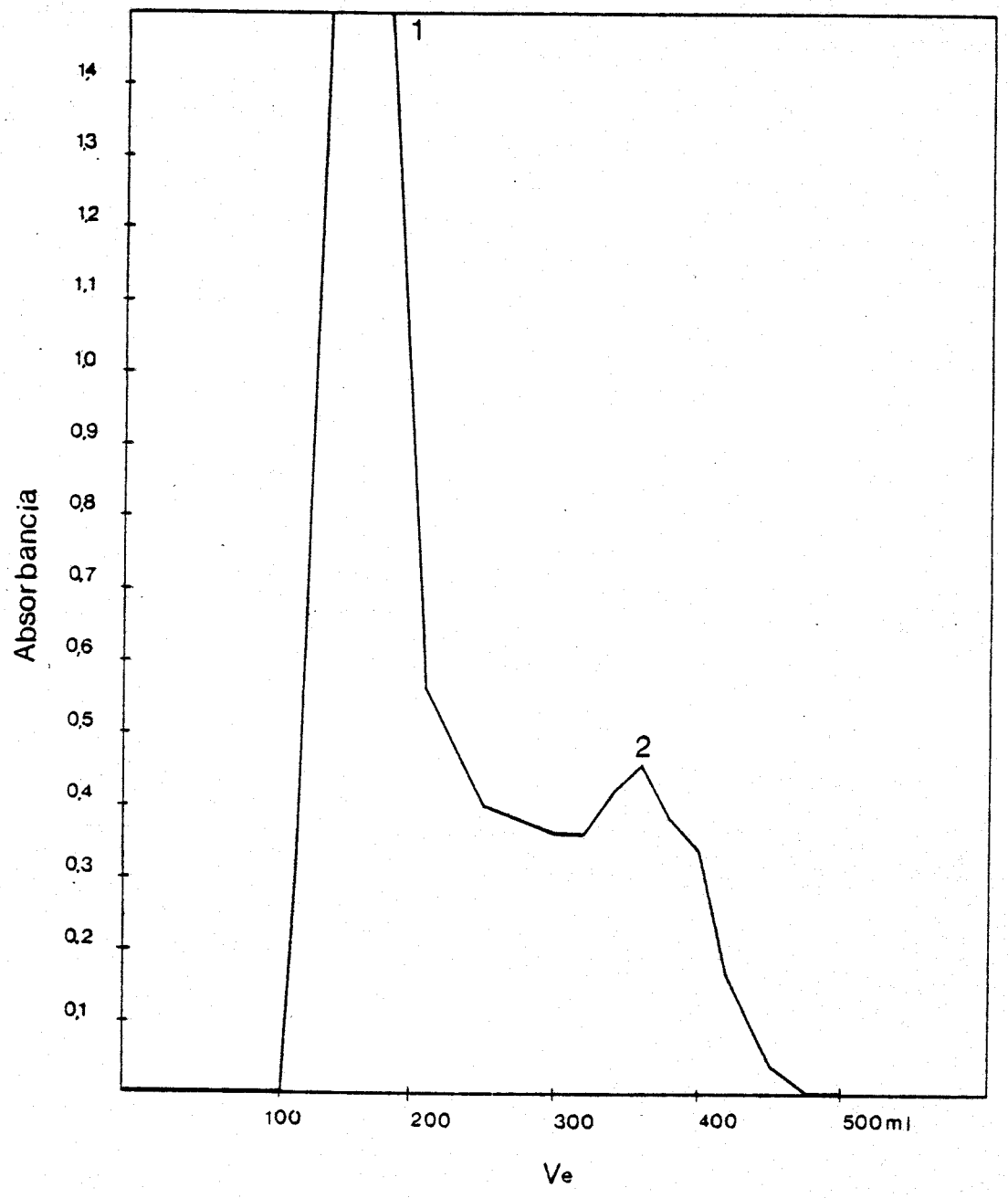


Fig. 12. Diagrama de elución de la fracción B-2, sobre Sephadex G-50.

Tabla X

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-75.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-17	0,000	32	0,215	48	0,110
18	0,180	33,34	0,210	49	0,100
20-22(*)	——	35	0,192	50,51	0,085
23	1,070	36	0,175	52	0,044
24	0,475	37	0,180	53	0,060
25	0,340	38-40	0,167	54	0,038
26	0,282	41	0,120	55	0,045
27	0,277	42	0,130	56	0,040
28	0,250	43,44	0,120	57	0,044
29	0,230	45	0,130	58	0,040
30	0,205	46	0,107	59	0,015
31	0,200	47	0,115	60-70	0,000

(*) El máximo valor de absorbancia corresponde a la fracción 20.

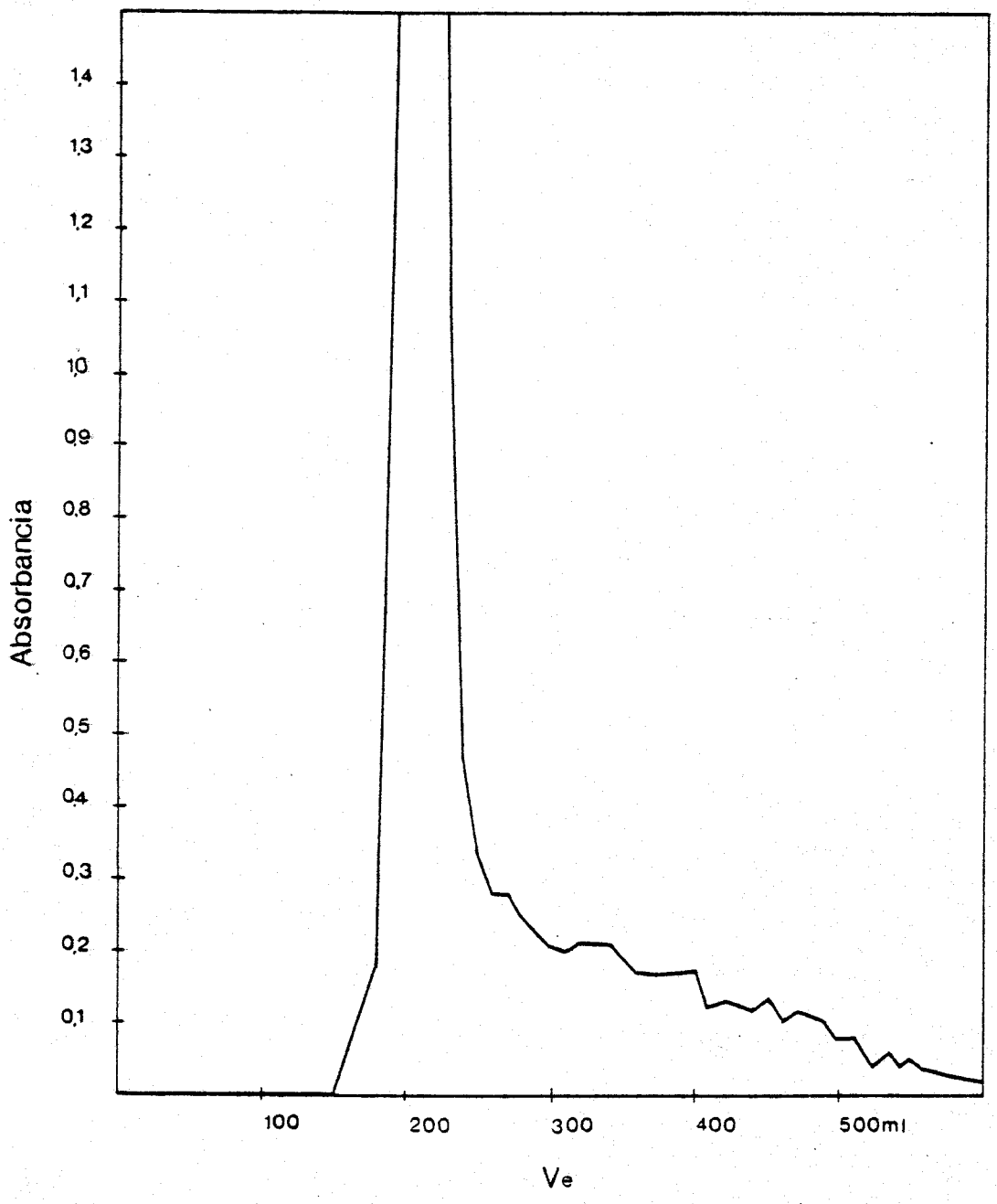


Fig. 13. Diagrama de elución de la fracción B-2, sobre Sephadex G-75.

V_o = 200 ml y V_i =210 ml.

Se cromatografía la muestra B-2 (41 mg), disuelta en agua (5 ml).

Los valores de absorbancia de las fracciones eluidas se incluyen en la tabla X y se representan en la figura 13. El diagrama de elución tiene un máximo principal al que corresponde un volumen de elución, V_e = 200 ml y un coeficiente de distribución, K_d = 0. Este máximo integra la mayor parte de la fracción analizada, y le corresponde un peso molecular superior a 50000.

3.4.6. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephacryl S-300.

Se usa la misma columna que con la fracción B-1. V_o = 170 ml y V_i = 2,30.

Se cromatografía la fracción B-2 (40 mg) disuelta en NaCl 0,5M (3 ml), eluyendo con el mismo disolvente (NaCl 0,5M).

Tabla XI

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-15	0,000	24	0,475	33	0,315
16	0,490	25	0,355	34	0,390
17	0,990	26	0,300	35	0,450
18	0,700	27	0,280	36	0,410
19	0,540	28	0,276	37	0,350
20	0,590	29	0,275	38	0,240
21	0,615	30	0,285	39	0,135
22	0,635	31	0,305	40,41	0,050
23	0,580	32	0,315	42-45	0,000

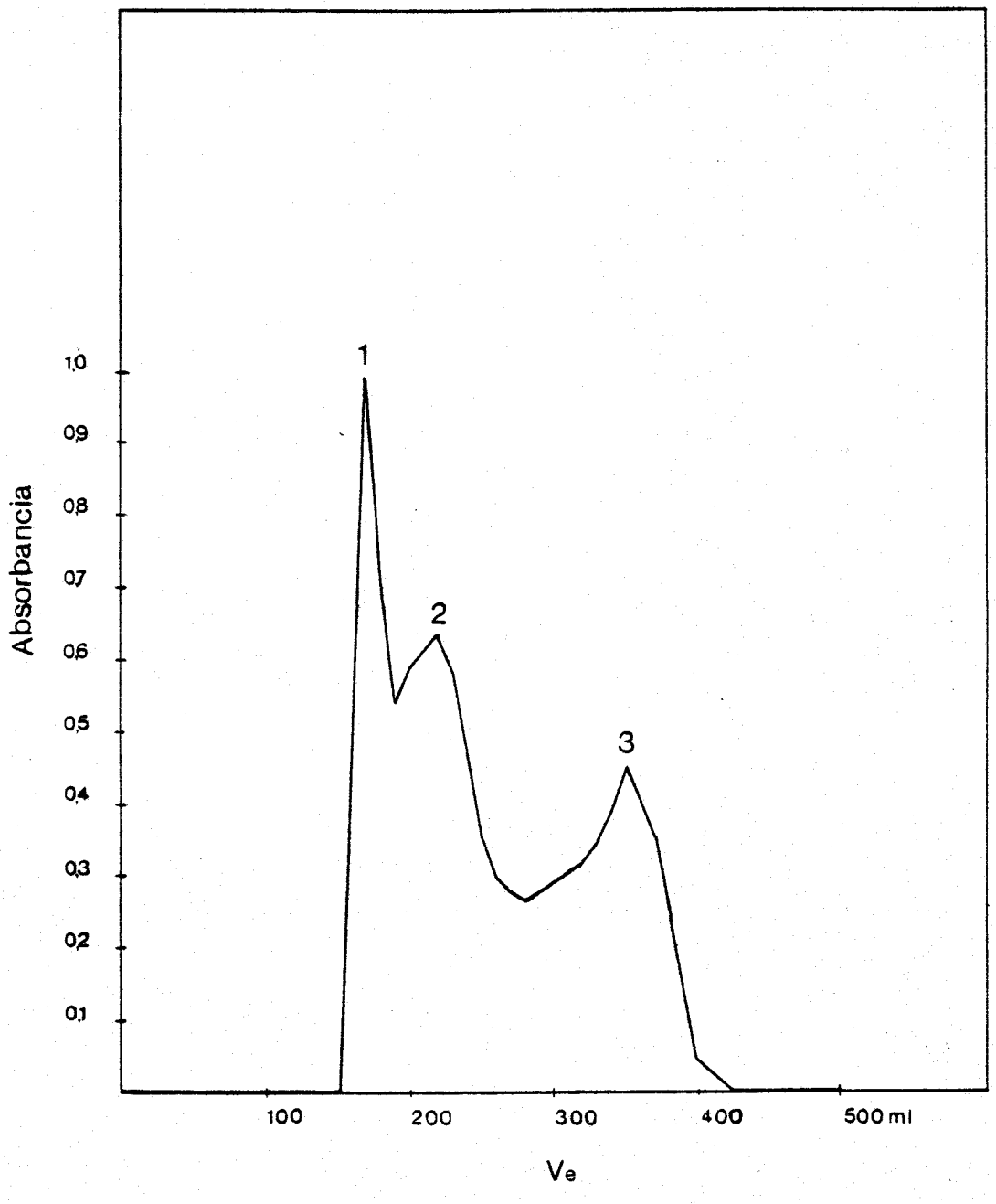


Fig. 14. Diagrama de elución de la fracción B-2, sobre Sephacryl S-300.

Los valores de las absorbancias de las fracciones eluidas se incluyen en la tabla XI y se representan en la figura 14. En el diagrama de elución hay tres máximos a los que corresponden los valores:

V_{e1} = 170 ml K_{d1} = 0

V_{e2} = 220 ml K_{d2} = 0,22

V_{e3} = 350 ml K_{d3} = 0,78

La cromatografía de filtración ha permitido separar tres fracciones, B-2a, B-2b y B-2c, que corresponden a los tres máximos, agrupando los tubos recogidos de la siguiente forma:

Fracción B-2a = tubos 15-18
Fracción B-2b = tubos 19-26
Fracción B-2c = tubos 30-40

Las tres fracciones se dializan y posteriormente se concentran, hidrolizan y cromatografían sobre papel, observándose que los polisacáridos que las integran están formados por los mismos monosacáridos.

3.4.7. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-50.

Tabla XII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-50.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	21	0,720	38	0,110
12	0,345	22	0,635	40	0,010
13	1,320	24	0,510	42	0,033
14-16(*)	——	26	0,385	43	0,190
17	1,800	28	0,365	44	0,034
19	0,950	32	0,362	45-50	0,000
20	0,765	36	0,360		

(*) El máximo valor de absorbancia corresponde a la fracción 16.

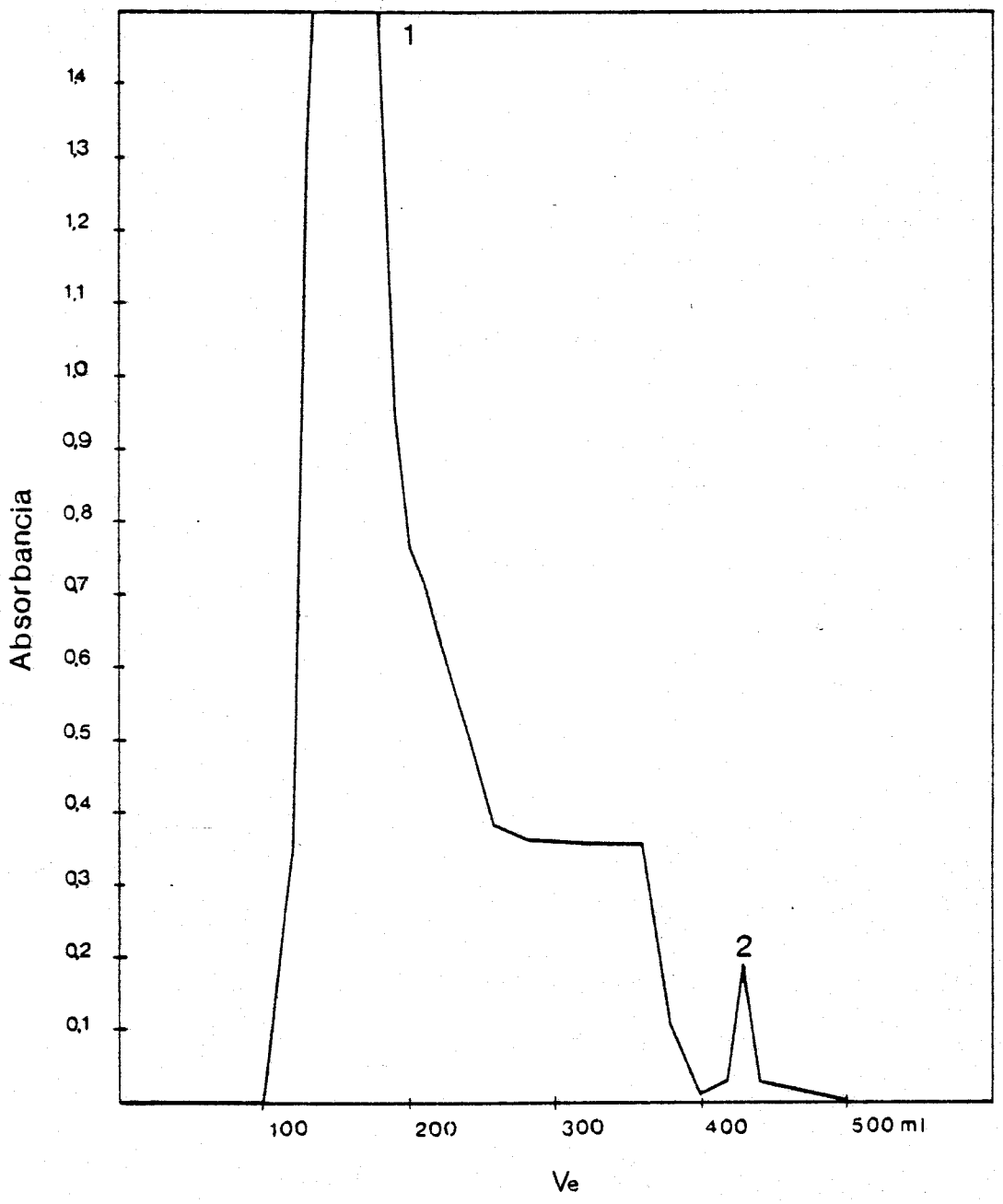


Fig. 15. Diagrama de elución de la fracción B-3, sobre Sephadex G-50.

Se utiliza la misma columna que en la cromatografía de las fracciones B-1 y B-2. V_o =160 ml y V_i = 270 ml.

Se cromatografía la fracción B-3 (84 mg), disuelta en agua (3 ml) y eluyendo con agua.

Los valores de las absorbancias se incluyen en la tabla XII y se representan en la figura 15. El diagrama de elución es análogo a los obtenidos con las fracciones B-1 y B-2. Los máximos observados en la curva de elución presentan los siguientes valores de V_e y K_d:

V_{e1}= 160 ml K_{d1}= 0

V_{e2}= 430 ml K_{d2}= 1

Se deduce que la mayor parte de la fracción B-3, queda fuera del límite superior del rango de fraccionamiento de este gel, por lo que su peso molecular será superior a 10000.

3.4.8. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-75.

Se usa una columna con una altura de lecho de --

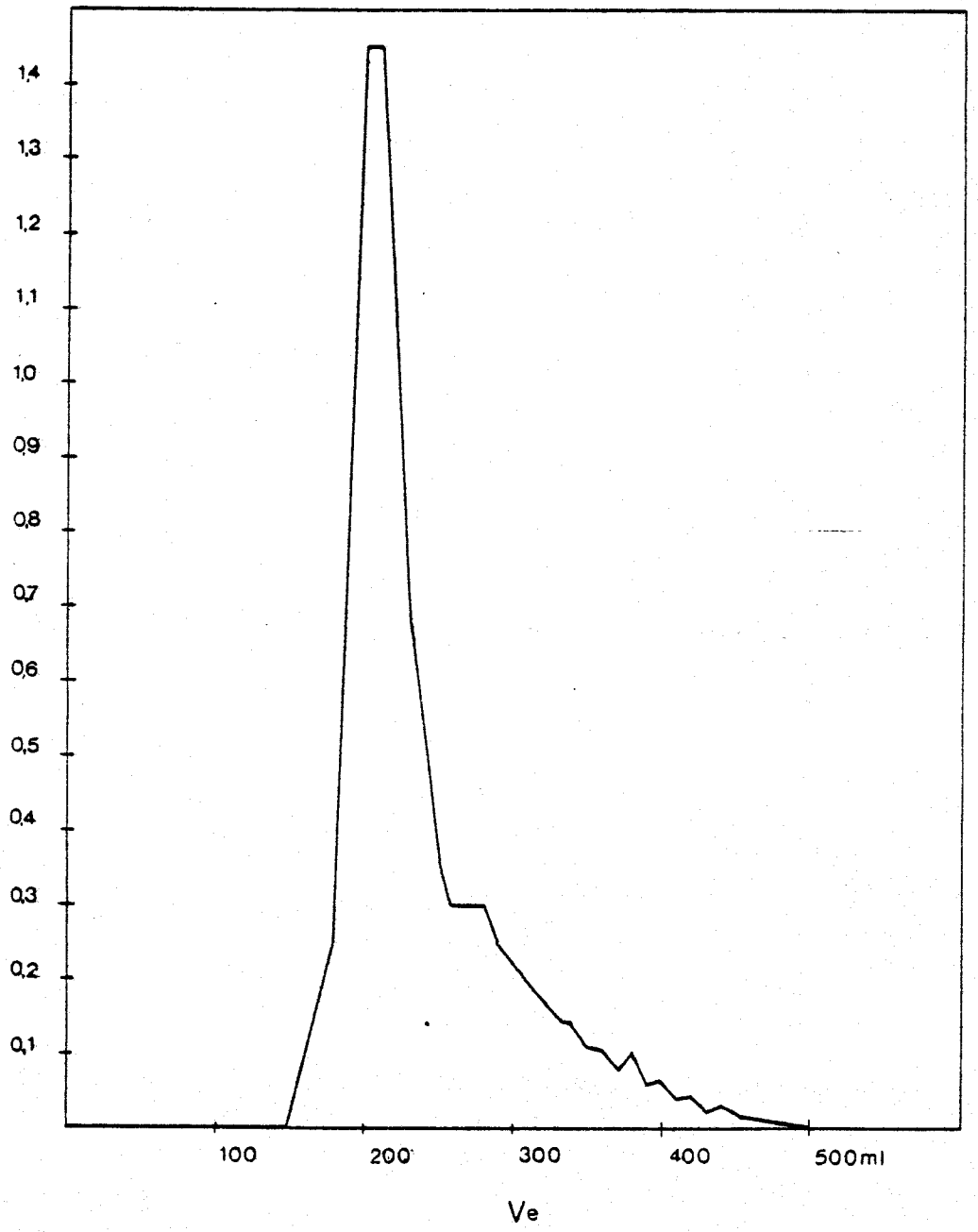


Fig. 16. Diagrama de elución de la fracción B-3, sobre Sephadex G-75.

Tabla XIII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-75.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-15	0,000	28	0,300	38	0,100
18	0,255	29	0,247	39	0,058
20	1,450	30	0,220	40	0,065
21	1,450	31	0,195	41	0,045
22	1,080	32	0,175	42	0,045
23	0,680	33	0,148	43	0,025
24	0,500	34	0,145	44	0,035
25	0,357	35	0,112	45	0,033
26	0,300	36	0,097	46	0,032
27	0,295	37	0,083	48-60	0,000

94 cm. V_o = 200 ml y V_i = 210 ml.

Se cromatografía la fracción B-3 (45 mg), disuelta en agua (5 ml), eluyendo con agua.

Los valores de absorbancia se incluyen en la tabla XIII y su representación gráfica frente a los volúmenes de elución se da en la figura 16. La curva de elución tiene un máximo al que le corresponde un volumen de elución, V_e = 200 ml y un coeficiente de distribución, K_d = 0.

Estos resultados demuestran que la fracción B-3 tiene un peso molecular mayor que 50000.

3.4.9. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephacryl S-300.

Se utiliza la misma columna que en la cromatografía de las fracciones B-1 y B-2. V_o = 170 ml y V_i = 230 ml.

Se cromatografía la fracción B-3 (37 mg) disuelta en NaCl 0,5M (5 ml) y se eluye con el mismo disolvente (NaCl 0,5M).

Tabla XIV

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-14	0,000	24	0,335	34	0,192
15	0,067	25	0,285	35	0,140
16	0,300	26	0,230	36	0,100
17	0,375	27	0,210	37	0,050
18	0,335	28	0,230	38	0,035
19	0,380	29	0,230	39	0,030
20	0,410	30	0,200	40	0,010
21	0,440	31	0,200	41	0,010
22	0,475	32	0,185	42-45	0,000
23	0,420	33	0,192		

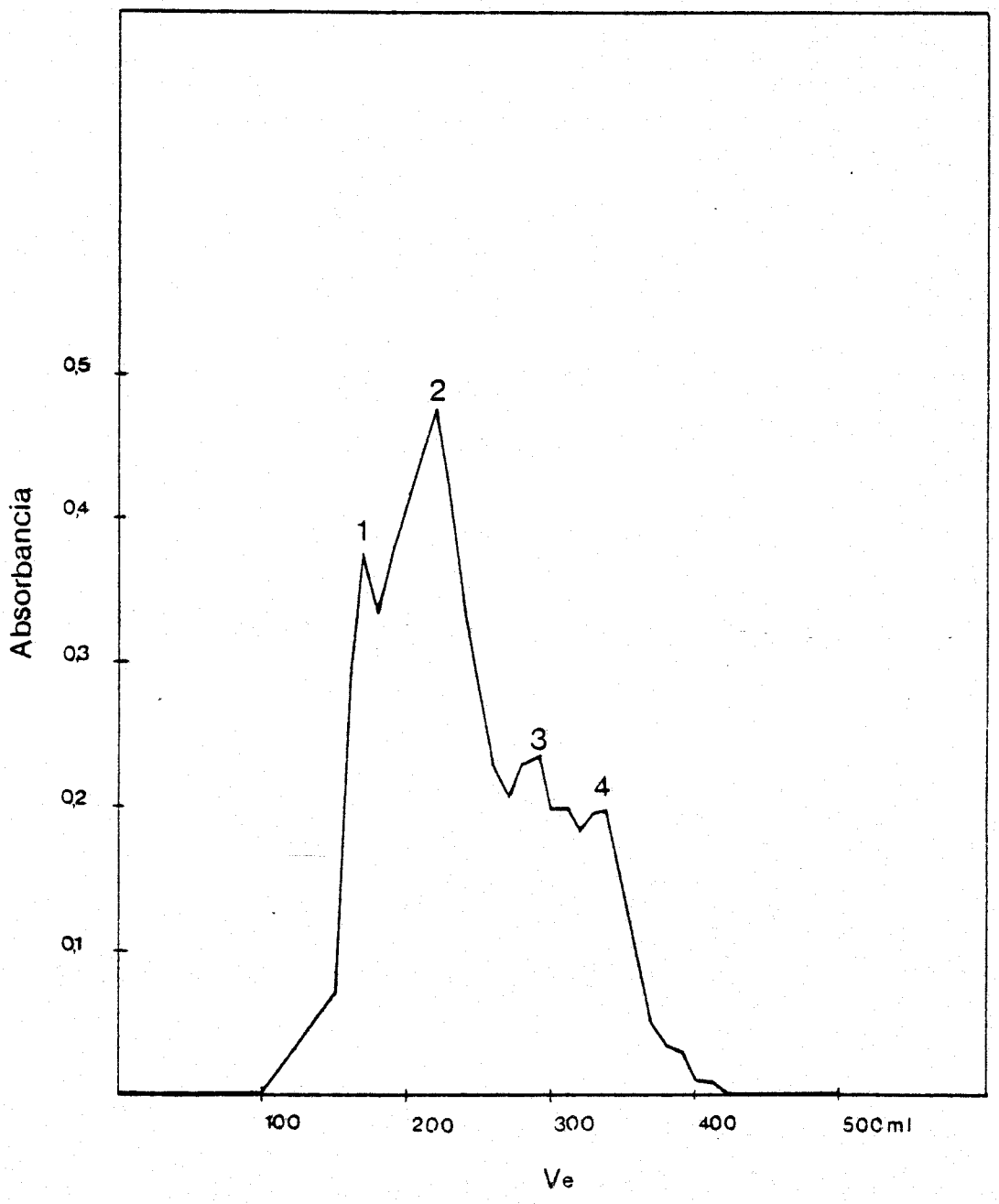


Fig. 17. Diagrama de elución de la fracción B-3, sobre Sephacryl S-300.

Los valores de las absorbancias de las fracciones recogidas se incluyen en la tabla XIV y se representan en la figura 17. La curva de elución presenta cuatro máximos, con los siguientes volúmenes de elución y coeficientes de distribución:

V_{e1}= 170 ml K_{d1}= 0

V_{e2}= 220 ml K_{d2}= 0,22

V_{e3}= 290 ml K_{d3}= 0,52

V_{e4}=340 ml K_{d4}= 0,74

A la vista de estos resultados, se observa que la fracción B-3 queda dentro del rango de fraccionamiento del Sephacryl S-300. Su peso molecular será inferior a 750000.

De los valores obtenidos en la cromatografía de las fracciones B-1, B-2 y B-3, sobre distintos tipos de geles, se deduce que poseen un peso molecular que queda comprendido entre 50000 y 750000.

3.5. Determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración sobre geles porosos de los polisacáridos solubles en agua.

Una de las principales aplicaciones de la cromatografía de filtración sobre geles porosos es la determinación de pesos moleculares de polímeros.

Estas determinaciomes se basan en los trabajos de Anderson y Stoddart (67), que encuentran la existencia de una relación lineal entre el volumen de elución y el logaritmo del peso molecular, para solutos similares, en una columna determinada, rellena de gel poroso con un rango de fraccionamiento apropiado.

La representación gráfica de los volúmenes de elución de sustancias de pesos moleculares conocidos, en función de los logaritmos de sus pesos moleculares, nos da la correspondiente curva de calibrado, que es lineal en el intervalo donde los pesos moleculares coinciden con el rango de fraccionamiento del gel. La sustancia problema se cromatografía en la misma columna y en las mismas condiciones que los patrones. El volumen de elución, llevado a la recta de calibrado, permite determinar el peso molecular.

Otras correlaciones muy usadas son las que existen entre el logaritmo del peso molecular y K_d ó V_e/V_o. Estas correlaciones tienen la ventaja de eliminar la necesidad de tener que usar siempre la misma columna.

Sin embargo, para que la determinación del peso molecular de un polímero sea correcta, las sustancias usadas en el calibrado deben tener estructuras similares al problema. En el caso concreto de los polisacáridos el calibrado se debe realizar con dextranas de pesos moleculares conocidos (68,69). Los valores de pesos moleculares determinados por la cromatografía de filtración sobre geles concuerdan con los valores determinados por métodos clásicos. Por ejemplo, Anderson y col. (68) obtienen en la cromatografía de polisacáridos de la goma de la *Acacia senegal* sobre Bio-Gel P-300, dos picos con un peso molecular medio de 99000 y 35000.--- Los correspondientes valores obtenidos por osmometría fueron de 105000 y 37000.

Churms y Stephen (70), al cromatografiar los polisacáridos de la goma de la *Acacia podalyriaefolia* sobre el mismo gel, obtienen un valor para el peso molecular medio de 31500, mientras que el valor obtenido por medidas de difusión y sedimentación fue de 33500.

Son numerosos los trabajos que existen sobre el

fraccionamiento de polisacáridos y la determinación de sus pesos moleculares.

Flodin y col. (71,72) demuestran la posibilidad de fraccionar dextranas por cromatografía de filtración sobre geles de Sephadex.

Laurent y Granath (73) fraccionan dextranas, con distintos pesos moleculares, en fracciones relativamente homogéneas que tienen pesos moleculares que van desde 15000 a 63000.

Hummel y Smith (74) investigan el fraccionamiento de dextranas en un rango de pesos moleculares de 30000 a 500000, sobre Sephadex y sobre geles de agar, agarosa y poliacrilamida.

Bremner y col. (75) fraccionan las dextranas de bajo peso molecular sobre geles de Sephadex G-50.

Anderson y col. (67) determinan el peso molecular de una arabinogalactana procedente de la goma de la *Acacia senegal*, calibrando una columna de Bio-Gel P-300 con dextranas de pesos moleculares conocidos. Este método se ha aplicado en el fraccionamiento y determinación de pesos moleculares de varias gomas de los géneros *Acacia* (76-82) y *Araucaria* (83).

Anderson y col. (85) utilizan la Sepharosa 4B - para el fraccionamiento de polisacáridos de la goma de *Acacia* de pesos moleculares altos.

De manera similar se ha estudiado el fracciona-- miento de las arabinogalactanas de madera de pino (86-88), utilizando el Bio-Gel P-300 y el Sephadex,demos--- trándose la existencia de dos fracciones con pesos moleculares medios de 75000 y 14000 respectivamente (87).

Hee-Keong Tong y colb. (91) determinan el peso molecular de los polisacáridos solubles en agua de la - *Euchema spinosum*.

Otros tipos de polisacáridos que se han estudiado son las dextrinas de almidón (89), las dextrinas procedentes de la hidrólisis del glucógeno (90) y las glucanas (69).

Las determinaciones de los pesos moleculares se han efectuado también en los productos de degradación - de los polisacáridos. (70,84,92).

3.5.1. Determinación de los pesos moleculares de los polisacáridos solubles en agua. Fracciones B-1, B-2 y B-3.

En la determinación de los pesos moleculares de los polisacáridos solubles en agua se han utilizado - columnas de Sephacryl S-300 y Sepharosa 2B.

Las características del Sephacryl S-300 se han - descrito en el apartado 3.4. La Sepharosa 2B es un gel que contiene un 2% de Agarosa, con un diámetro de par-- tícula de 60-200 micras y con un rango de fraccionamien to entre 10^5 y 20×10^6.

Las muestras de las fracciones B-1, B-2 y B-3 se han preparado al 0,4% en NaCl 0,5M, y se han tomado can tidades de 0,2 ml que se cromatografían en las columas.

La columna de Sephacryl S-300 tiene un lecho de 53 cm de altura con un diámetro interno de 1,2 cm. Se - eluye con NaCl 0,5M a una velocidad de flujo de 0,5 ml por minuto, que se controla mediante una bomba peristál tica, recogiéndose fracciones de 1,4 ml en un colector automático. Los volúmenes vacío e interno fueron: V_o = = 17 ml y V_i = 27,3 ml.

La columna de Sepharosa 2B es de la firma Phar- macia Fine Chemical, modelo K 16/70 con un diámetro in- terno de 1,6 cm y una altura de lecho de 21 cm. Se elu- ye con NaCl 0,5M, a una velocidad de flujo de 0,5 ml -- por minuto y se recogen fracciones de 1,8 ml.

En ambos casos, el curso de la columna fue seguido por el método del fenol-sulfúrico.

3.5.1.1. Calibrado de la columna de Sephacryl S-300.

En el calibrado de esta columna se han usado dextranos de pesos moleculares conocidos, denominados comercialmente Dextranos T, de la casa Pharmacia Fine Chemical. Las características de estos dextranos son:

Dextrano	Peso molecular
T-500	500000
T-70	70000
T-40	40000

Se preparan al 0,2% y se toman 0,2 ml para su elución.

Los valores de los volúmenes de elución y sus coeficientes de distribución se muestran en la siguiente tabla:

Referencia	V_e (ml)	K_d
Dextrano T-500	21,7	0,06
Dextrano T-70	26,7	0,25
Dextrano T-40	28,3	0,31

La recta de calibrado se construye representando K_d frente al logaritmo del peso molecular (figura 18), por ser la columna usada en la determinación de estos valores de altura diferente a la que se emplea en la determinación de los pesos moleculares de los polisacáridos B-1, B-2 y B-3.

3.5.1.2. Calibrado de la columna de Sepharosa 2B.

En el calibrado de esta columna se han usado el Dextrano azul 2000 y el Dextrano T-500, que son los únicos que entran dentro del rango de fraccionamiento de este gel. Los volúmenes de elución encontrados para ambas referencias, así como el del Dextrano T-70, que queda por debajo del rango de fraccionamiento, son los siguientes:

Referencia	V_e (ml)
Dextrano 2000	14,5
Dextrano T-500	32,4
Dextrano T-70	37,8

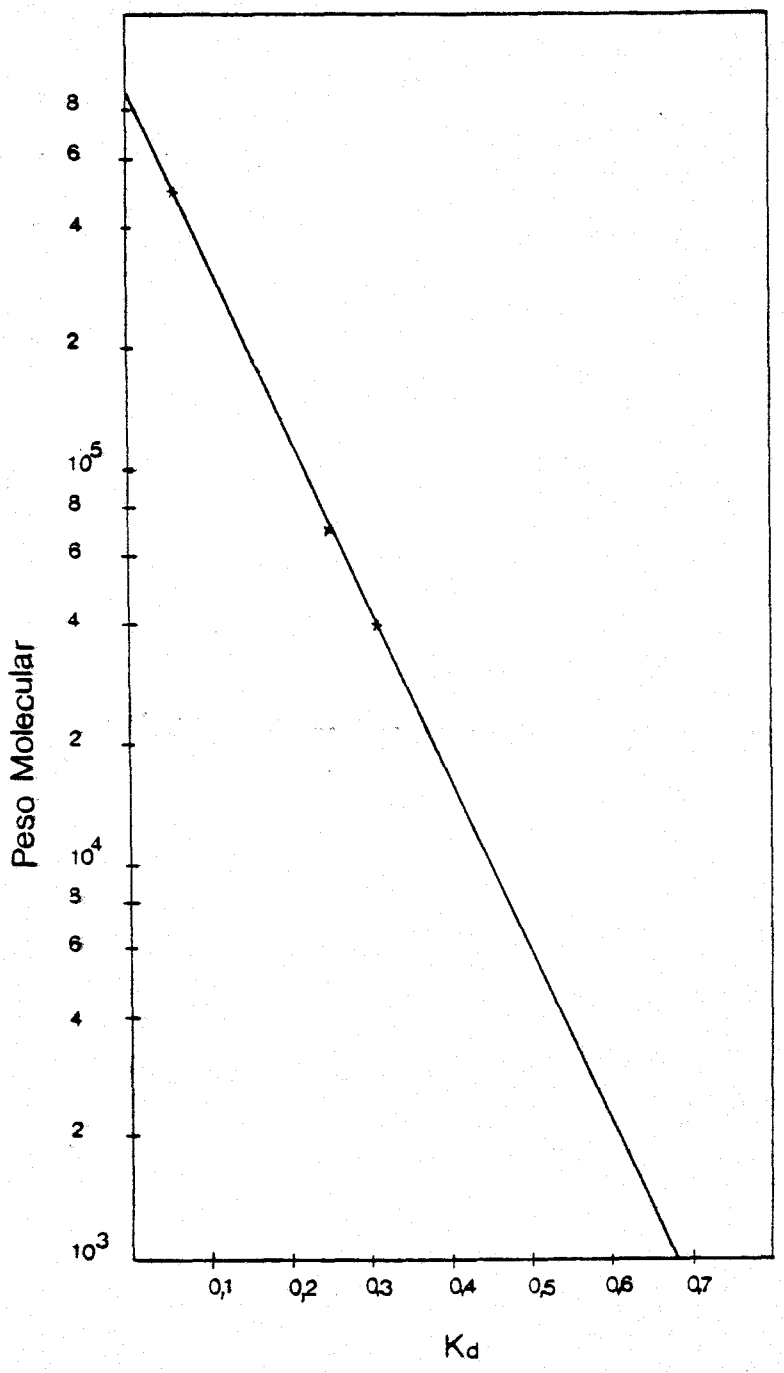


Fig. 18. Recta de calibrado para la determinación de pesos moleculares. Columna de Sephacryl S-300.

3.5.2. Peso molecular medio

El peso molecular medio de cada fracción se calcula en función del peso molecular de cada pico del diagrama de elución y del área que le corresponde (93).

$$\overline{Pm} = \frac{\Sigma(Pm_i A_i)}{\Sigma A_i}$$

3.5.2.1. Peso molecular medio de la fracción B-1.

En la tabla XV, se incluyen los valores de absorbancia medidos para cada fracción eluida de la columna de Sephacryl S-300. El diagrama de elución correspondiente, que se obtiene al representar estos valores frente al volumen de elución, se da en la figura 19.

Los valores de V_e y K_d, así como los pesos moleculares calculados para cada pico mediante la recta de calibrado de la figura 18, se recogen en la tabla XVI.

Tabla XV

Determinación del peso molecular de la fracción B-1. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	17	0,125	24	0.060
11	0,050	18	0,130	25	0.050
12	0,165	19	0,100	26	0,065
13	0,095	20	0,115	27	0,035
14	0,110	21	0,097	28	0,040
15	0,130	22	0,095	29	0,015
16	0,155	23	0,080	30-35	0,000

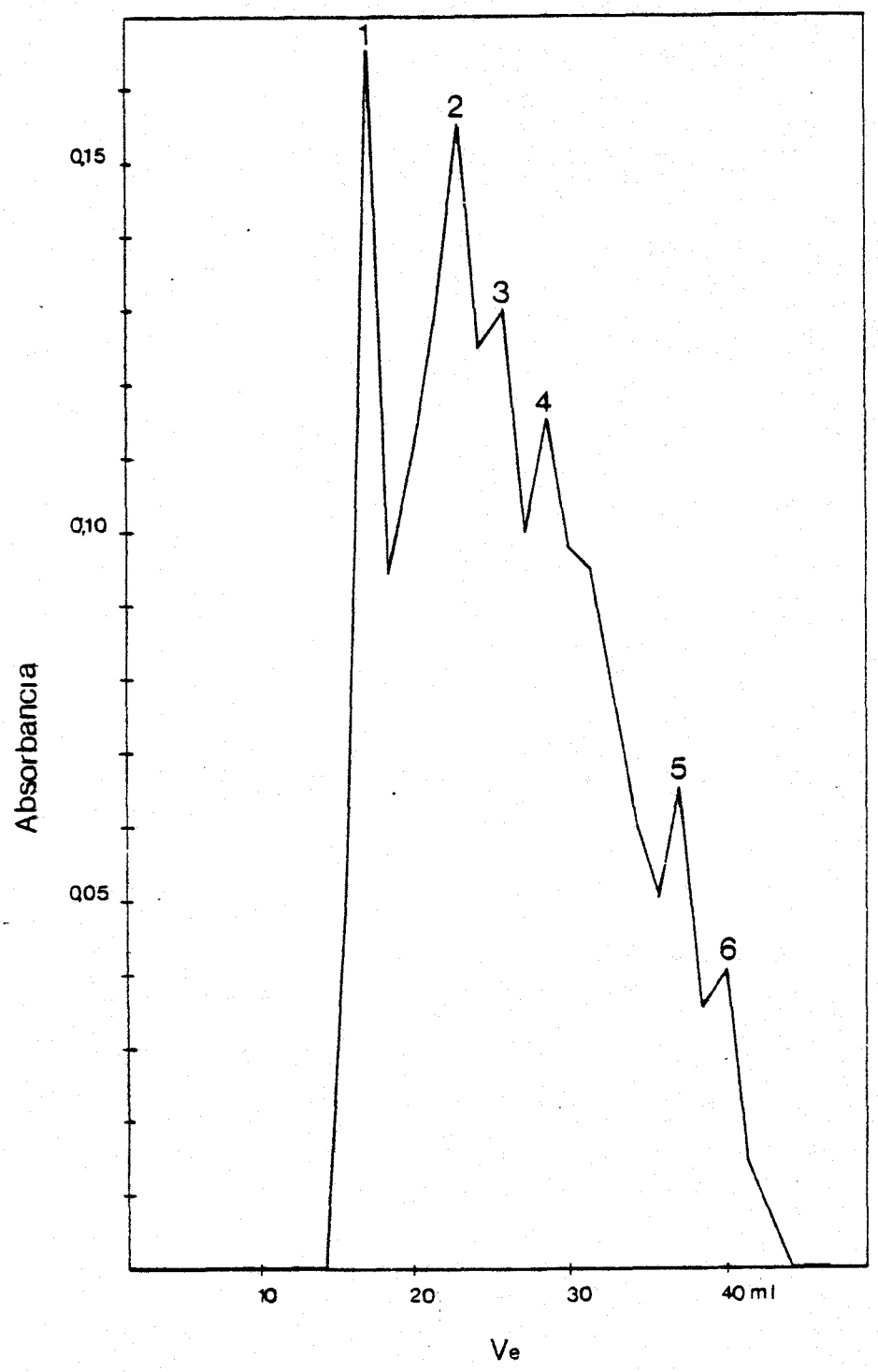


Fig. 19. Determinación del peso molecu-- lar de la fracción B-1. Diagrama de elución sobre Sephacryl S-300.

Tabla XVI

Determinación del peso molecular de la fracción B-1. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares, de los distintos - picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	17	0,00	≥750000
2	23	0,22	95000
3	26	0,33	32000
4	28,6	0,42	15000
5	37	0,73	<1000
6	40	0,84	<1000

El pico 1 queda fuera del rango de fraccionamiento del Sephacryl S-300, y por tanto, no se puede -- calcular su peso molecular. Para determinarlo se usa - la columna de Sepharosa 2B.

Los resultados obtenidos al cromatografiar esta muestra sobre la columna de Sepharosa 2B, se dan en la tabla XVII y en la figura 20.

En esta gráfica, no existe ningún pico definido de peso molecular igual o superior a 750000. Por el con

Tabla XVII

Determinación del peso molecular de la fracción B-1. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sepharosa 2B.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-6	0,000	14	0,046	21	0,575
7	0,011	15	0,079	22	0,533
8	0,031	16	0,114	23	0,381
10	0,013	17	0,152	24	0,242
11	0,009	18	0,237	25	0,125
12	0,018	19	0,373	26	0,050
13	0,027	20	0,513	27-30	0,000

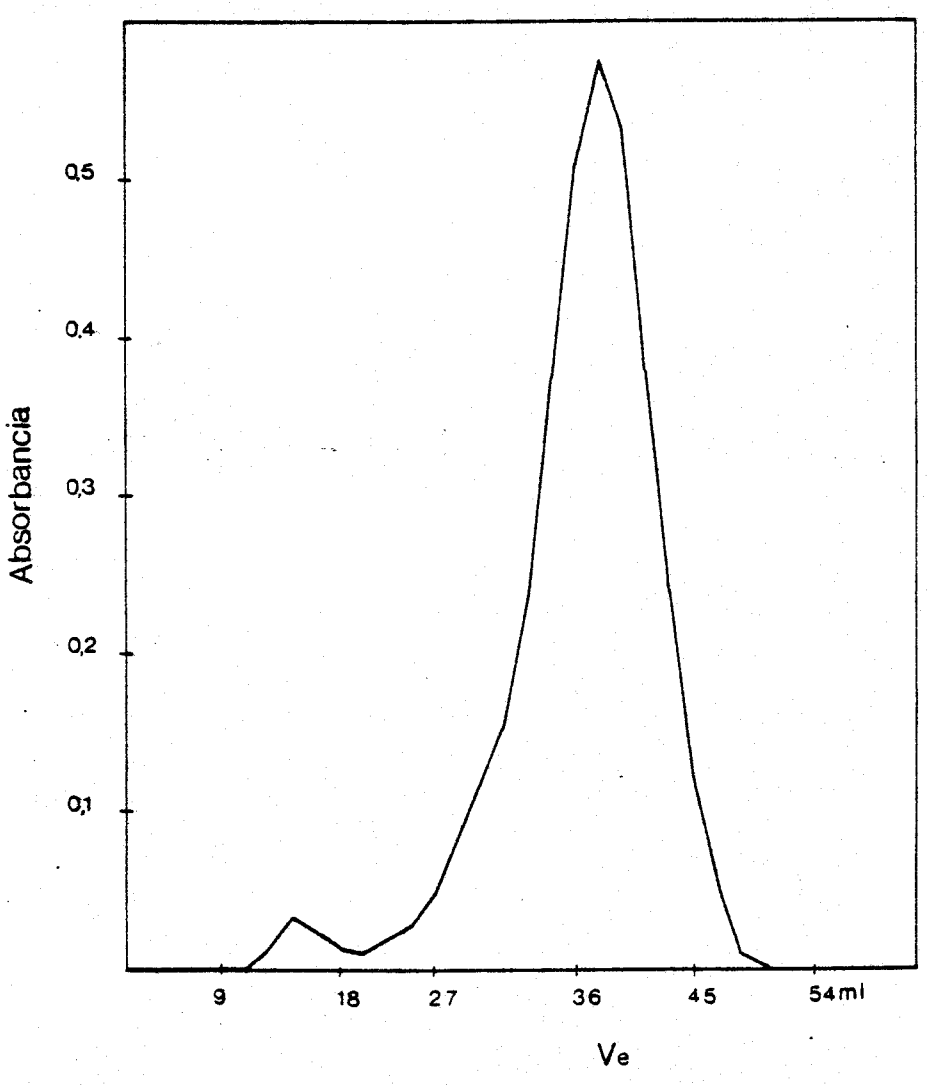


Fig. 20. Determinación del peso molecular de la fracción B-1.Diagrama de elución sobre Sepharosa 2B.

trario, el pico que corresponde a la casi totalidad de la muestra aparece con un máximo a un volumen de elución de 37,8 ml, el mismo que el del Dextrano T-70, que corresponde a un polisacárido con un peso molecular inferior a 100000.

A la vista de estos resultados se determina el peso molecular medio, usando los valores de los pesos moleculares de los picos obtenidos en el diagrama de elución de la columna de Sephacryl S-300, sin tener en cuenta el pico señalado con el número 1. Se calcula el área encerrada bajo cada pico y se aplica la fórmula dada en el apartado 3.5.2.

El peso molecular medio de la fracción B-1 es de 44000.

3.5.2.2. Peso molecular medio de la fracción B-2.

Los resultados obtenidos en la cromatografía de esta muestra sobre Sephacryl S-300 se incluyen en la tabla XVIII y se representan en la figura 21.

Los valores de V_e, K_d y los pesos moleculares, calculados según la recta de calibrado de la figura 18, se incluyen en la tabla XIX.

Tabla XVIII

Determinación del peso molecular de la fracción B-2. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	17	0,120	24	0,060
11	0,050	18	0,100	25	0,070
12	0,275	19	0,093	26	0,087
13	0,160	20	0,055	27	0,100
14	0,130	21	0,080	28	0,075
15	0,135	22	0,053	29	0,030
16	0,140	23	0,117	30-32	0,000

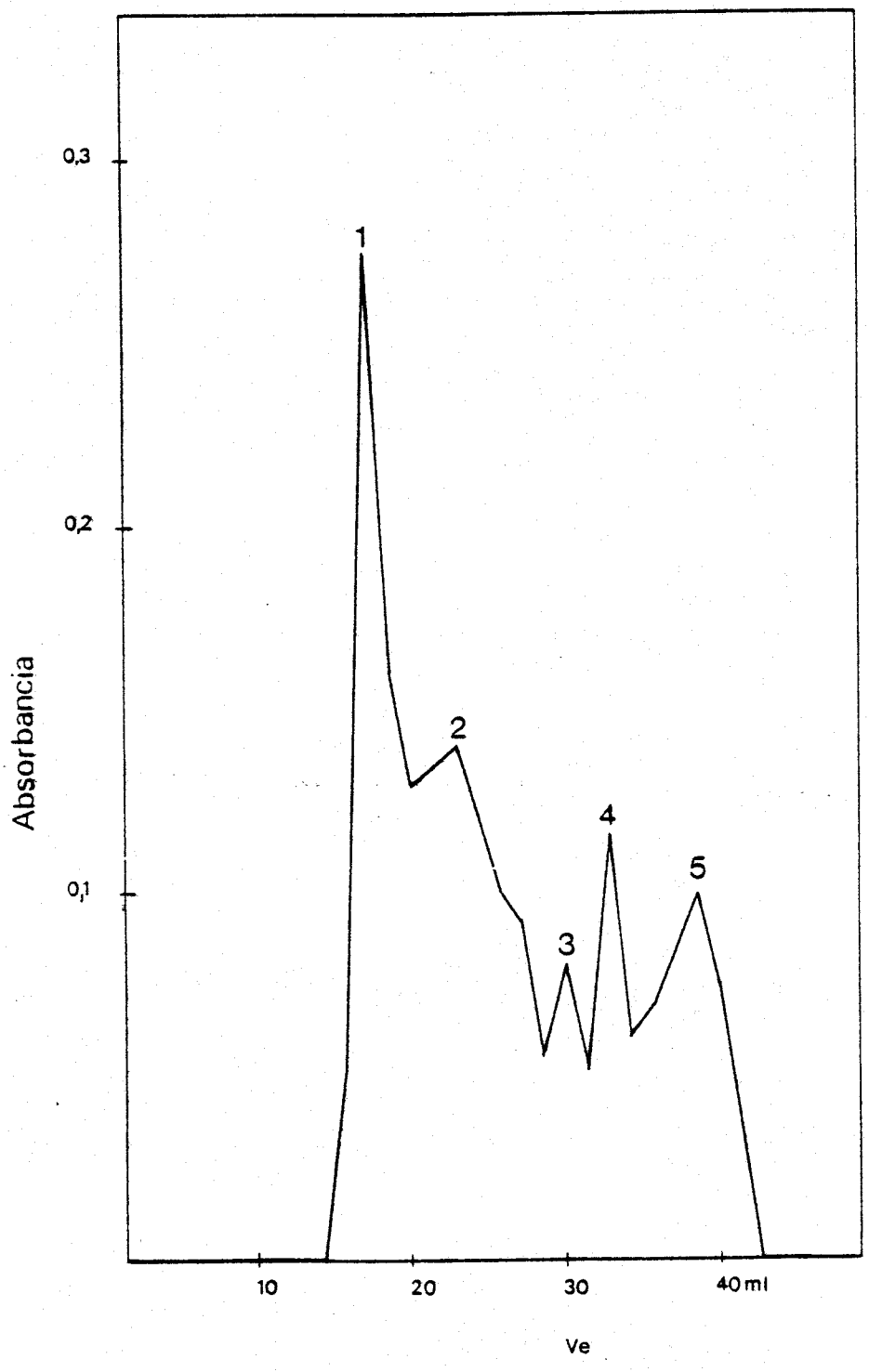


Fig. 21. Determinación del peso molecular de la fración B-2.Diagrama de elución sobre Sephacryl S-300.

Tabla XIX

Determinación del peso molecular de la fracción B-2. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares, de los distintos - picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	17	0,00	⩾750000
2	23	0,22	95000
3	30	0,48	7500
4	33	0,59	2500
5	38,6	0,79	<1000

Los valores de absorbancia de las fracciones -- eluidas en la columna de Sepharosa 2B se incluyen en - la tabla XX y su representación gráfica se da en la figura 22.

Los resultados de estas cromatografías son análogos a los obtenidos con la fracción B-1. El peso molecular medio de la fracción B-2, calculado de la forma - indicada anteriormente, es de 46000.

Tabla XX

Determinación del peso molecular de la fracción B-2. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sepharosa 2B.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-6	0,000	14	0,111	22	0,838
7	0,010	15	0,199	23	0,561
8	0,026	16	0,314	24	0,316
9	0,012	17	0,420	25	0,177
10	0,024	18	0,550	26	0,100
11	0,028	19	0,669	27	0,050
12	0,037	20	0,819	28-30	0,000
13	0,087	21	0,925		

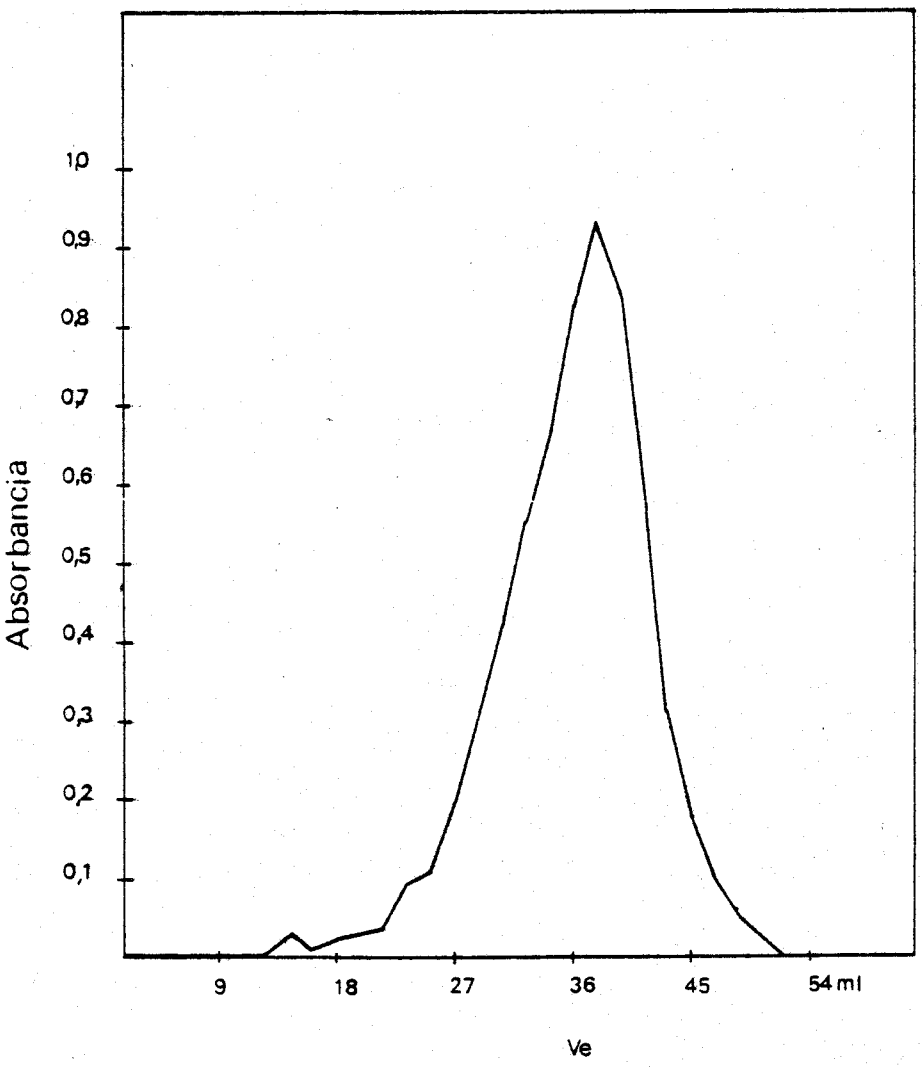


Fig. 22. Determinación del peso molecular de la fracción B-2. Diagrama de elución sobre Sepharosa 2B.

3.5.2.3. Peso molecular medio de la fracción B-3.

Los valores de las absorbancias medidos para las fracciones eluidas , en la cromatografía de la muestra B-3 sobre Sephacryl S-300, se incluyen en la tabla XXI y se representan en la figura 23.

Los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares, calculados según la recta de calibrado de la figura 18, se detallan en la tabla XXII.

Los valores de las absorbancias,medidos para las fracciones eluidas en la cromatografía de la muestra B-3 sobre Sepharosa 2B, se incluyen en la tabla XXIII y su representación gráfica se da en la figura 24.

Los resultados de estas cromatografías son análogos a los encontrados con las fracciones B-1 y B-2 que se describen en los apartados anteriores.

El peso molecular medio de la fracción B-3 es de 47500.

Tabla XXI

Determinación del peso molecular de la fracción B-3. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-11	0,000	18	0,060	25	0,015
12	0,025	19	0,025	26	0,030
13	0,020	20	0,032	27	0,015
14	0,050	21	0,030	28	0,030
15	0,030	22	0,030	29	0,010
16	0,042	23	0,035	30	0,020
17	0,050	24	0,025	31,32	0,000

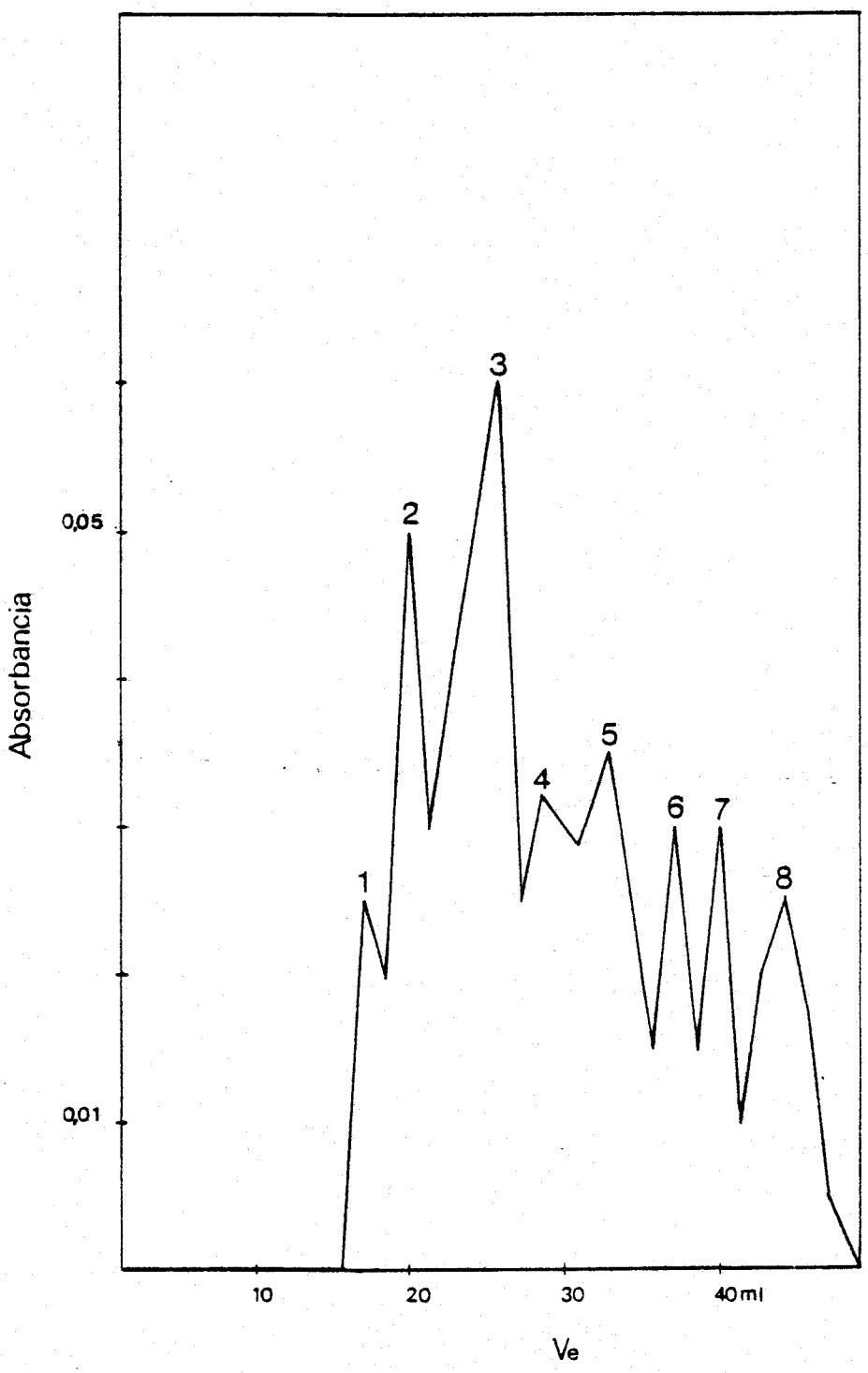


Fig. 23. Determinación del peso molecular de la fracción B-3. Diagrama de elución sobre Sephacryl S-300.

Tabla XXII

Determinación del peso molecular de la fracción B-3. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares, de los distintos picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	17	0,00	≥750000
2	20	0,11	280000
3	26	0,32	32000
4	28,6	0,42	15000
5	33	0,59	2500
6	37	0,73	<1000
7	40	0,84	<1000
8	44,3	1,00	<1000

Tabla XXIII

Determinación del peso molecular de la fracción B-3. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sepharosa 2B.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-11	0,000	16	0,158	21	0,515
12	0,008	17	0,286	22	0,413
13	0,027	18	0,386	23	0,149
14	0,027	19	0,501	24	0,025
15	0,111	20	0,588	25-30	0,000

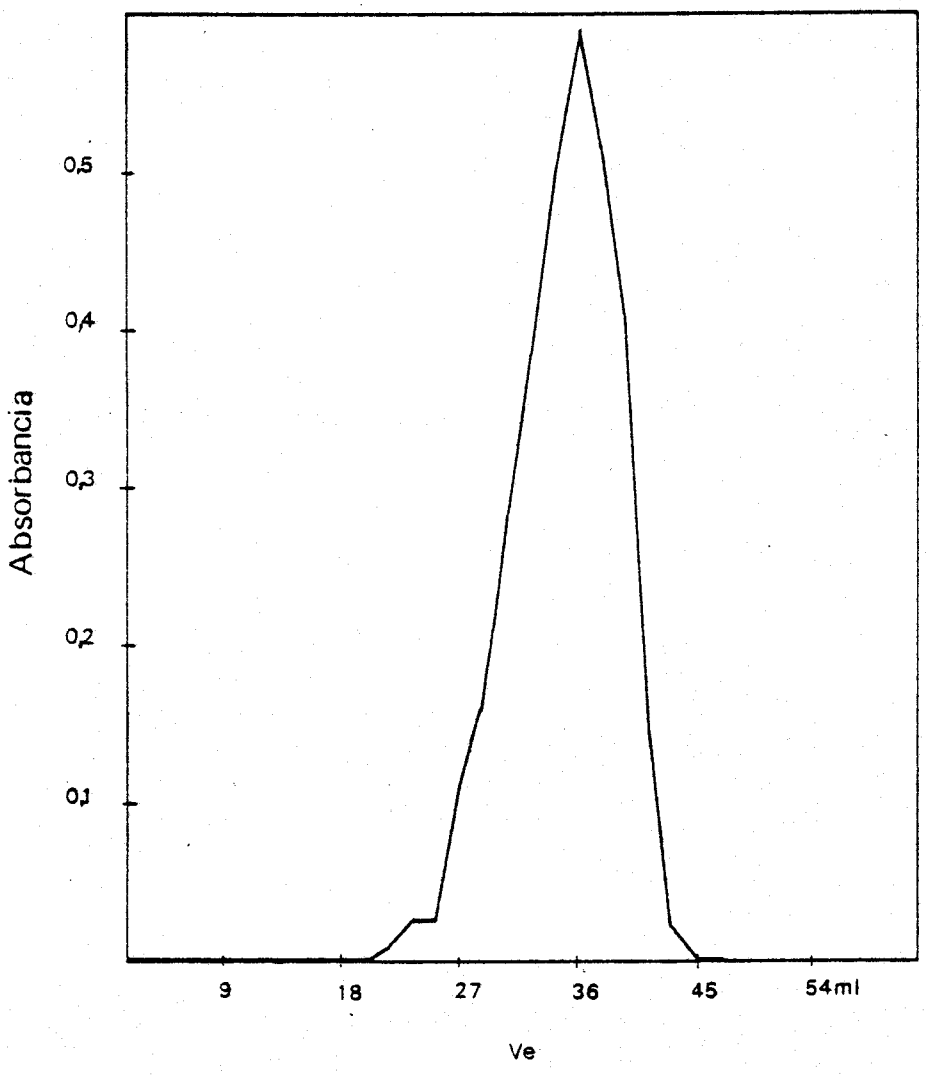


Fig 24. Determinación del peso molecular de la fracción B-3. Diagrama de elución sobre Sepharosa 2B.

4. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "MANZANILLA". POLISACARIDOS SOLUBLES EN ALCALI

Se procede a extracciones sucesivas de los polisacáridos con soluciones alcalinas de concentraciones crecientes.

Un primer tratamiento con una solución de NaOH o KOH 0,1N, además de extraer algunos polisacáridos, tiene el efecto de hinchar las fibras y facilitar la penetración en los tejidos de soluciones más concentradas. El tratamiento posterior con NaOH al 10% permite la extracción de los polisacáridos, llamados por muchos autores hemicelulosas A y B. Al acidificar el extracto con ácido acético, precipitan las hemicelulosas A, quedando en solución las hemicelulosas B, que se aislan por precipitación con etanol cuando se alcanza una concentración del 80%.

En este apartado estudiamos el aislamiento y purificación de los polisacáridos solubles en álcali, que existen en la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", después de haberse extraído con etanol al 80%, con disolventes orgánicos y con agua.

Se han seguido métodos de aislamiento que difieren en el tratamiento preliminar, que tiene por objeto facilitar la extracción total de los polisacáridos y la purificación de los mismos.

4.1. Aislamiento de polisacáridos solubles en KOH al 0,5%. Fracción A-2.

El material (75 g), procedente de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad"manzanilla" (muestra A), tratado con etanol al 80% y con hexano (apartado 3.1.1), se extrae con agua (1 l) a temperatura ambiente durante 48 horas. Se filtra y el sólido que queda se extrae con KOH al 0,5% (1,5 l) durante 4 horas. El sólido se separa por filtración y el extracto se concentra y precipita con cuatro volúmenes de etanol del 96%. El material polisacarídico obtenido, que denominamos fracción A-2, es un sólido pulvurulento de color marrón claro que estudiamos en el apartado siguiente.

4 1.1. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos. Fracción A-2.

La fracción A-2 (aproximadamente 10 mg) se hidro

liza con H_2SO_4 1N calentando a ebullición durante 5 horas.El hidrolizado se neutraliza con carbonato de bario, se concentra y los monosacáridos se identifican por cromatografía sobre papel. Se utiliza la técnica descendente, papel Whatman n°3, n-butanol-acetona-agua (2:7:1) como eluyente y $AgNO_3$ como revelador.

Se identifican arabinosa (R_G1,49) y galactosa (R_G 0,89). No se detectan ácidos urónicos.

La determinación global de los azúcares presentes en el hidrolizado se realiza por el método fotocolorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, descrito en el apartado 3.4.

La recta de calibrado se construye tomando como patrón la arabinosa, que es el azúcar más abundante en el hidrolizado. En la tabla XXIV se incluyen las concentraciones de las diez disoluciones de referencia y sus absorbancias correspondientes. Con estos valores se construye la recta de calibrado de la figura 25.

Los polisacáridos extraídos con KOH al 0,5% (51 mg), se hidrolizan con H_2SO_4 1N y el hidrolizado neutro se diluye exactamente a 250 ml. De esta solución, se toman 1, 2 y 5 ml y se vuelven a diluir a 10 ml. De cada una de

Tabla XXIV

Concentraciones y absorbancias de las disoluciones de referencia de arabinosa.

Disolución de referencia.	Concentración de arabinosa (µg/ml).	Absorbancia
1	4,5	0,035
2	9,0	0,075
3	13,5	0,104
4	18,0	0,130
5	22,5	0,167
6	27,0	0,200
7	31,5	0,220
8	36,0	0,263
9	40,5	0,290
10	45,0	0,324

estas disoluciones, que denominaremos muestras A-2-1, -- A-2-2 y A-2-3, se toma 1 ml y se le aplica el procedimiento del fenol-ácido sulfúrico, midiendo las absorbancias frente al blanco a 490 nm.

Las absorbancias, la concentración y los tantos - por ciento de arabinosa en cada una de las muestras analizadas se indican a continuación.

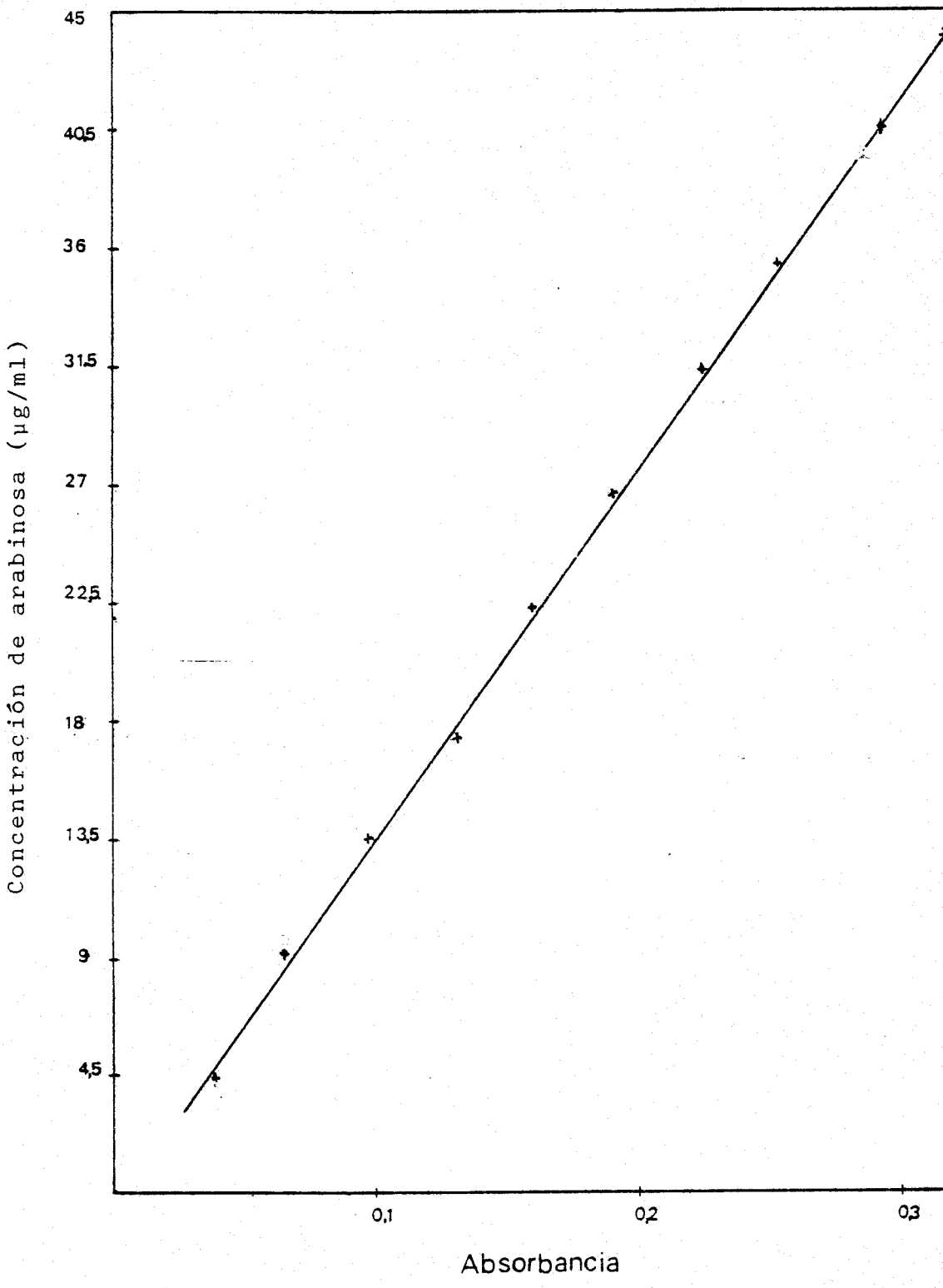


Fig. 25. Recta de calibrado para la determinación de azúcares totales (expresados en arabinosa) por el método del fenol-ác. sulfúrico.

Muestra	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Arabinosa(%)
A-2-1	0,068	9,0	45,0
A-2-2	0,143	19,5	48,8
A-2-3	0,318	44,0	44,0

El total de azúcares expresado en arabinosa es - del 45,6%.

4.2. Aislamiento de la hemicelulosa B. Fracción A-3.

Se ha seguido el procedimiento descrito por Whistler y Feather (22).

La pulpa procedente de la muestra A, que previamente había sido extraída con agua y KOH al 0,5%(apartado 4.1), se extrae con una solución de NaOH al 10% (500 ml), libre de carbonatos, por la que se ha hecho pasar - nitrógeno durante 2 horas. La extracción se realiza con agitación durante 24 horas, a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. Pasado este tiempo, se separa el resto sólido por filtración sobre una placa de vidrio fritado y el filtrado se acidifica con ácido acético al 50%. Teóricamente debe precipitar la hemicelulosa A, pero en nuestro caso no se obtiene precipitado alguno. A esta so

lución se le añaden cuatro volúmenes de etanol del 96%; precipita un sólido, fácil de filtrar y que una vez seco presenta un aspecto pulvurulento de color marrón claro. Pesa 7,82 g, lo que supone un 10,4% respecto a la pulpa tratada. A esta fracción, la denominamos A-3 por proceder de la muestra A y ser la tercera fracción aislada.

4.2.1. Identificación de monosacáridos.

Unos miligramos de la hemicelulosa B (fracción A--3), se hidrolizan con H_2SO_4 1N a ebullición durante 5 h. El hidrolizado se neutraliza con $BaCO_3$ y se cromatografía sobre papel Whatman n°3, utilizando n-butanol-acetona---agua (2:7:1) como desarrollador y como reveladores ni--trato de plata y difenilamina-urea.

Se identifican la xilosa (R_G 1,59), arabinosa (R_G 1,36), glucosa (R_G 1,00), galactosa (R_G 0,83) y como probable la ramnosa (R_G 2,20). Los más abundantes son la arabinosa y la xilosa.

En una serie de cromatogramas, desarrollados con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) y revelados con verde de bromocresol, no se observan manchas que puedan identificarse con ácidos urónicos o aldobiurónicos.

4.2.2. Purificación de la hemicelulosa B. Precipitación fraccionada con etanol. Fracciones A-3-1 y A-3-2.

Ordinariamente, la hemicelulosa B es una mezcla heterogénea de polisacáridos, que se pueden fraccionar por la adición gradual de etanol a su disolución acuosa. Previamente se somete a una purificación por diálisis, que permite eliminar las sales inorgánicas y las moléculas de bajo peso molecular.

La hemicelulosa B (fracción A-3) (2 g) se suspende en agua(100 ml) y se dializa en un tubo de celulosa tipo "Visking tube", de 38 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 15-20 Å, durante 5 días con un flujo continuo de agua. Después de dializar, queda un sobrenadante que se elimina por centrifugación.

La disolución de hemicelulosa B se somete a precipitación fraccionada con etanol, siguiendo el procedimiento de Whistler y Sannella (23).

Se adiciona etanol gota a gota y agitando, hasta que aparece una turbidez incipiente. Esto ocurre cuando se ha alcanzado una concentración etanólica del 55%. Se deja reposar a 4°durante toda la noche, se filtra y se aisla la fracción A-3-1. Al filtrado se le sigue aña---

diendo más etanol gota a gota y se separa otra fracción cuando la concentración de etanol alcanza el 79%. Esta - fracción la denominamos A-3-2. A la disolución que queda después de separar este último precipitado, se le sigue añadiendo etanol,pero no vuelve a precipitar.

4.2.2.1. Determinación cualitativa y cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción A-3-1.

La fracción de hemicelulosa B (A-3-1) (10,5 mg), - aislada como se ha descrito en el apartado anterior, se hidroliza con H_2SO_4 1N. Después de neutralizar con $BaCO_3$, se le añade 1 ml de una disolución acuosa de inositol -- que contiene 2,17 mg/ml y se sigue el procedimiento ya - descrito en la preparación de los acetatos de alditoles.

La instrumentación, columna ycondiciones cromatográficas son las descritas en el apartado 3.1.4.3 salvo la temperatura de la columna que es de 180°.

Uno de los cromatogramas obtenidos se representa en la figura 26.

El análisis cuantitativo da los resultados que se muestran en la tabla XXV.

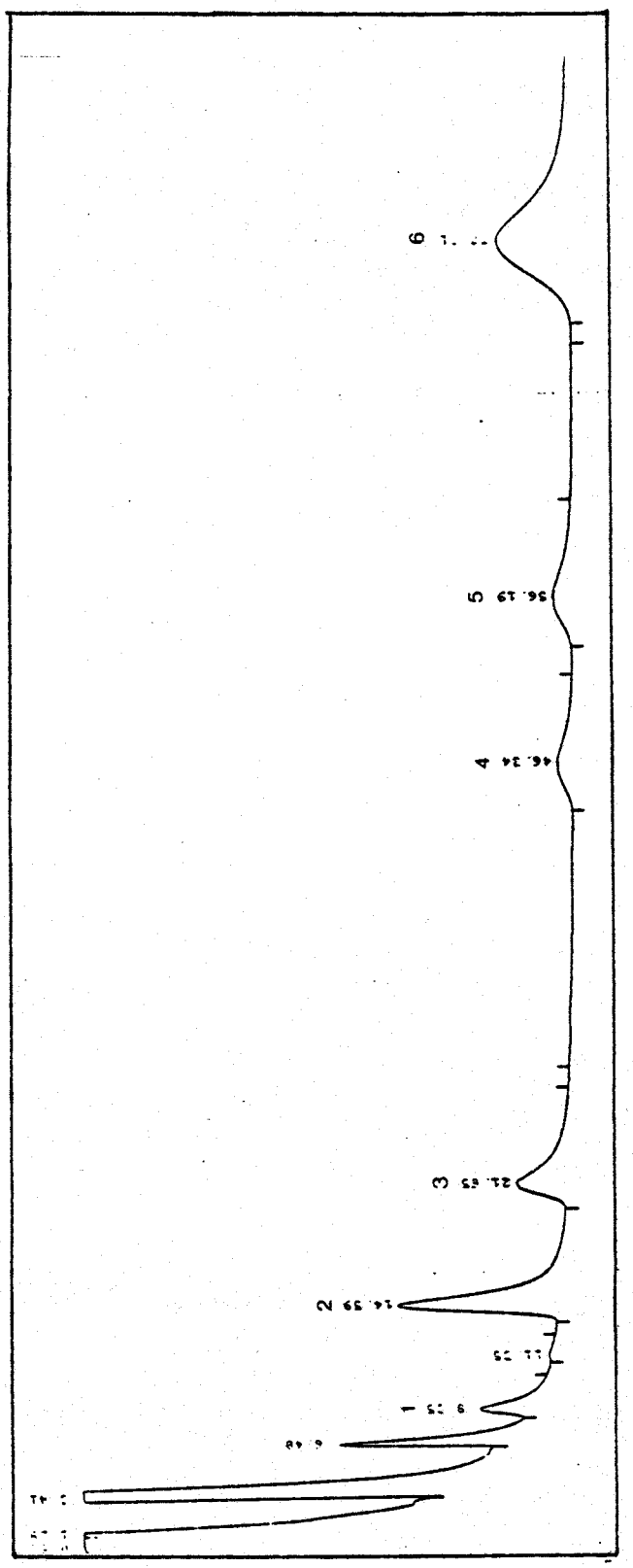


Fig. 26. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción A-3-1. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna:2mx3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura de la columna 180°.

Tabla XXV

Análisis cuantitativo de la fracción A-3-1.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,38	3,62	8,88
Arabinosa	1,91	18,19	44,63
Xilosa	0,93	8,86	21,73
Galactosa	0,43	4,09	10,05
Glucosa	0,63	6,00	14,72
Total	4,28	40,76	100,01

4.2.2.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción A-3--2.

La hemicelulosa B (fracción A-3-2) (13,3 mg) se hidroliza con ácido sulfúrico 1N calentando a ebullición durante 5 horas. Al hidrolizado neutralizado con carbonato de bario, se le añade inositol (2,17 mg) y se analiza cualitativa y cuantitativamente en las condiciones indicadas en el apartado anterior.

En la figura 27 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos.

Los resultados cuantitativos se recogen en la tabla XXVI.

Los análisis de las fracciones obtenidas en la -- precipitación con etanol, demuestran que son análogas, y de composición similar a las hemicelulosas B que se en-- cuentran en numerosas plantas.

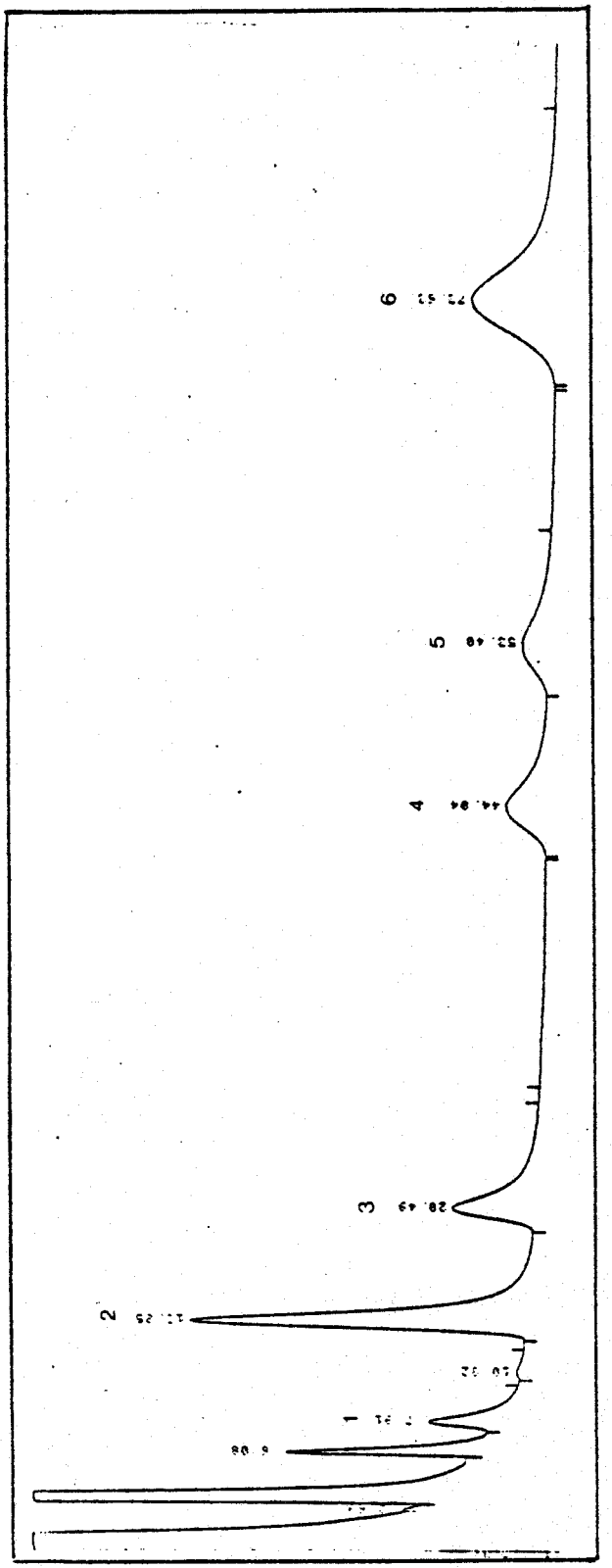


Fig. 27. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción A-3-2. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna: 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura de la columna 180°.

Tabla XXVI

Análisis cuantitativo de la fracción A-3-2.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,44	3,31	6,37
Arabinosa	3,22	24,21	46,60
Xilosa	1,36	10,23	19,68
Galactosa	1,02	7,67	14,76
Glucosa	0,87	6,54	12,59
Total	6,91	51,96	100,00

4.3. Aislamiento de hemicelulosas A y B. Fracciones B-4 y B-5.

Los análisis sobre la composición de la hemicelulosa B, descritos en los apartados anteriores, demuestran que esta hemicelulosa está impurificada por un material no hemicelulósico. Para eliminar estas impurezas, que pueden ser de lignina y polifenoles, hemos ensayado un tratamiento previo de deslignificación.

En nuestro caso, por tratarse de un fruto, se utiliza para eliminar estas impurezas un tratamiento menos enérgico que los usados en la deslignificación de maderas con un alto contenido en lignina. El material se extrae con NaOH al 1% en etanol del 80% calentando a ebullición. Este procedimiento se ha descrito por algunos autores (17-19), pero empleando la NaOH al 1% en etanol del 50%.

Tratamiento de deslignificación.

Se ha utilizado pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", muestra B, previamente extraída con etanol del 80% y con cloroformo-metanol (apartado 3.3.1). Este material (50 g) se extrae con NaOH al 1% en etanol del 80% (500 ml), calentando a reflujo con agitación durante 8 horas. A continuación se separa

el sólido por filtración, utilizando un embudo de vidrio fritado y el proceso se repite siete veces consecutivas. Finalmente se extrae con agua caliente. Este tratamiento decolora el material polisacarídico de partida, pasando de un color pardo oscuro a marrón claro.

Extracción con NaOH al 10%.

El material hemicelulósico deslignificado se extrae con NaOH al 10% (300 ml), libre de carbonatos, por la que se ha pasado nitrógeno durante 2 horas. La extracción se realiza durante 18 horas, agitando a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. El sólido se separa por filtración y el extracto se lleva a pH 5 con ácido acético al 50%. Se separa un precipitado, que corresponde a la hemicelulosa A, de aspecto gelatinoso - transparente y que al secarse da un polvo casi blanco - (fracción B-4). El rendimiento de esta hemicelulosa A, - después de la deslignificación y extracción, es del 6%.

El líquido que queda al separar este precipitado se concentra a pequeño volumen y se le añaden 4 volúmenes de etanol del 96%, para que precipite la hemicelulosa B. Se obtiene una pequeña fracción que denominamos - fracción B-5.

4.3.1. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa A. Fracción B-4.

La hidrólisis se lleva a cabo empleando una modificación del método de Saeman y col. (94), propuesta por Blake y Richards(33), que consiste en solubilizar primero el polisacárido en sulfúrico del 72%, diluir con agua hasta obtener un sulfúrico del 2,5% y calentar a ebullición durante 3 horas. El hidrolizado se neutraliza, se concentra y se cromatografía sobre papel Whatman n°3, usando n-butanol-acetona-agua (2:7:1) como desarrollador y nitrato de plata y difeniamina-urea como reveladores. Se identifican xilosa (R_G 1,46) y glucosa (R_G 1,0), esta última en gran proporción.

Una serie de cromatogramas desarrollados con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (18:3:1:4) y revelados con verde de bromocresol indican que no existen ácidos urónicos.

Para la determinación cuantitativa de los monosacáridos, la hemicelulosa A (fracción B-4) (12 mg) se disuelve en H_2SO_4 del 72% (1 ml) dejándola estar 10 h a temperatura ambiente, se añaden 28 ml de agua y se calienta a ebullición durante 3 horas. El hidrolizado se neutraliza con carbonato de bario y se le añade 1 ml

de una disolución acuosa de inositol que contiene 2 mg por ml. Se preparan los acetatos de alditoles y se analizan por cromatografía gas-líquido, utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5710 A con detector de ionización de llama, equipado con un registrador-integrador de la misma marca modelo 3380 A. La columna es la misma que se ha usado para estos derivados en experiencias anteriores. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Temperatura del bloque de inyección: 250°.
Temperatura del detector: 250°.
Temperatura de la columna: 175°.

En la figura 28 se representa uno de los cromatogramas obtenidos. En otros cromatogramas realizados con baja atenuación e inyectando gran cantidad de muestra, se pueden identificar otros azúcares, fundamentalmente xilosa, que no aparecen en las condiciones en que se hace la determinación cuantitativa.

Los resultados de la determinación cuantitativa se dan en la tabla XXVII.

La hemicelulosa A, fracción B-4, tiene la composición de una xiloglucana y en un apartado posterior se inicia un estudio sobre la estructura de esta hemicelulosa.

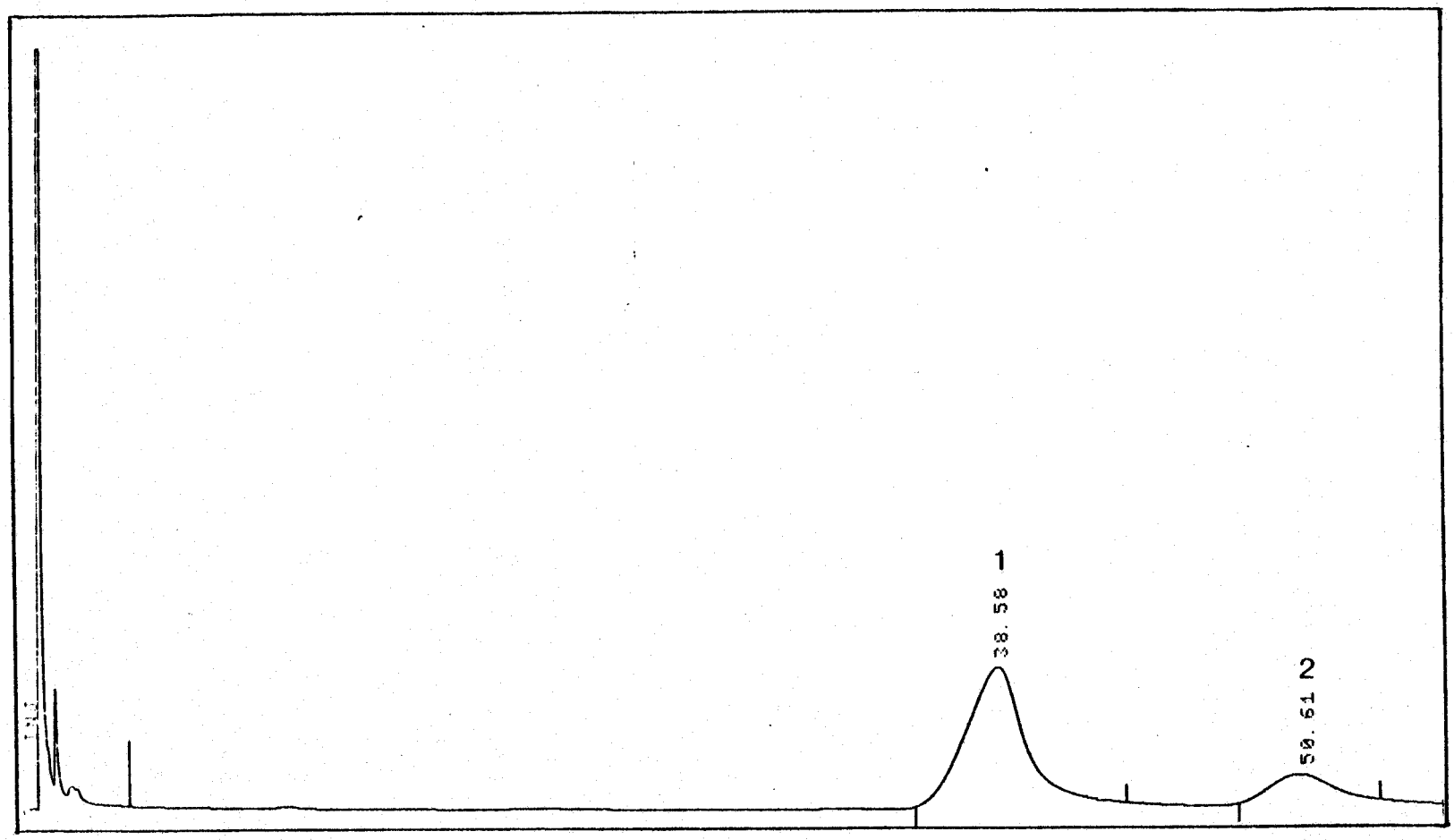


Fig. 28. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción B-4. 1, glucosa; 2, inositol (patrón interno). Columna: 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura de la columna 175°.

Tabla XXVII

Análisis cuantitativo de la fracción B-4.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Glucosa	10,26	85,50	100,00
Total	10,26	85,50	100,00

4.3.2. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción B-5.

La hemicelulosa B (fracción B-5) se hidroliza calentando con H_2SO_4 1N durante 5 h. Después de neutralizar con $BaCO_3$, el hidrolizado neutro se cromatografía sobre papel Whatman n°3 usando n-butanol-acetona-agua (2:7:1) como desarrollador y nitrato de plata como revelador.

Se identifican la xilosa (R_G 1,44) y la glucosa (R_G 1,00).

Para la determinación cuantitativa, la hemicelulosa B (fracción B-5) (12,5 mg) se hidroliza con H_2SO_4 N. Después de neutralizar, se le añaden 2,17 mg de inositol y se preparan los correspondientes acetatos de alditoles.

Uno de los cromatogramas obtenidos se representa en la figura 29 y los resultados cuantitativos se dan en la tabla XXVIII.

La hemicelulosa B (fracción B-5) tiene, de acuerdo con los resultados de estos análisis, la composición de una glucoxilana.

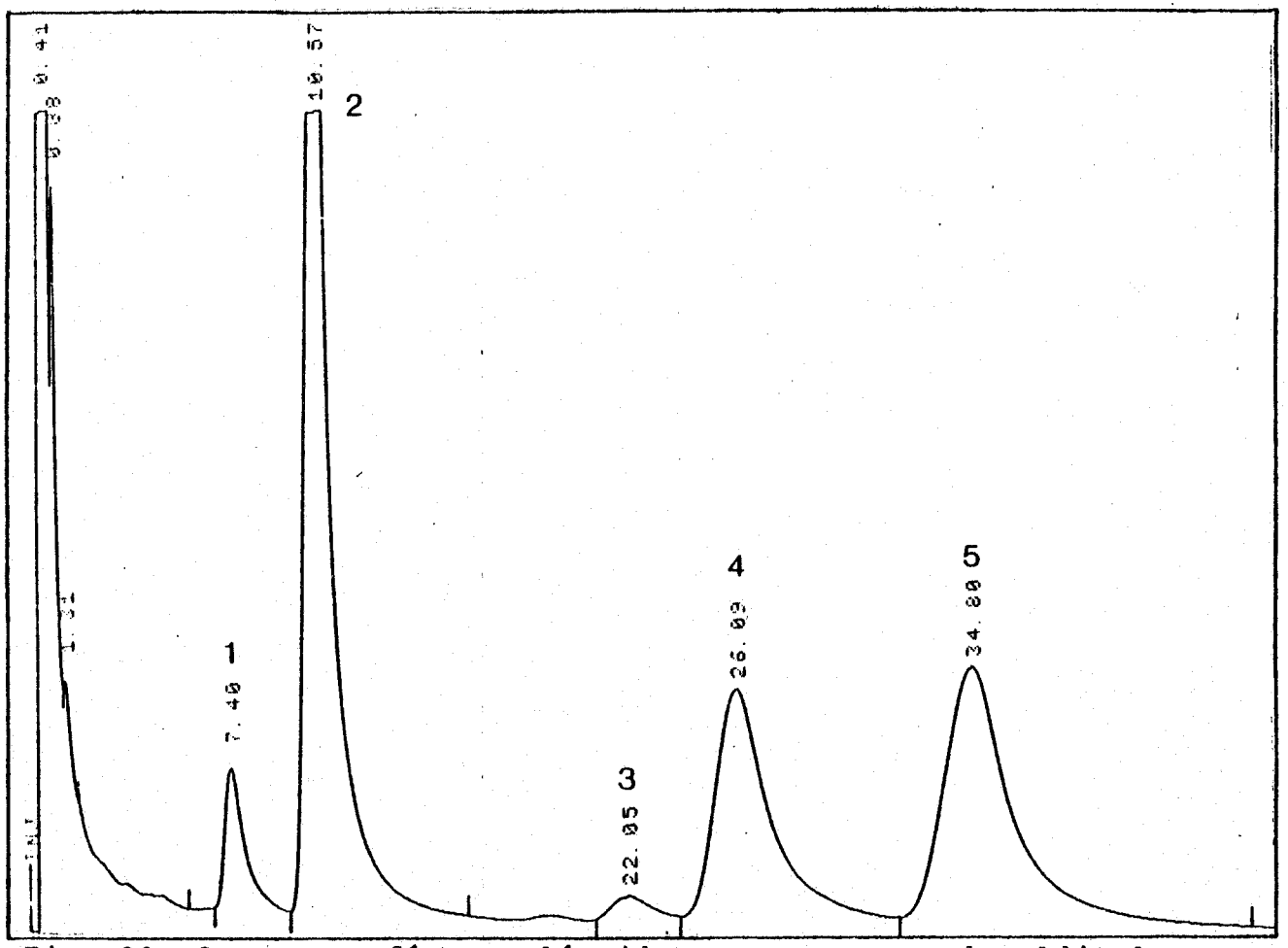


Fig. 29. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles presentes en el hidrolizado de la fracción B-5. 1,arabinosa; 2, xilosa; 3, galactosa; 4, glucosa y 5, inositol (patrón interno). Columna 2m× ×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura: 175°.

Tabla XXVIII

Análisis cuantitativo de la fracción B-5.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Arabinosa	0,60	4,80	6,54
Xilosa	5,72	45,76	62,31
Galactosa	0,20	1,60	2,18
Glucosa	2,66	21,28	28,98
Total	9,18	73,44	100,01

Según los antecedentes bibliográficos, en este tipo de hemicelulosas se encuentran también presentes pequeñas cantidades de otros azúcares, como arabinosa y galactosa, en forma de ramificaciones glicosídicas terminales.

En nuestro caso consideramos también la posibilidad de que estos azúcares constituyen una arabinogalactana, ya detectada en la fracción soluble en agua, que por la naturaleza de los tejidos no se ha podido extraer anteriormente y que constituye una parte residual en esta fracción.

4.4. Aislamiento de la hemicelulosa B. Fracción B-6.

Se ha utilizado como producto de partida la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", muestra B, extraída con etanol del 80% y con cloroformo-metanol (apartado 3.3.1). Esta pulpa se extrae a continuación con agua y se le somete a un tratamiento con metóxido sódico (apartado 3.3.4). Finalmente se aplica el método de obtención de hemicelulosas A y B de Whistler y Feather (22).

La pulpa purificada (50 g) se extrae con NaOH -

al 10% (1 l) durante 24 h con agitación en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se centrifuga y se acidifica con ácido acético al 50%, pero no se obtiene la fracción correspondiente a la hemicelulosa A. Se concentra a 500 ml y se deja estar a 4°sin conseguir que precipite esta fracción de hemicelulosa.

El aislamiento de la hemicelulosa B no se hace en la forma usual por precipitación con etanol, sino mediante la formación de un complejo de cobre, basándonos en los trabajos de Salkowsky (95,96) en los que estudia la separación de xilanas y arabanas por precipitación de las xilanas, mediante la formación de estos complejos con el licor de Fehling. Se han utilizado la cuprietilendiamina (97), el cloruro de cobre (II) (98), el sulfato de cobre (II) (99) y el acetato de cobre (II) (100) para el fraccionamiento de polisacáridos que contienen D-manosa y D-xilosa.

El método (28) consiste en añadir al polisacárido disuelto en agua o álcali, una solución de Fehling (volúmenes iguales de las soluciones A y B) hasta que se completa la precipitación del complejo gelatinoso. Esto debe hacerse con mucho cuidado, ya que un exceso de licor de Fehling puede causar la redisolución del precipitado (101-103). El precipitado se recoge por fil

tración o centrifugación y se descompone por maceración a 0° con etanol que contiene un 5% (V/V) de ácido clorhídrico concentrado, quedando el polisacárido en forma de precipitado blanco. Se lava con etanol y después con acetona hasta que ésta salga incolora, indicando la ausencia de $CuCl_2$. La solución que queda cuando se separa el precipitado gelatinoso del complejo de cobre, se acidifica, se dializa y los polisacáridos que quedan disueltos se aislan por precipitación con cuatro volúmenes de etanol del 96%.

En nuestro caso hemos operado de la siguiente forma:

La solución procedente de la extracción con NaOH al 10%, que había sido concentrada y acidificada para precipitar la hemicelulosa A, se alcaliniza y se le añade cuidadosamente una solución de Fehling recientemente preparada. Se obtiene un precipitado de color verde azulado que se centrifuga y se lava varias veces con agua. Se trata con una solución de ácido clorhídrico al 5% en etanol a 0°durante 1 minuto, se centrifuga y se lava con etanol varias veces y por último con acetona, hasta que ésta aparece incolora. El precipitado blanco así obtenido, se seca a vacío sobre pentóxido de fósforo y se obtiene un sólido pulvurulento de color blanco

que pesa 954 mg (fracción B-6). El rendimiento respecto a la pulpa tratada (apartado 3.3.1) es del 2%.

El sobrenadante y las aguas de lavado procedentes de la centrifugación del complejo de cobre se acidifican, se dializan y se concentran. Para aislar los polisacáridos se añaden cuatro volúmenes de etanol del 96% pero no se obtiene ningún precipitado.

4.4.1. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción B-6.

Unos miligramos de la hemicelulosa B (fracción B-6) se hidrolizan con H_2SO_4 1N. El hidrolizado neutro se cromatografía sobre papel y se identifican: xilosa (R_G 1,73), arabinosa (R_G 1,49), manosa (R_G 1,24), glucosa (R_G 0,99) y galactosa (R_G 0,80).

Para la determinación cuantitativa, la hemicelulosa B (fracción B-6) (20 mg) se hidroliza y neutraliza en la forma usual. Al hidrolizado neutro se le añaden 4 mg de inositol y se preparan los correspondientes acetatos de alditoles. Uno de los cromatogramas obtenidos se representa en la figura 30 y los resultados cuantitativos se exponen en la tabla XXIX.

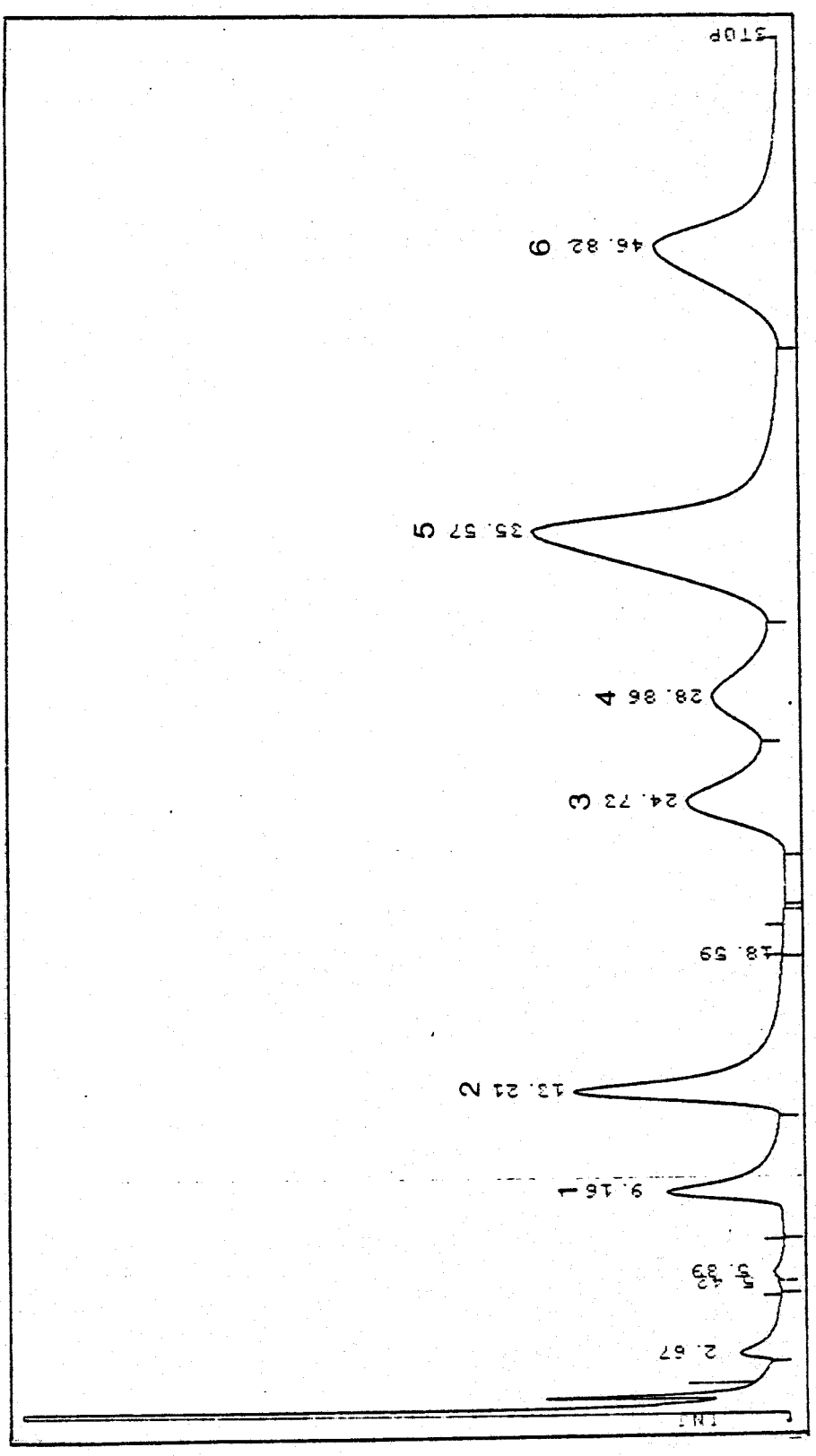


Fig. 30. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles presentes en el hidrolizado de la fracción B-6. 1, arabinosa; 2, xilosa; 3, manosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna de 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura de la columna 175°.

Tabla XXIX

Análisis cuantitativo de la fracción B-6.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Arabinosa	1,03	5,15	7,72
Xilosa	2,01	10,05	15,06
Manosa	2,37	11,85	17,76
Galactosa	1,81	9,05	13,57
Glucosa	6,12	30,60	45,88
Total	13,34	65,05	99,99

4.4.2. Purificación de la hemicelulosa B. Fracción B-6. Precipitación fraccionada con etanol.

La hemicelulosa B (50 mg), obtenida en el apartado 4.2.1, se disuelve en agua (1ml) y se le añade etanol absoluto gota a gota. Se obtiene un precipitado --- cuando se alcanza una concentración de etanol del 40%.- Una vez separado el precipitado se continúa añadiendo etanol y se obtiene una nueva fracción al alcanzar el 60% de etanol. Las dos fracciones se hidrolizan y los - monosacáridos se identifican por cromatografía sobre papel.

Los resultados demuestran que ambas fracciones - son cualitativamente idénticas.

4.4.3. Purificación de la hemicelulosa B. Fracción B-6. Precipitación con $Ba(OH)_2$.

El hidróxido bárico forma complejos insolubles - que se han utilizado para la purificación de polisacáridos que contienen enlace β(1-4) de manosa y para la separación de mananas de xilanas, (104-110). También se -

ha usado en la precipitación de galactanas que contienen una cadena principal de galactosa con enlace β(1-4) (111).

El método que se ha seguido es el descrito por - Meier (29). La hemicelulosa B (fracción B-6) (40 mg) - se disuelve en NaOH 1N (7 ml). Se añade poco a poco una solución saturada y filtrada de $Ba(OH)_2$ hasta que no se forma más precipitado. Este se separa por centrifuga--- ción y se disuelve añadiendo ácido acético 2N. El polisacárido se precipita por adición de cuatro volúmenes - de etanol. El polisacárido que queda en el filtrado, -- una vez separado el complejo insoluble de bario, se precipita por la adición de etanol. Ambas fracciones se hidrolizan y se cromatografían y los resultados de los -- cromatogramas muestran una composición similar y la presencia mayoritaria de glucosa y xilosa en ambas fracciones.

4.5. Estructura de la hemicelulosa A. Fracción B-4.

Se ha iniciado un estudio sobre la estructura de la hemicelulosa A, fracción B-4 mediante hidrólisis -- parciales que tienen por objeto la degradación del polisacárido a oligosacáridos y monosacáridos. Esta mez-- cla se puede separar por cromatografía de partición so-

bre celulosa, de adsorción sobre carbón o de filtración sobre geles porosos. La estructura de los oligosacáridos nos dará información sobre la secuencia en que se hallan enlazados los restos de azúcares, los modos de enlace entre ellos y la configuración de los enlaces glicosídicos.

Los polisacáridos en los cuales los distintos enlaces glicosídicos se hidrolizan a la misma velocidad - darán en la hidrólisis parcial una amplia gama de todos los oligosacáridos posibles. En el caso más simple de la hidrólisis parcial de un homopolisacárido lineal, que contiene un solo tipo de enlace, se obtiene una serie homóloga de oligosacáridos. Así, la amilosa da en - la hidrólisis parcial: glucosa, maltosa, maltotriosa etc.

Muchos polisacáridos contienen sin embargo diferentes enlaces glicosídicos, que se pueden hidrolizar a distintas velocidades y podemos alcanzar un cierto grado de hidrólisis selectiva. En general los furanósidos se hidrolizan más rapidamente que los piranósidos.Un ejemplo lo tenemos en la hidrólisis parcial de polisacáridos que contienen restos terminales de arabinofuranosa, los cuales se pueden hidrolizar en condiciones muy suaves y controladas, mientras que los enlaces glicosídicos de la cadena principal se hidrolizan con dificul-

tad. Esto hace posible aislar polisacáridos degradados libres de arabinosa y de estructura menos compleja.

La hidrólisis parcial es un método fundamental en la determinación de la estructura de un polisacárido. Los autores utilizan en la hidrólisis diferentes ácidos, como el ácido sulfúrico y o el ácido trifluoracético. La graduación en la hidrólisis se consigue variando la concentración de los ácidos o los tiempos de hidrólisis.

4.5.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico.

La hemicelulosa A (fracción B-4) (100 mg) se hidroliza con H_2SO_4 0,1N (10 ml) calentando a ebullición durante 1 hora. Después de este tiempo la mayoría del material hemicelulósico queda sin disolver y se separa por filtración (producto insoluble, 83 mg). El filtrado se neutraliza y se cromatografía sobre papel Whatman n°3, utilizando n-butanol-acetona-agua (2:7:1) como desarrollador y nitrato de plata como revelador. Se identifican: Ramnosa (R_G 1,98), xilosa (R_G 1,49), arabinosa (R_G 1,28), glucosa (R_G 1,00) y galactosa (R_G 0,80). La mancha que se identifica como xilosa es muy intensa, mientras que las correspondientes a galactosa, arabino-

sa y ramnosa son muy débiles.

El resto insoluble separado en esta primera hidrólisis se somete al mismo proceso y durante el mismo tiempo. En el hidrolizado se identifican la xilosa (R_G 1,55) y la glucosa (R_G 1,00), aumentando la intensidad y extensión de la mancha correspondiente a la glucosa. Se detectan también dos manchas de oligosacáridos con R_G 0,52 y R_G 0,29. La mancha de R_G 0,29 se identifica con la celobiosa como se comprueba posteriormente.

Se repite el proceso con el sólido que aún permanece insoluble y en la cromatografía sólo se observan glucosa y xilosa cuyas intensidades son parecidas.

Por último, en una nueva hidrólisis con H_2SO_4 0,5N durante 1 hora, se identifica la glucosa, mientras que la xilosa ha desaparecido prácticamente.

4.5.2. Hidrólisis con ácido trifluoracético.

La hemicelulosa A (10 mg) se calienta durante 30 minutos con ácido trifluoracético 0,1N (2 ml). Se elimina el ácido por evaporación y el residuo se suspende en unas gotas de agua, tomándose unos microlitros para la-

cromatografía sobre papel. El cromatograma es análogo al obtenido en las experiencias anteriores y permite identificar: Xilosa(R_G 1,63), arabinosa (R_G 1,36), glucosa (R_G 1,00) y galactosa (R_G 0,81).

La suspensión preparada con fines cromatográficos se vuelve a evaporar a sequedad y el residuo se continúa hidrolizando con ácido trifluoracético 0,5N, calentando en baño de agua durante 30 min. El resultado de la cromatografía es similar a la anterior, salvo que ahora se observa la presencia de un oligosacárido con R_G 0,30, que se identifica con la celobiosa.

El proceso se vuelve a repetir, pero se usa ácido trifluoracético 1N. En la cromatografía correspondiente se observan manchas de R_G0,29 y R_G0,02 identificándose la primera con la celobiosa.

En el proceso de estas hidrólisis la concentración de glucosa va aumentando mientras que la xilosa disminuye hasta desaparecer.

4.5.3. Acetolisis de la hemicelulosa A. Fracción B-4.

La acetolisis es un procedimiento alternativo a

la hidrólisis ácida para la rotura de enlaces glicosídicos. La acetolisis de polisacáridos o sus derivados -acetilados conduce a la formación de oligosacáridos --acetilados que pueden convertirse en oligosacáridos por desacetilación.

La despolimerización gradual del polisacárido -- por la acetolisis puede seguir una pauta distinta a la observada en la hidrólisis parcial con disoluciones --- acuosas de ácidos y, por lo tanto, pueden aislarse dis-- tintos oligosacáridos.

Rosenfeld y Ballou (112) estudian la cinética y el mecanismo de la acetolisis en varios tipos de disacáridos y concluyen que, para los distintos enlaces y -- las distintas configuraciones, la velocidad de reacción decrece en la siguiente forma:

Disacáridos de glucosa con enlaces β:

(1-6)>>(1-3) >(1-2) >(1-4)

Disacáridos de glucosa con enlaces α:

(1-6) >>(1-4) >(1-3)> (1-2)

Disacáridos de manosa:

α(1-6)>> α(1-3) > β(1-4) > α(1-2)

Son numerosos los trabajos donde se hace uso de esta técnica en el análisis estructural de polisacári-- dos. Se ha aplicado en el estudio de mananas (113-115),

dextranas (116-121), amilopectinas (122,123) etc.

Nosotros hemos realizado la acetolisis siguiendo el método descrito por Wolfrom y Franks (124), que utilizan una mezcla de anhídrido acético, ácido acético y ácido sulfúrico (12:8:1,5) . El aislamiento de los oligosacáridos acetilados se realiza por precipitación sobre agua helada en presencia de bicarbonato sódico, seguida de extracción con cloroformo. Posteriormente estos oligosacáridos acetilados se desacetilan con metóxido sódico.

Procedimiento.

La hemicelulosa A (250 mg) se suspende con agitación y enfriamiento externo en una mezcla (3,5 ml) que tiene la siguiente composición: anhídrido acético, 12 ml; ácido acético, 8 ml, y ácido sulfúrico, 1,5 ml. La suspensión se agita durante 80 horas y se separa el sólido que no ha reaccionado, filtrando sobre una placa de vidrio fritado. El filtrado, de color rojo oscuro, se añade lentamente sobre una solución acuosa de bicarbonato sódico a 0° formándose una emulsión que se extrae con cloroformo (3×10 ml). Los extractos clorofórmicos se secan con sulfato sódico anhidro y se concentran a sequedad. El residuo (140 mg) se trata con metanol absoluto (5 ml). Una parte (70 mg) queda disuelta en meta-

nol y se le adiciona metilato sódico 2N hasta pH 8 aproximadamente para provocar la desacetilación. La parte insoluble, se somete de nuevo a acetolisis con la mezcla descrita (2 ml) durante 60 horas más. Pasado este tiempo se procede de manera similar vertiendo la mezcla de reacción sobre bicarbonato sódico y se extraen los oligosacáridos acetilados con cloroformo. Una vez evaporado el disolvente se desacetila con metilato sódico. El ión Na^+ se elimina con una resina de intercambio catiónico IR-120 H^+ antes de proceder al análisis cromatográfico.

4.5.3.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel.

Se utiliza la técnica descendente sobre papel -- Whatman n°3 usando dos desarrolladores: desarrollador A, n-butanol-acetona-agua (2:7:1); desarrollador B, n-butanol-etanol-agua (2:1:1) (125). Como reveladores se usan el nitrato de plata y la difenilamina-urea.

Los resultados de las cromatografías de las muestras de oligosacáridos obtenidas en las dos acetolisis son similares y en ellas se detecta la presencia de celobiosa (R_G 0,32, desarrollador A y R_G 0,61; desarrolla

dor B), y otros oligosacáridos (R_G 0,27; 0,08 y 0,02 ;desarrollador B), que pueden corresponder a la serie homóloga de la celobiosa.

Se deduce por tanto la presencia en la hemicelulosa A (fracción B-4) de un esqueleto estructural con enlaces β(1-4), similar a la celulosa.

Para confirmarlo se realiza la acetolisis de la celulosa en condiciones similares a las descritas y se cromatografían los oligosacáridos obtenidos. Los cromatogramas son análogos a los anteriores y en ellos se observa la presencia de la serie homóloga de la celobiosa hasta un grado de polimerización de cinco unidades. Esta conclusión se confirma comprobando la relación de movilidades cromatográficas propuesta por French y Wild (126). Estos autores dicen que la movilidad en cromatografía sobre papel de una serie homóloga de oligosacáridos depende del número de moléculas de hexosas que contengan, lo que se manifiesta en una relación lineal entre el logaritmo de una función de partición $\alpha' = \frac{R_G}{1 - R_G}$ y el tamaño molecular.

En nuestro caso, se ha sustituido en la fórmula el valor R_G por el R_{xil}, ya que al necesitar tiempos de desarrollo muy prolongados se pierde el frente, y si se hacen varios desarrollos es difícil detener el frente del eluyente a la misma altura. Esta modificación es váli

da, ya que se ha comprobado en los cromatogramas de los productos de la acetolisis de la celulosa.

En las tablas XXX y XXXI se incluyen los valores de R_G , R_{Xil} y $\log\alpha'$ encontrados para los distintos oligosacáridos que se originan en la acetolisis de la hemicelulosa A (fracción B-4) y de la celulosa respectivamente.

La representación gráfica de estos valores se recoge en la figura 31. Demuestra que los oligosacáridos obtenidos en la acetolisis de la hemicelulosa A constituyen la serie homóloga de la celobiosa hasta un grado de polimerización de cinco unidades de glucosa.

4.5.3.2. Aislamiento de la celobiosa por cromatografía de papel.

El oligosacárido identificado como celobiosa, obtenido en la acetolisis de la hemicelulosa A, se aisla mediante una cromatografía preparativa sobre papel.

Para ello se construye un cromatograma de papel Whatman n°3 tal como se indica en la figura 32. El producto de la acetolisis se deposita en la línea base, colocando los puntos de manera que las manchas sean tan--

Tabla XXX

Cromatografía sobre papel. Valores de R_G, R_{Xil} y log α', de los oligosacáridos obtenidos en la acetolisis de la hemicelulosa A (fracción B-4).

R_G	R_{Xil}	logα
0,02	0,014	-1,85
0,08	0,065	-1,16
0,27	0,219	-0,55
0,61	0,499	-0,01
1,00	0,826	+0,67

Tabla XXXI

Cromatografía sobre papel. Valores de R_G, R_{Xil} y log α', de los oligosacáridos obtenidos en la acetolisis de celulosa comercial.

R_G	R_{Xil}	logα
0,02	0,014	-1,85
0,08	0,069	-1,13
0,27	0,225	-0,54
0,61	0,506	+0,01
0,99	0,826	+0,67

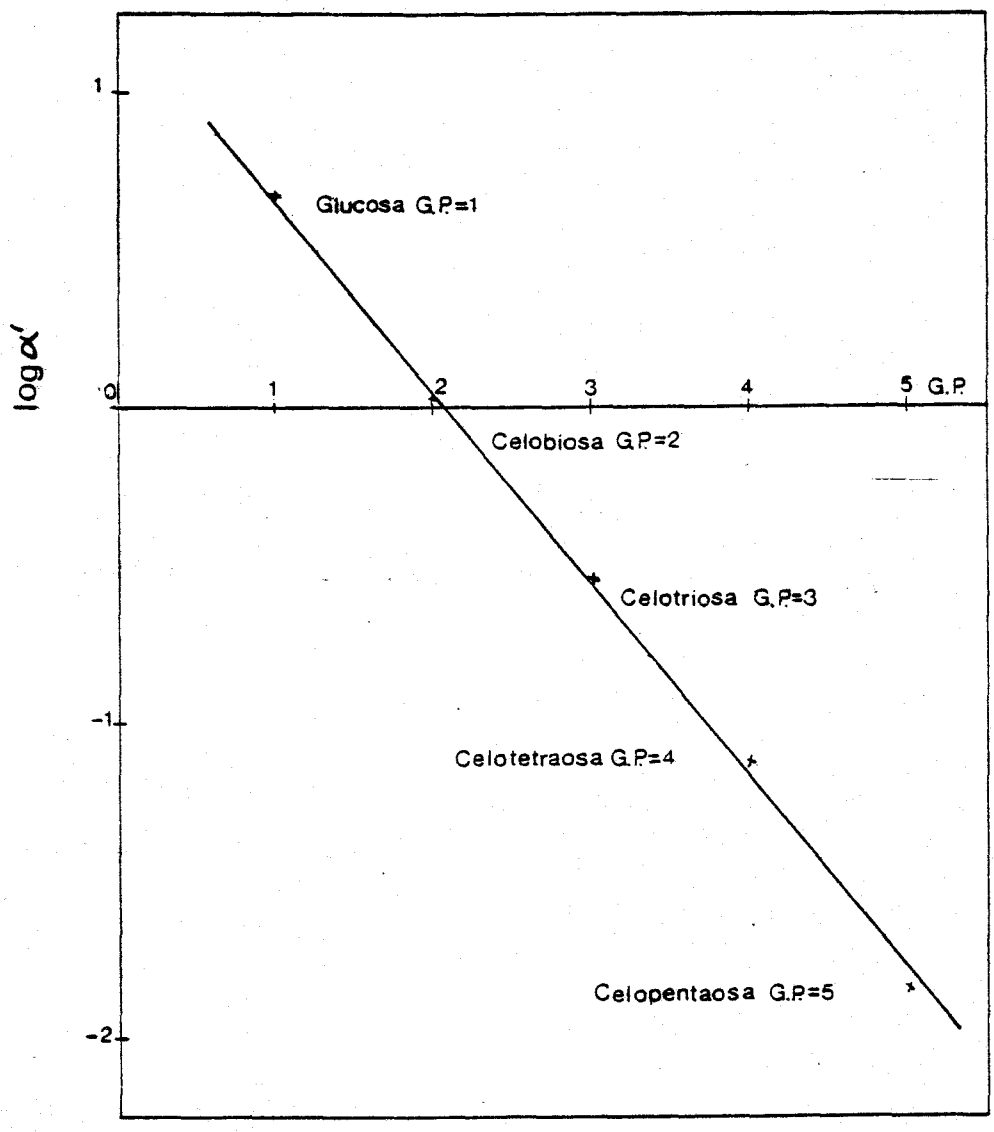


Fig 31. Representación gráfica de la relación entre el log α' y el grado de polimerización, para los oligosacáridos de la serie homóloga de la celobiosa.

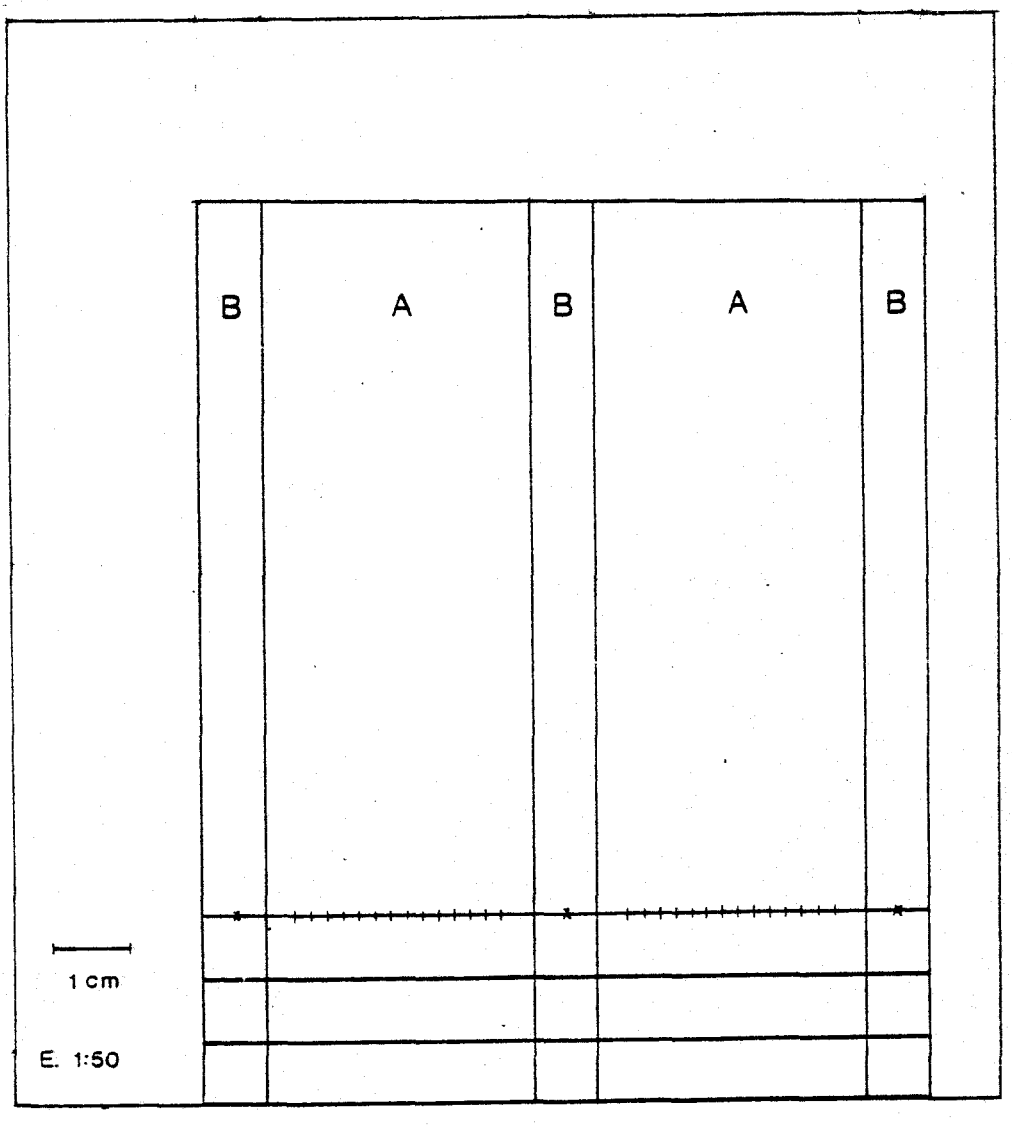


Fig. 32. Cromatografía preparativa sobre papel. Cromatograma utilizado en el aislamiento de la celobiosa.

gentes unas a otras hasta agotar la muestra. Se eluye - durante 47 horas con n-butanol-etanol-agua (2:1:1) y - luego se seca. Se cortan las bandas testigos, B y se revelan. Se reconstruye el cromatograma y se cortan las - bandas A transversalmente por donde, a la vista del revelado de las bandas testigos, se supone que se encuentra la celobiosa. Estas tiras de papel se cortan en pequeños trozos y se extrae con agua a ebullición. Por último, se filtra, se concentra a sequedad y se evapora - varias veces con etanol, obteniéndose la celobiosa con un poder rotatorio $(\alpha)_D^{23}$ +21°. Mian y col. (127) dan un valor de (α) +24°.

4.5.3.3. Identificación de la celobiosa por cromatografía gas-líquido.

La celobiosa obtenida en la cromatografía de papel preparativa, se identifica por cromatografía gas-líquido como TMS éter.

Se utiliza una columna de acero inoxidable de - 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno, rellena con UCW 98 al 8% sobre Chromosorb W, AW-DMCS de 80-100 mesh. Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

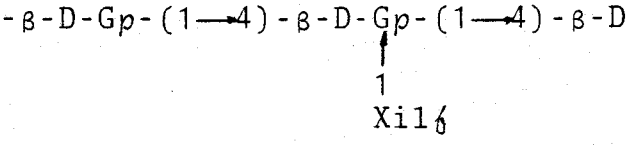
Temperatura del bloque de inyección: 300°.

Temperatura del detector: 300°.

Temperatura de la columna: 240°.

En la figura 33 se muestran dos cromatogramas -- que corresponden a la celobiosa aislada en la acetoli-- sis de la hemicelulosa A (fracción B-4) y a la celobiosa comercial. A ambas muestras se le añade TMS éter de la sacarosa como patrón interno.

De acuerdo con los resultados obtenidos y los - antecedentes bibliográficos, proponemos para la hemicelulosa A (fracción B-4) la estructura de una xiloglucana, con una cadena principal de glucosa con enlaces --- β(1—4) y ramificaciones de xilosa.



En estos polisacáridos los enlaces de xilosa son mas débiles que los de glucosa. Una hidrólisis suave -- elimina estas ramificaciones de xilosa y queda una cadena principal de glucosa que se rompe en condiciones más enérgicas, conduciendo a la obtención de celobiosa y su serie homóloga.

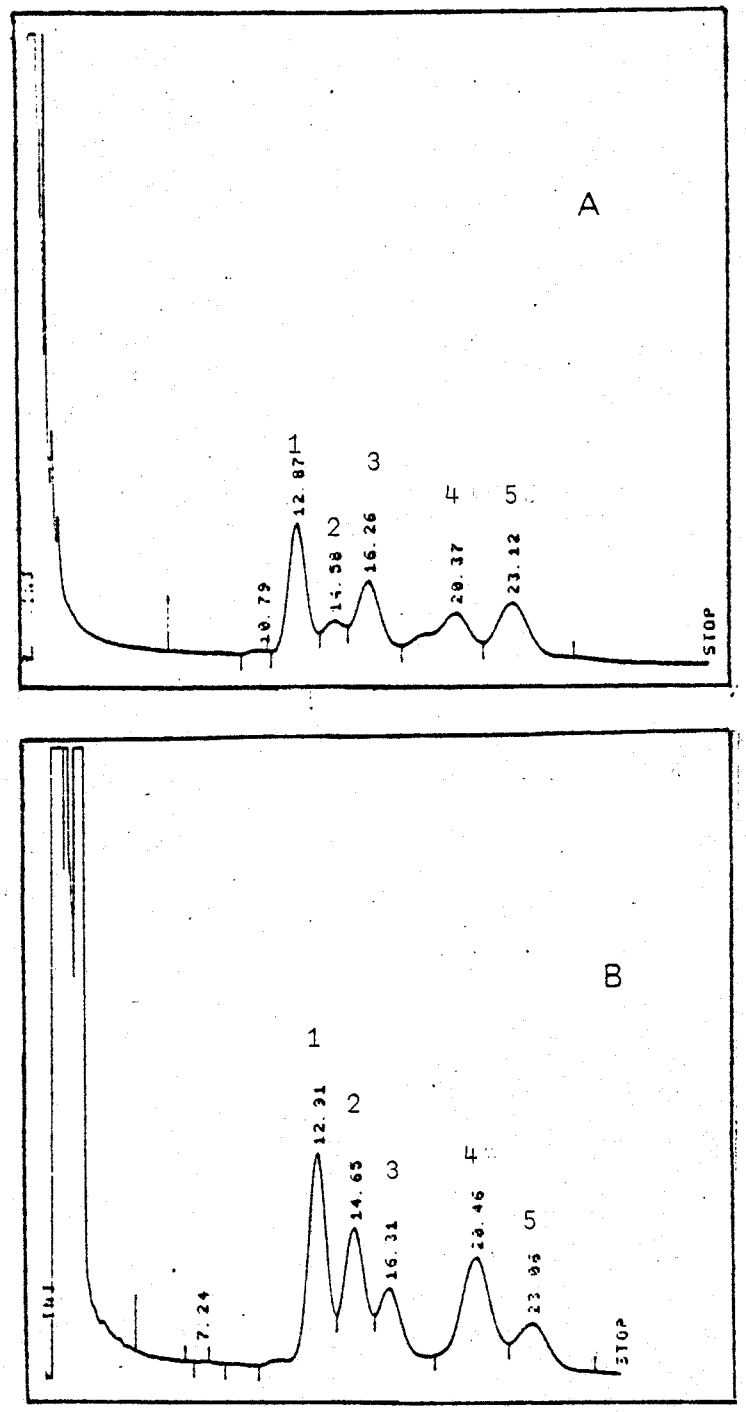


Fig. 33. Cromatografía gas-líquido-- como TMS éteres. A) celobiosa comercial. B) celobiosa aislada en la acetolisis de la fracción B-4.Los tiempos de retención relativos a la sacarosa (pico 1) utilizada como patrón interno son:pico 2(1,13);3,(1,26);4, (1,59);5(1,79). Columna:2m×3mm de UCW 98 al 8% sobre Chromosorb W,AW-DMCS, 80-100 mesh.Temperatura: 240°.

4.6. Estructura de la hemicelulosa B. Fracción B-6.

4.6.1. Cromatografía de filtración sobre geles porosos.

En este apartado se estudia la cromatografía sobre Sephadex G-50, G-75 y Sephacryl S-300 de la hemicelulosa B (fracción B-6) purificada por precipitación como complejo de cobre, con el fin de analizar su homogeneidad y determinar su peso molecular.

Los fundamentos de esta técnica y sus aplicaciones en la purificación de polisacáridos y en las determinaciones de pesos moleculares se han descrito en los apartados 3.4. y 3.5.

4.6.1.1. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-50.

La fracción B-6 (50 mg) se disuelve en agua --- (4 ml) y se pasa a través de una columna de Sephadex -- G-50 de 70 cm de altura y 2,9 cm de diámetro. Se eluye con agua y se recogen fracciones de 10 ml, que se analizan por el método del fenol-ácido sulfúrico descrito en

Tabla XXXII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-50.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-12	0,000	25	0,195	39	0,357
13	0,480	26	0,180	40	0,145
14-17 (*)	——	27	0,125	41	0,270
18	1,700	28	0,080	42	0,085
19	1,030	29	0,076	43	0,075
20	0,725	30-34	0,045	44	0,325
21	0,620	35	0,550	45	0,107
22	0,450	36	0,105	50	0,055
23	0,322	37	0,225	51-60	0,000
24	0,218	38	0,450		

(*) La máxima absorbancia corresponde al tubo 14.

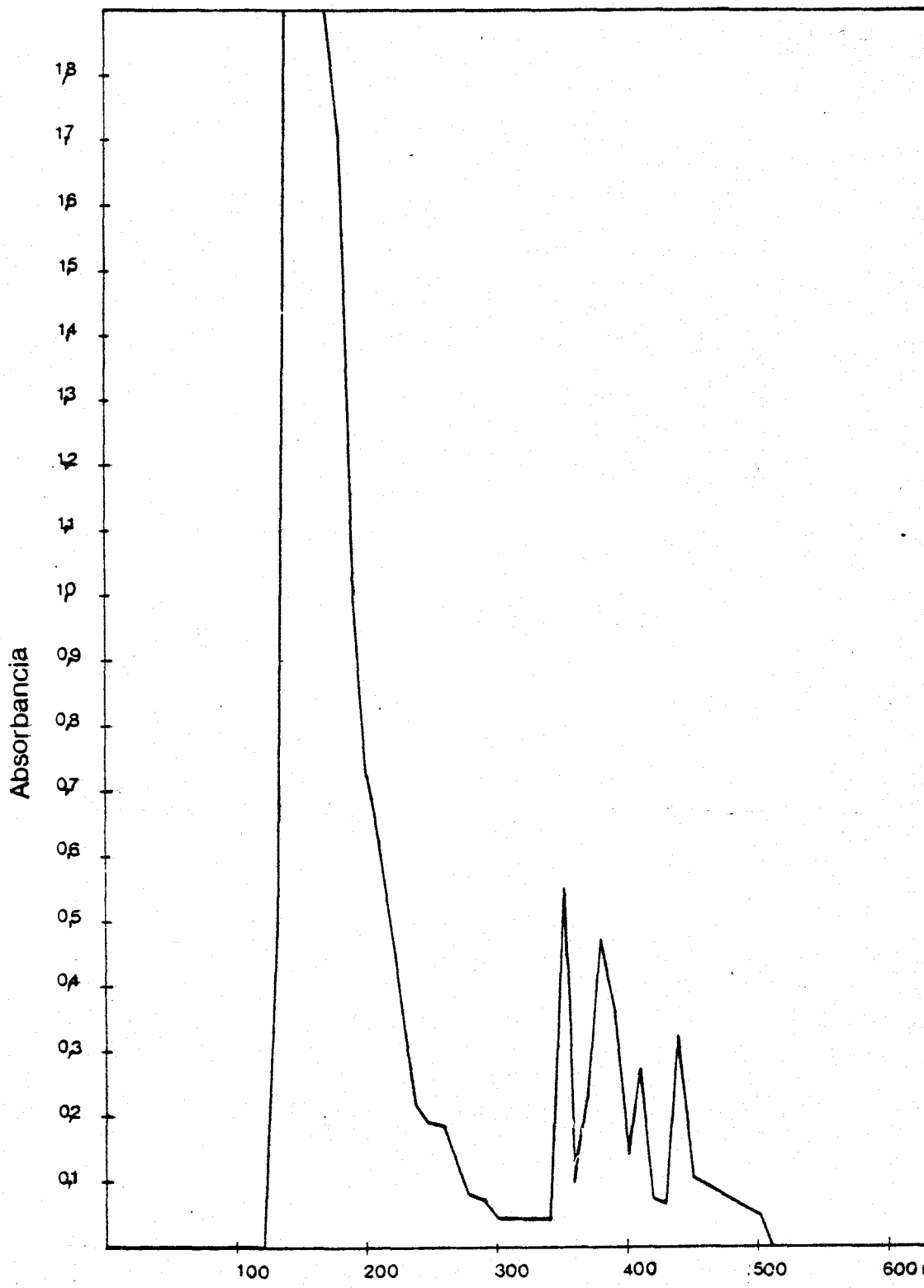


Fig. 34. Diagrama de elución de la fracción B-6, sobre Sephadex G-50.

el apartado 3.4. El volumen vacío y el volumen interno de esta columna son: V_o = 140 ml y V_i = 290 ml.

Los valores de absorbancia para las fracciones eluidas se incluyen en la tabla XXXII, y la representación gráfica de estos valores frente al volumen de elución se da en la figura 34. Analizando la gráfica, se observa que la mayoría de la muestra queda fuera del rango de fraccionamiento de este relleno y que solamente aparecen una serie de picos en la zona correspondiente a los pesos moleculares bajos, con valores de K_d 0,72; 0,83; 0,93 y 1,00, que indican que se trata de monosacáridos y oligosacáridos.

4.6.1.2. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-75.

La fracción B-6 (40 mg) disuelta en agua (5 ml) se pasa por una columna de Sephadex G-75 de 94 cm de altura por 2,9 cm de diámetro interno. El eluyente es agua con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se recogen fracciones de 10 ml. V_o = 200 ml y V_i = 210 ml.

Tabla XXXIII

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-75.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-17	0,000	34	0,490	48-50	0,040
18	0,285	35	0,430	51	0,035
19-22 (*)	——	36	0,410	52	0,045
23	1,580	37	0,375	53	0,030
24	1,080	38	0,345	54	0,048
25	0,835	39	0,315	55	0,025
26	0,725	40	0,255	56	0,050
27	0,690	41	0,205	57	0,075
28	0,655	42	0,185	58	0.095
29	0,600	43	0,165	59	0,093
30	0,570	44	0,120	60	0,072
31	0,535	45	0,085	61	0,037
32	0,555	46	0,072	62	0,033
33	0,505	47	0,050	65-70	0,000

(*) La máxima absorbancia corresponde a la fracción 20.

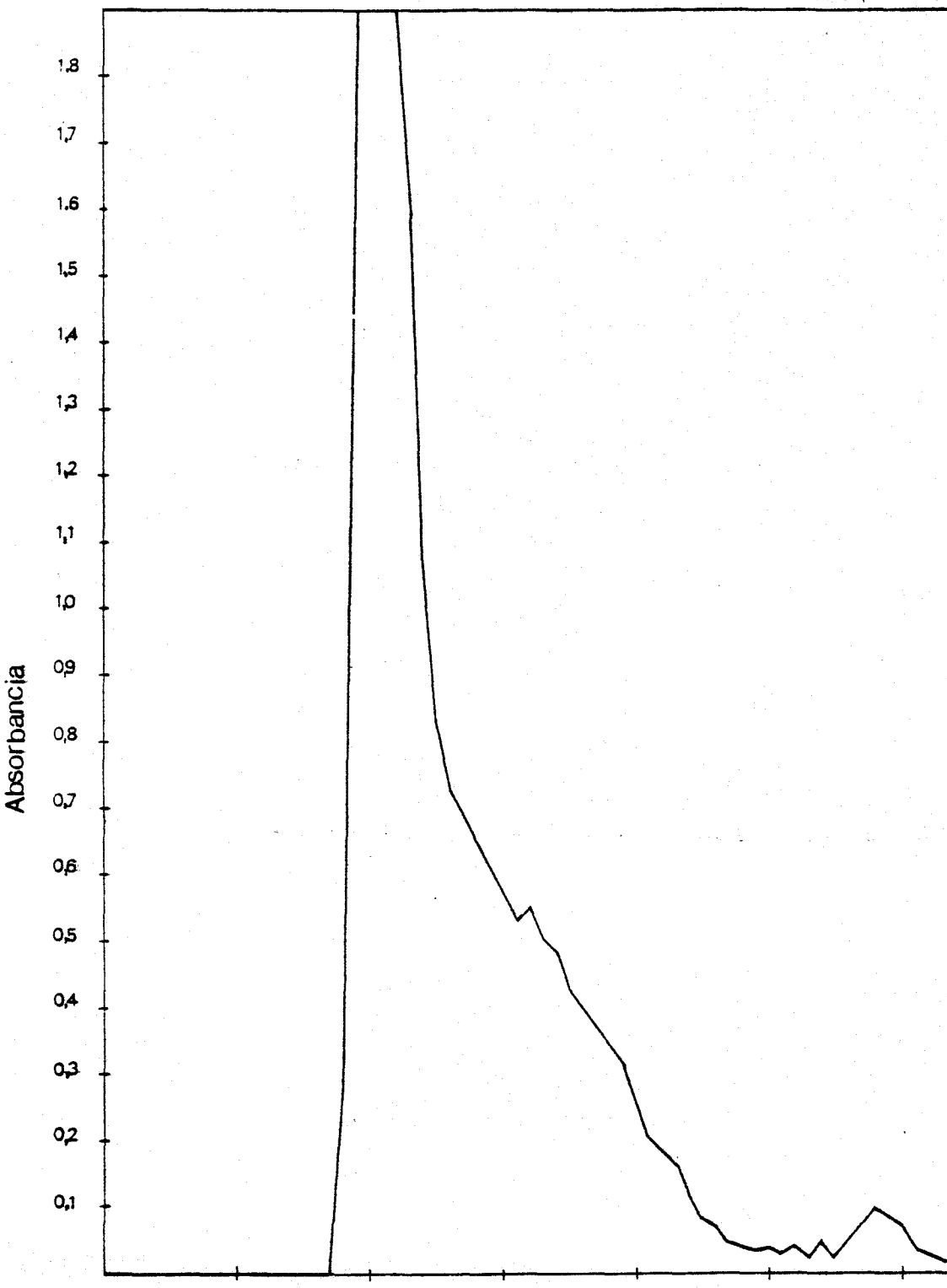


Fig.35. Diagrama de elución de la fracción B-6, sobre Sephadex G-75.

Las absorbancias de las fracciones eluidas se incluyen en la tabla XXXIII y la representación gráfica en la figura 35. De la misma manera que en el caso de la Sephadex G-50, la mayor parte de la muestra queda fuera del rango de fraccionamiento de este gel y por tanto tendrá un peso molecular superior a 50000.

4.6.1.3. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephacryl S-300.

Se utiliza una columna de Sephacryl S-300 de 62 cm de altura y 2,9 cm de diámetro interno. La fracción B-6 (40 mg), disuelta en NaCl 0,5M (5 ml), se pasa a través del lecho cromatográfico a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min eluyendo con NaCl 0,5M. Para esta columna, V_o = 170 ml y V_i = 230 ml.

Los valores de absorbancia para las fracciones eluidas (10 ml) se incluyen en la tabla XXXIV y el diagrama de elución se representa en la figura 36. La muestra B-6, queda dentro del rango de fraccionamiento y aparece como tres picos no bien resueltos. Los volúmenes de elución y los coeficientes de distribución correspondientes son:

Tabla XXXIV

Valores de absorbancia de las fracciones recogidas en la cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-14	0,000	28	1,500	38	0,110
15	0,035	29	1,450	39	0,115
16	0,290	30	1,250	40	0,120
17	0,715	31	1,070	41	0,100
18	1,000	32	0,880	42,43	0,065
19	1,250	33	0,650	44	0,035
20	1,450	34	0,415	45	0,025
21-23	1,650	35	0,350	46-50	0,000
24,25	1,600	36	0,175		
26,27	1,550	37	0,125		

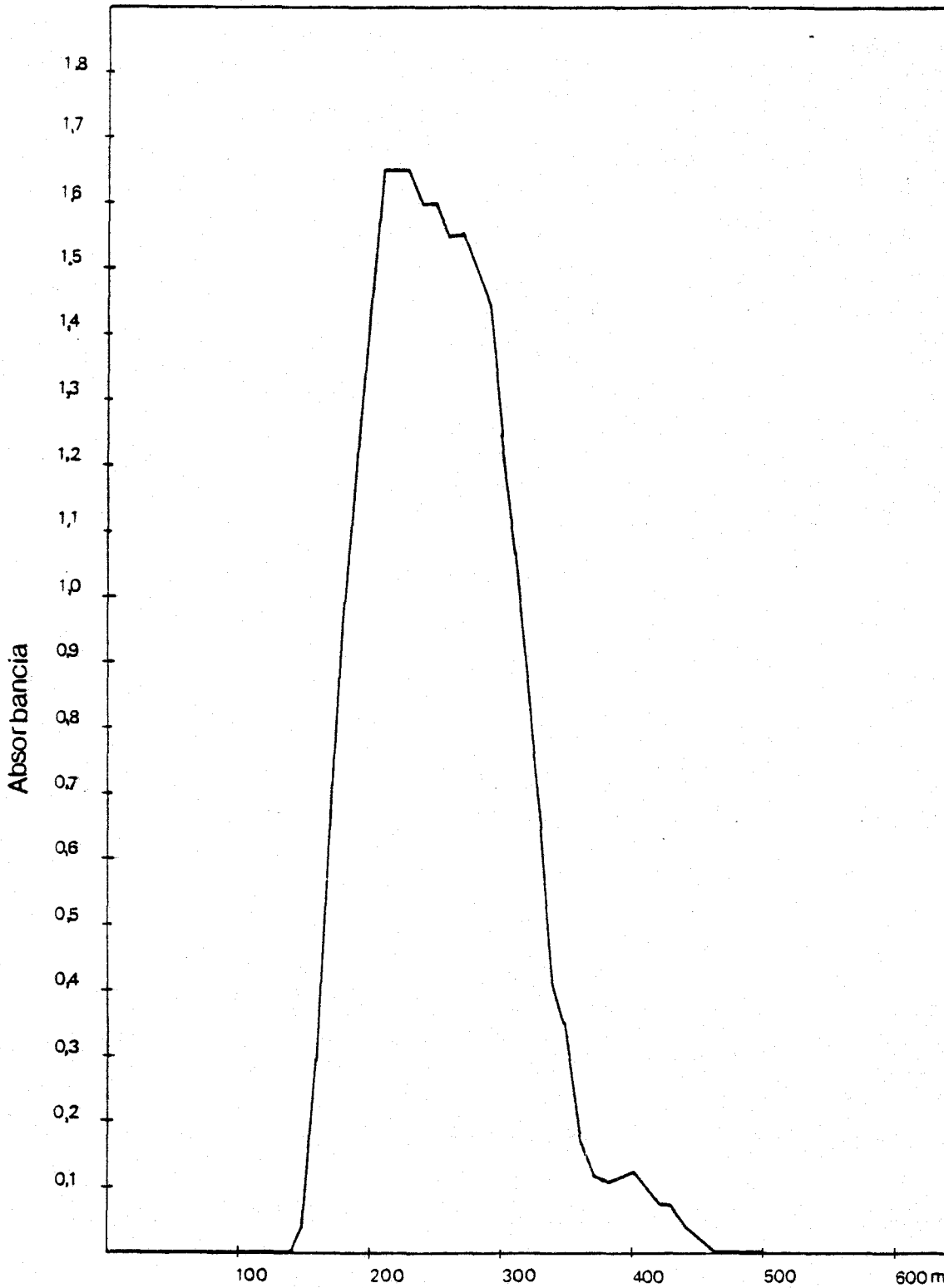


Fig. 36. Diagrama de elución de la fracción B-6, sobre Sephacryl S-300.

V_{e1} = 220 ml K_{d1} = 0,22

V_{e2} = 250 ml K_{d2} = 0,35

V_{e3} = 270 ml K_{d3} = 0,43

4.6.2. Peso molecular medio de la fracción B-6.

El procedimiento seguido es el descrito en el apartado 3.5. Se usa una columna de Sephacryl S-300 de 53 cm de altura por 1,2 cm de diámetro interno que presenta un V_o = 17 ml y V_i = 27,3. La fracción B-6 (4 mg) se disuelve en NaCl 0,5M (5 ml) y se toman 0,2 ml para la elución. El disolvente utilizado es NaCl 0,5M a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se recogen fracciones de 1,4 ml.

Los valores de las absorbancias que corresponden a estas fracciones se incluyen en la tabla XXXV y se representan en la figura 37.

Los valores de V_e y K_d, así como los pesos moleculares calculados para cada pico mediante la recta de calibrado de la figura 18, se recogen en la tabla XXXVI.

Tabla XXXV

Determinación del peso molecular de la fracción B-6. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-11	0,000	17	0,090	23	0,065
12	0,057	18	0,100	24	0,025
13	0,070	19	0,088	25	0,030
14	0,078	20	0,075	26	0,005
15	0,090	21	0,067	27-31	0,000
16	0,100	22	0,070		

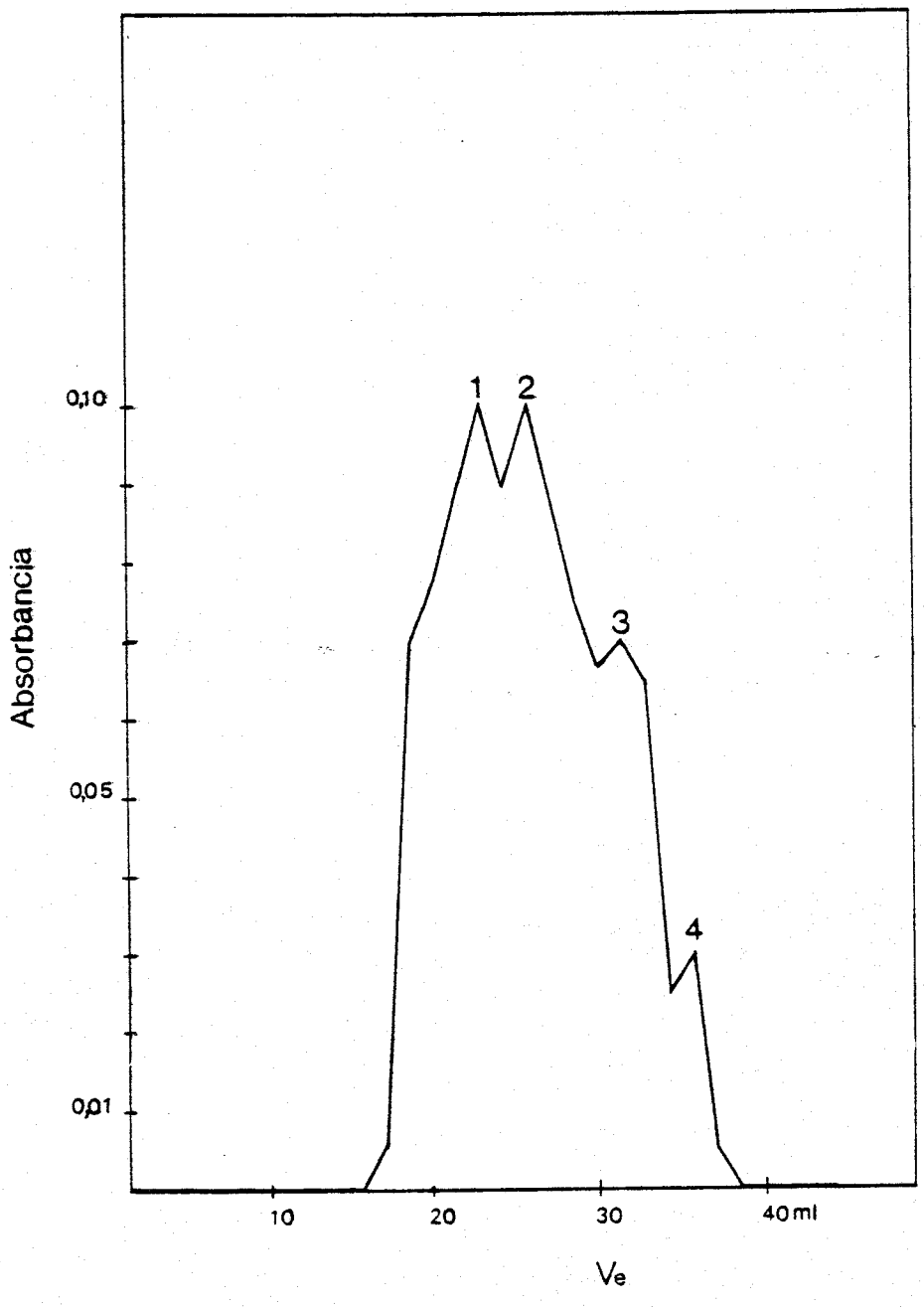


Fig. 37. Determinación del peso molecular de la fracción B-6. Diagrama de elución - sobre Sephacryl S-300.

Tabla XXXVI

Determinación del peso molecular de la fracción B-6. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares de los distintos picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	23	0,22	95000
2	26	0,33	32000
3	30	0,53	4500
4	35,7	0,68	1100

Aplicando la fórmula que permite calcular el peso molecular medio, en función de los pesos moleculares de los picos obtenidos en el diagrama de elución y sus correspondientes áreas (apartado 3.5.2), se calcula que la fracción B-6 tiene un peso molecular medio de 53000.

4.6.3 Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción B-6.

En este apartado se estudia la hidrólisis parcial con ácido sulfúrico de la hemicelulosa B (fracción B-6). Se sigue el curso de esta hidrólisis mediante cromatografía sobre papel y cromatografía de filtración sobre geles porosos. Los diagramas de elución de muestras del hidrolizado tomadas a diversos intervalos de tiempo, junto con la cromatografía de papel de dichos hidrolizados, dan información sobre la rotura preferencial de determinados enlaces y los pesos moleculares de los fragmentos resultantes, lo que permite una aproximación a la estructura del polisacárido.

Se ha seguido una sistemática análoga a la descrita por Churms y Stephen (92,93,128,129).

4.6.3.1. Hidrólisis parcial con H_2SO_4 0,01N y 0,1N.

A la hemicelulosa B (fracción B-6) (100 mg) se le añade H_2SO_4 0,01N (25 ml) y se calienta a ebullición. Se sacan muestras de 2 ml a intervalos de 1, 3, 5, 8, 24 y 48 horas, que se neutralizan con resina aniónica -

IRA-400 OH^- y en la que se determina el poder rotatorio. A continuación, la mitad de cada una de las muestras -- (1 ml) se concentra y se analiza por cromatografía so-- bre papel. La otra mitad (1 ml) se lleva a sequedad, - se le adiciona NaCl 0,5M (1 ml) y se analiza por croma- tografía de filtración sobre Sephacryl S-300.

Después de 48 horas de hidrólisis con H_2SO_4 0,01N, la normalidad del ácido sulfúrico se cambia a 0,1N y se continúa el calentamiento. Se toman muestras a intervalos de 1, 6 y 24 horas, procediéndose de la misma forma que la indicada anteriormente. La cromatografía de filtración se realiza sobre Sephadex G-25,y en este caso - no es necesario diluir con NaCl 0,5M sino con agua.

En el análisis de las muestras del hidrolizado - por cromatografía sobre papel, se emplea la técnica descendente sobre papel Whatman n°3, el n-butanol-acetona--agua (2:7:1) como desarrollador y el nitrato de plata como revelador.

En las cromatografías de filtración sobre gel - se han utilizado dos columnas, una de Sephacryl S-300 y otra de Sephadex G-25.

La columna de Sephacryl S-300 se usa en el aná-

lisis de las muestras procedentes de la hidrólisis con ácido sulfúrico 0,01N. La columna es de 50 cm de altura por 1,2 cm de diámetro interno. V_o = 20 ml y V_i = 26,5 ml. Se introduce en la columna 0,2 ml de muestra y se eluye con NaCl 0,5M, a un flujo de 0,5 ml/min. Se recogen --- fracciones de 1,7 ml y el curso de la cromatografía se sigue mediante la reacción colorimétrica del fenol-ácido sulfúrico. Para la determinación de los pesos moleculares se utiliza la recta de calibrado de la figura 18.

La columna de Sephadex G-25 se usa en el análisis de las muestras procedentes de la hidrólisis con -- H_2SO_4 0,1N.

El Sephadex G-25 es un gel análogo al Sephadex G-50 y G-75, pero con un rango de fraccionamiento de 100 a 5000, con un tamaño de poro de 20 a 80 micras y pro-- porciona 4-6 ml de lecho por gramo de gel seco. Se - prepara una columna de 50 cm de altura por 1,2 cm de -- diámetro interno, que se calibra y comprueba usando Dextrano azul 2000, rafinosa, celobiosa y glucosa. Estas - referencias se eluyen con agua a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se recogen fracciones de 1,7 ml.

Los resultados obtenidos en el calibrado se dan en la tabla siguiente:

Referencia	V_e (ml)	Peso molecular
Dextrano azul	21,7	2×10^6
Rafinosa	35	504
Celobiosa	36,7	342
Glucosa	40	180

Representando los volúmenes de elución frente al logaritmo del peso molecular, se obtiene la recta de calibrado de la figura 38.

Los diagramas de elución de los hidrolizados de la hemicelulosa B (fracción B-6) con H_2SO_4 0,01N para distintos tiempos de hidrólisis se representan en las figuras 39-44. Estos diagramas permiten determinar, con la ayuda de la recta de calibrado de la figura 18, el peso molecular de cada uno de los picos, valores que se recogen al pie de cada gráfica.

Las curvas de elución de los hidrolizados de la hemicelulosa B (fracción B-6) con H_2SO_4 0,1N para distintos tiempos de hidrólisis se representan en las figuras 45-47. Al pie de cada gráfica se indican los pesos moleculares de cada pico, calculados según la recta de calibrado de la figura 38.

Los pesos moleculares medios y los poderes rotatorios de los distintos hidrolizados con H_2SO_4 0,01N se recogen en la tabla XXXVII.

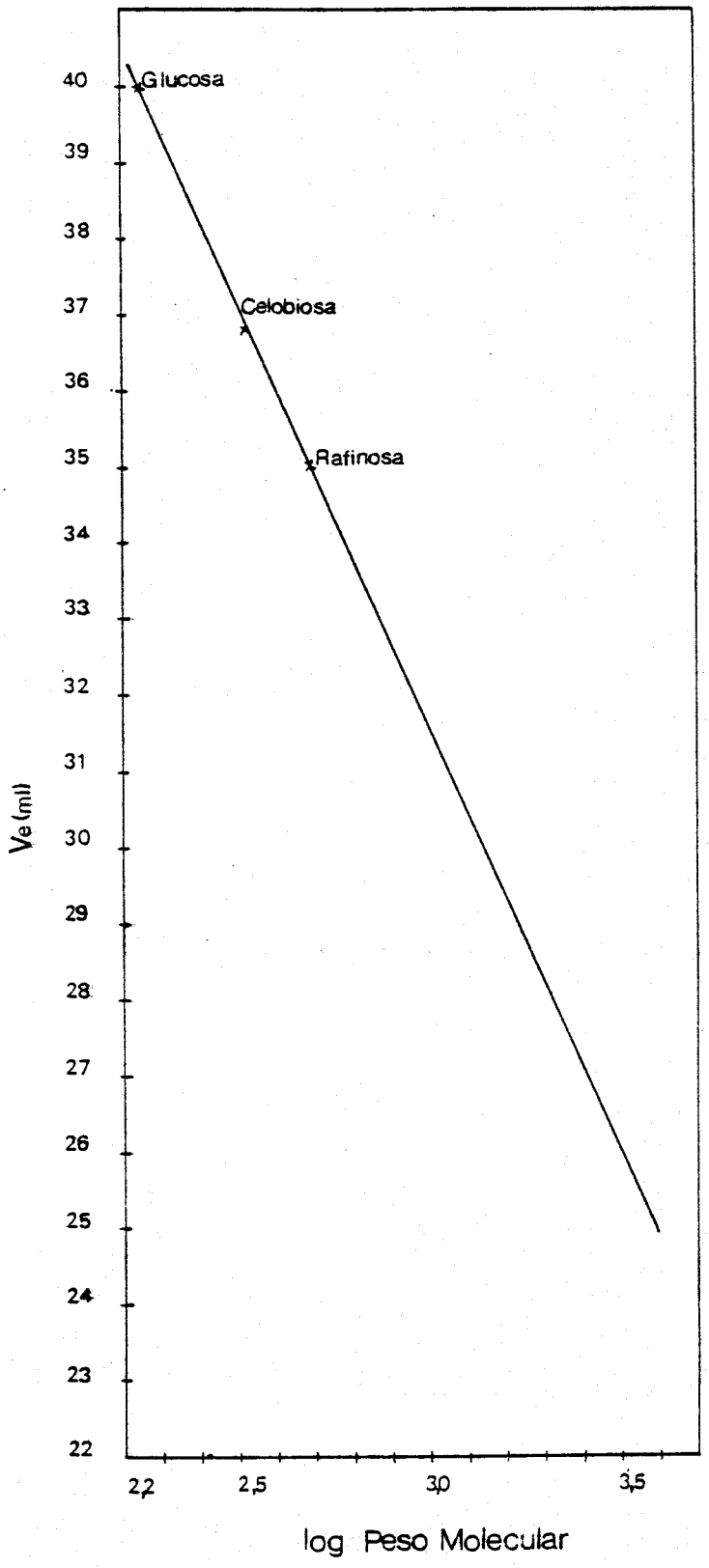


Fig. 38. Recta de calibrado para la determinación de pesos moleculares. Columna de Sephadex G-25.

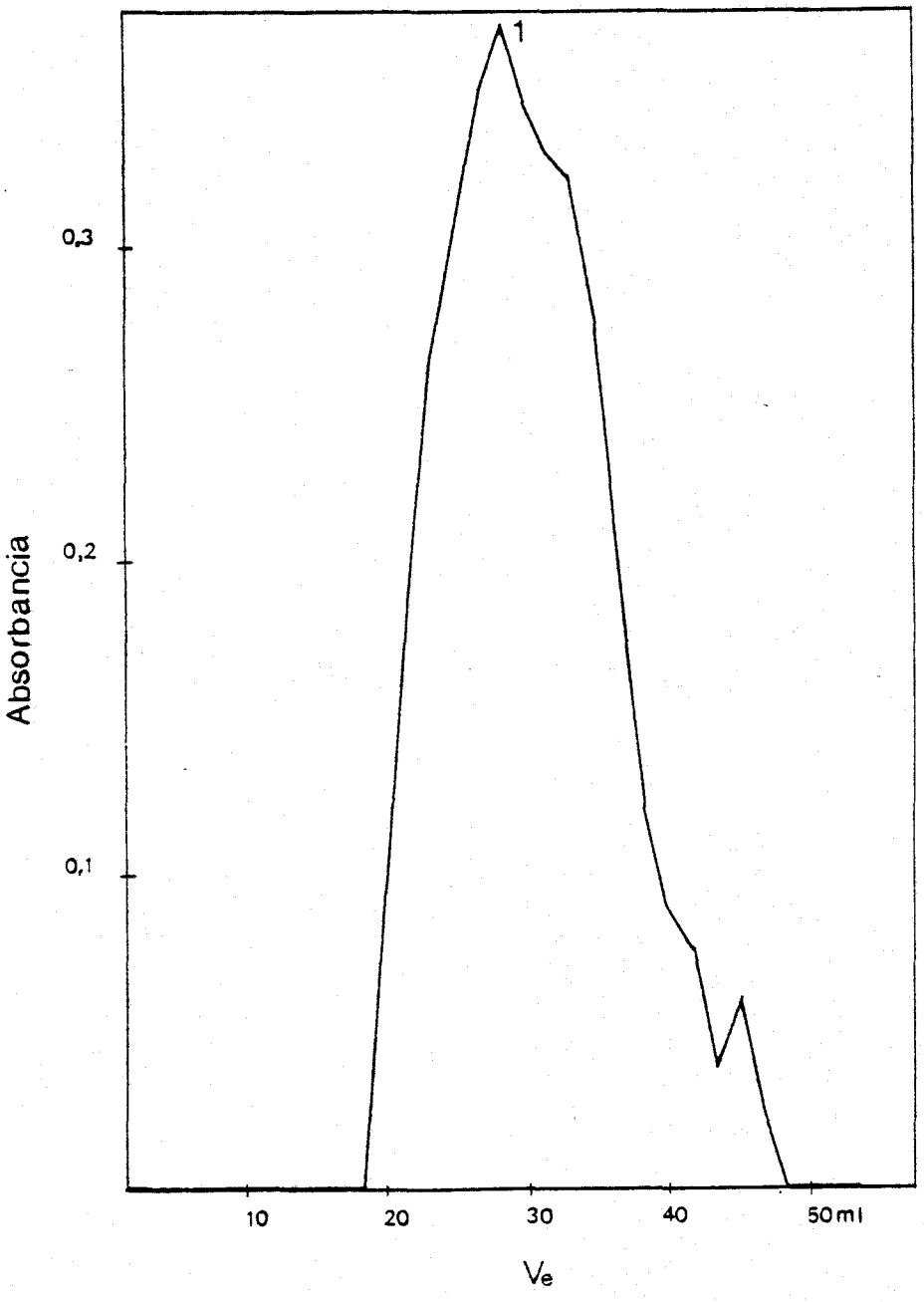


Fig. 39. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. El peso molecular del pico 1 es 40000.

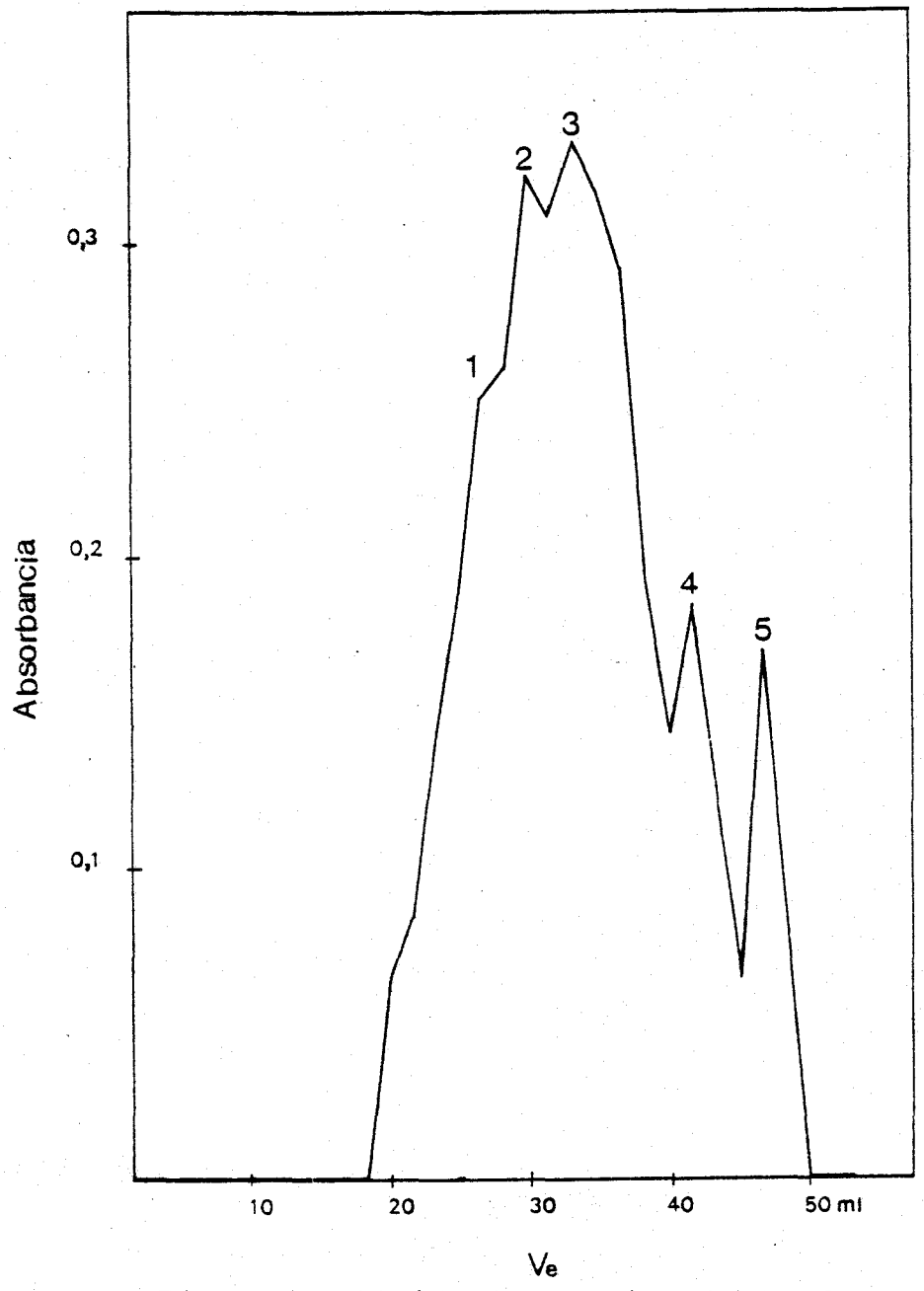


Fig. 40. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 3 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 70000; 2, 21000; 3, 6500; 4, <1000, y 5, < 1000.

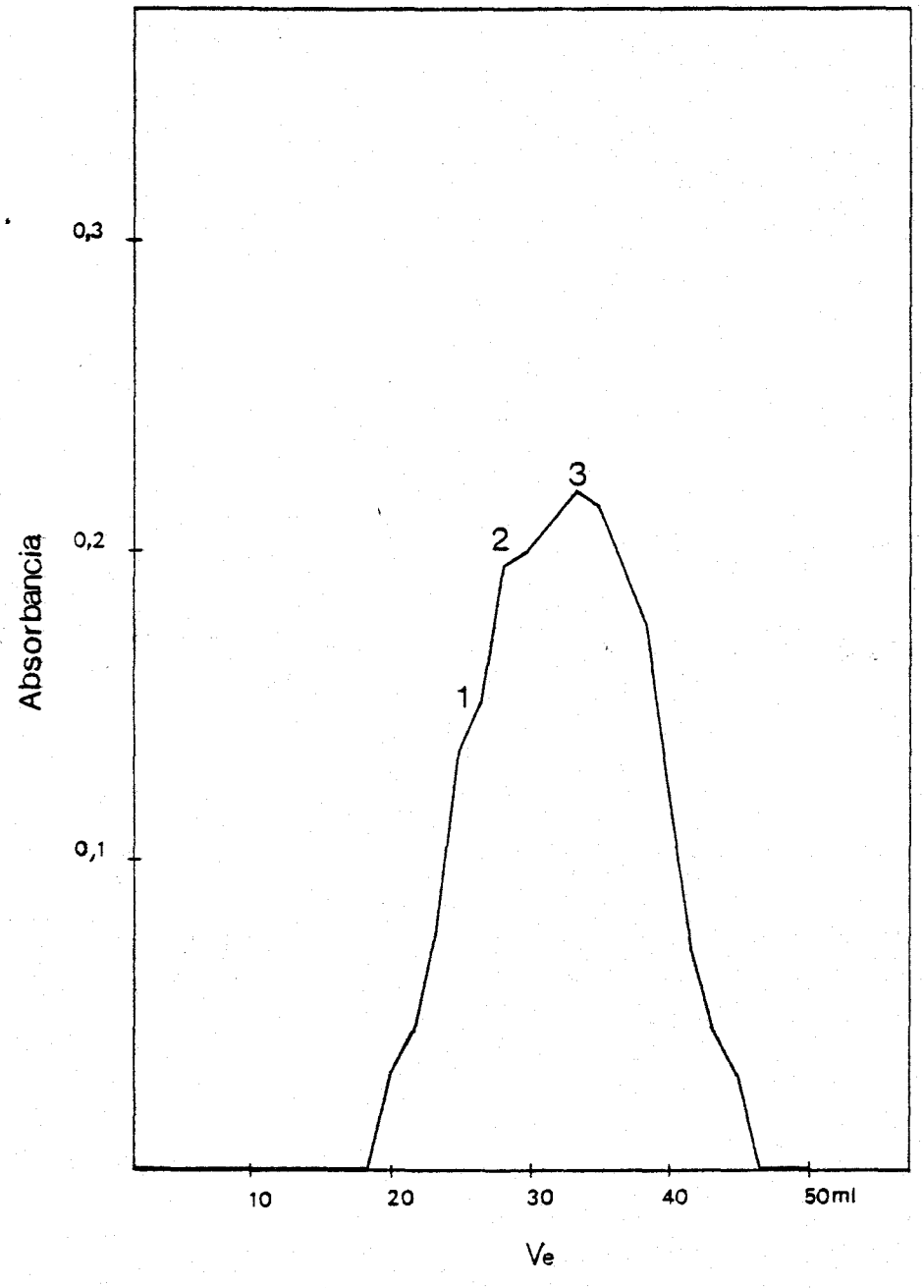


Fig. 41. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 5 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 70000; 2, 21000 y 3, 6500.

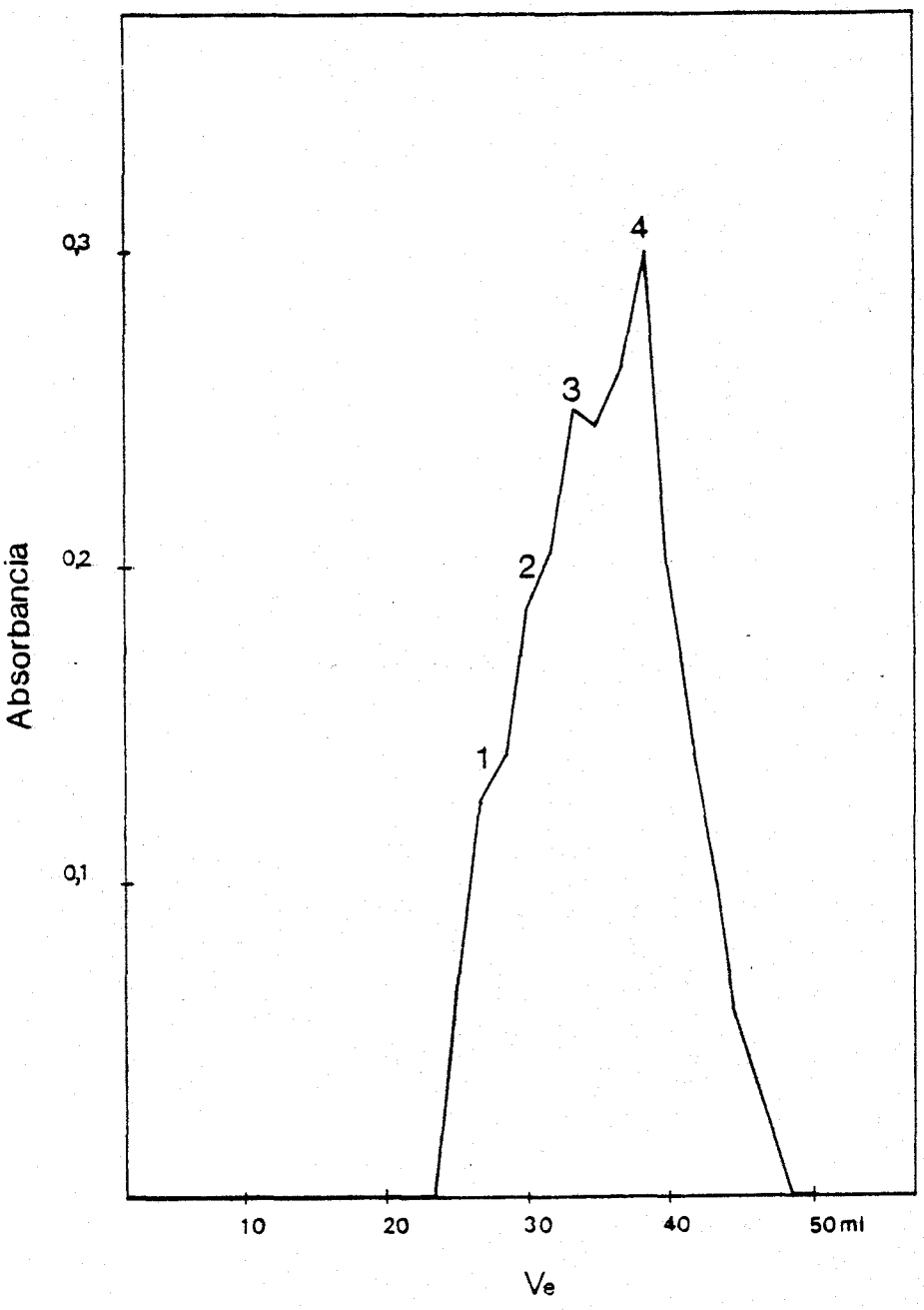


Fig 42. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 8 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 70000; 2, 21000; 3, 6500 y 4, -<1000.

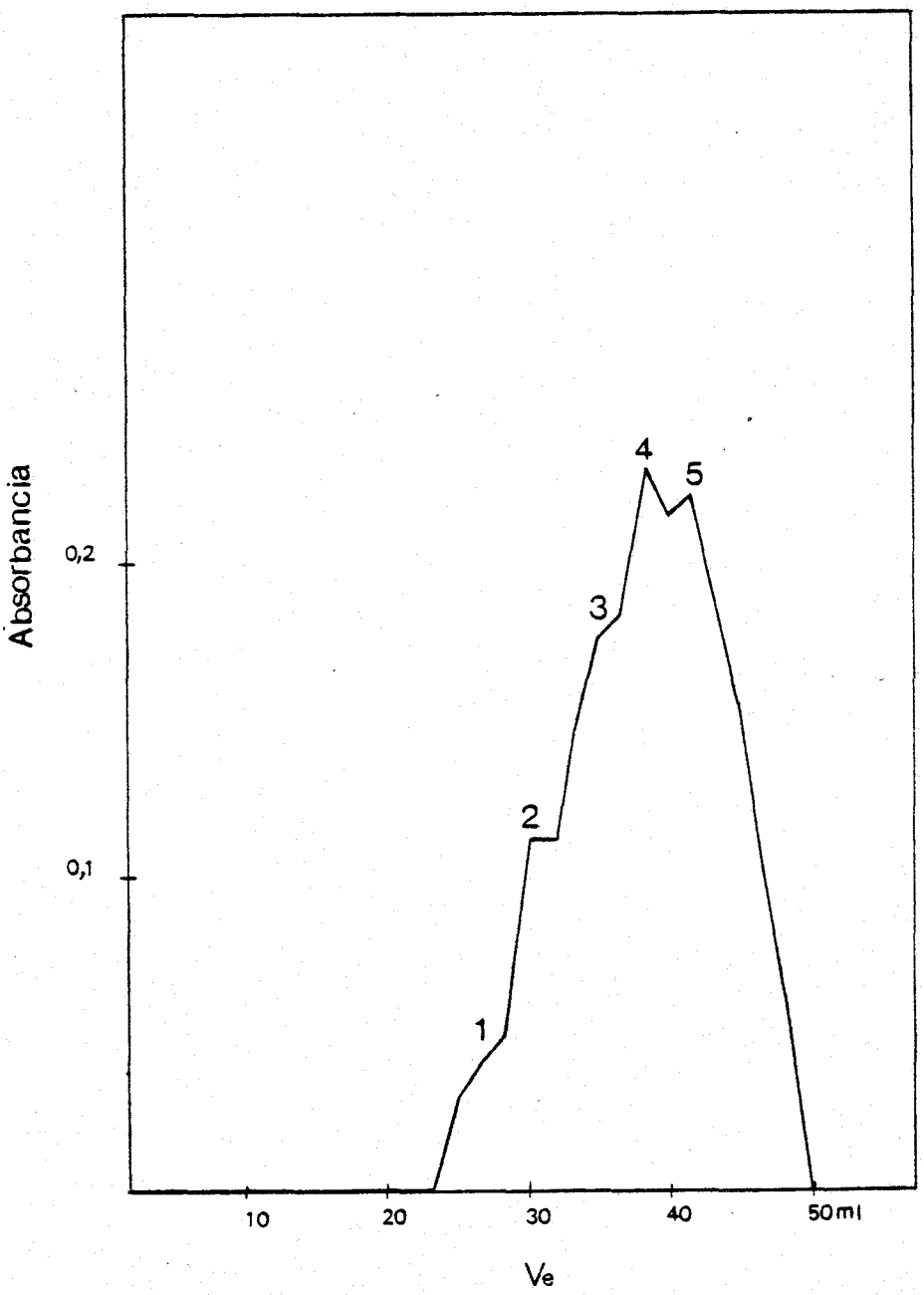


Fig. 43: Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 70000; 2, 21000; 3, 6500; 4, --<1000 y 5, <1000.

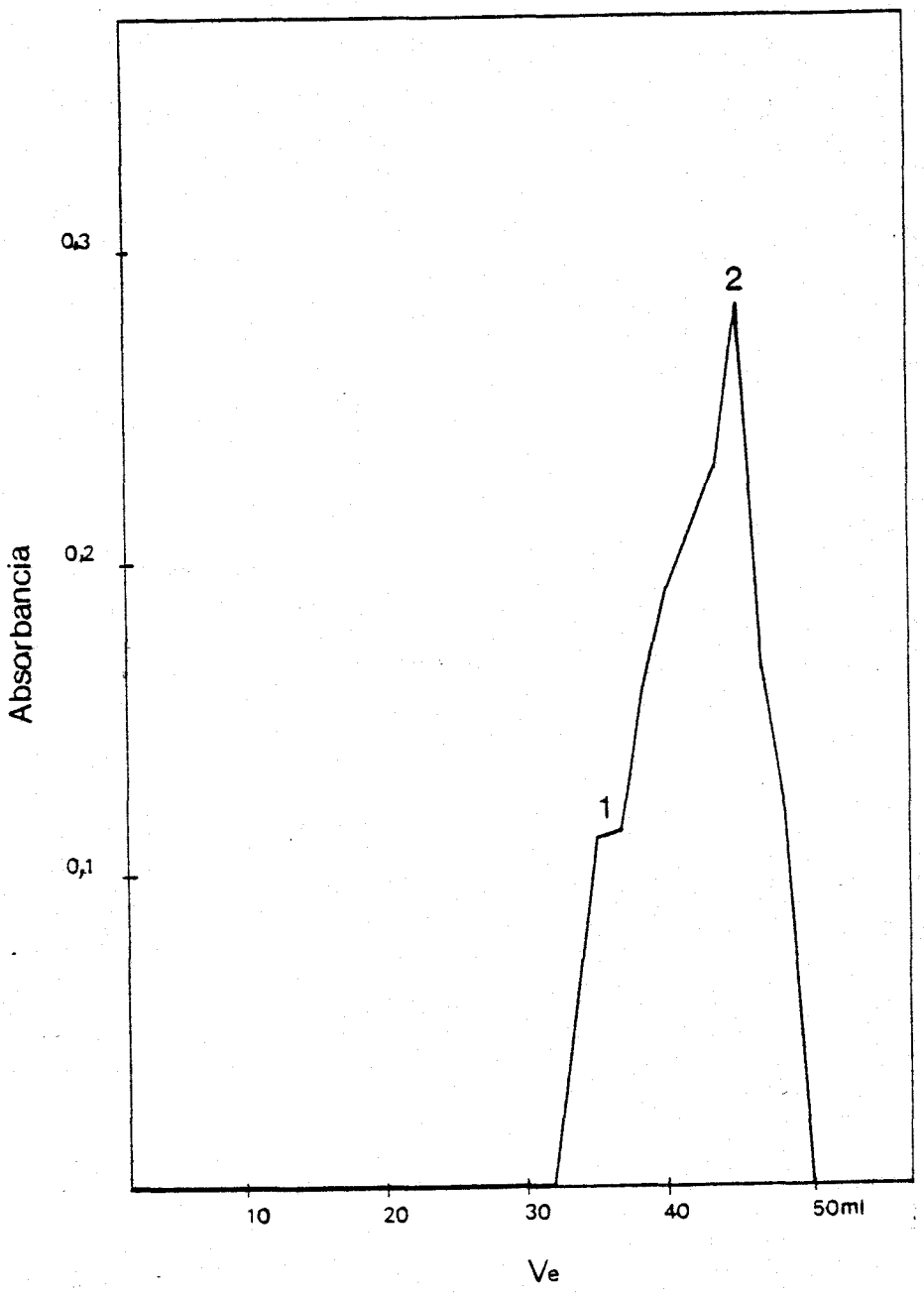


Fig. 44. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 48 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 6500 y 2, <1000.

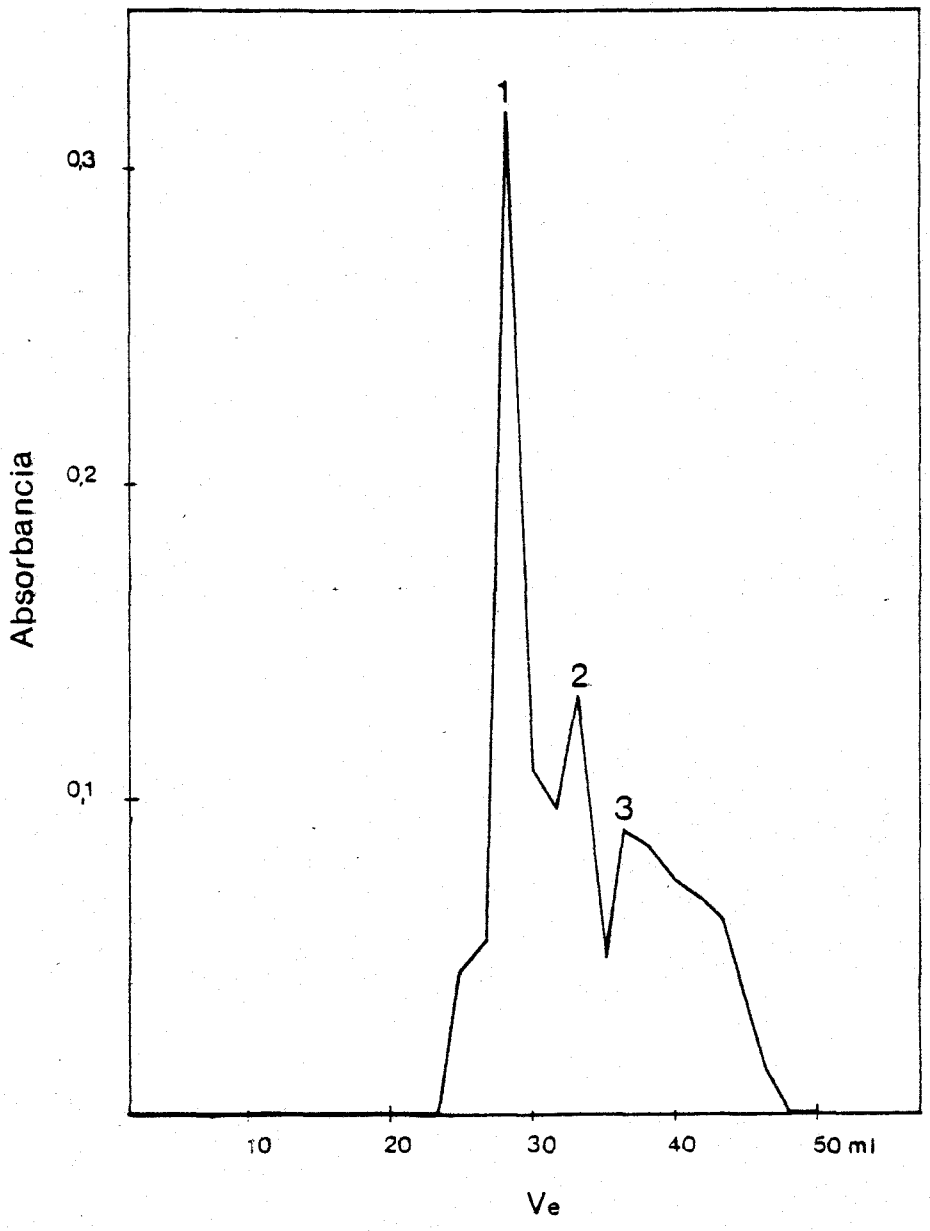


Fig. 45. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 1925; 2, 708 y 3, 342.

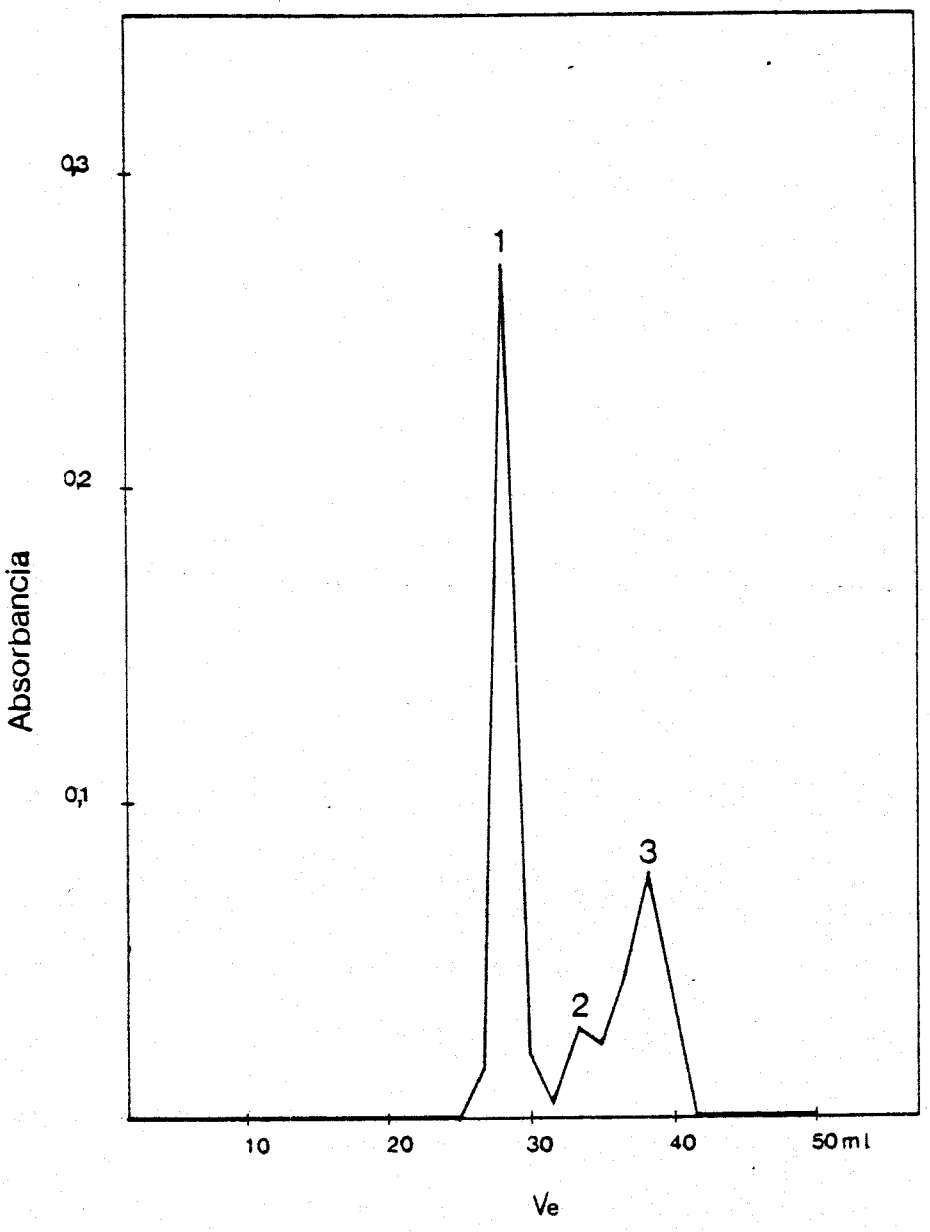


Fig. 46. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 6 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, -- 1995; 2, 708 y 3, 180.

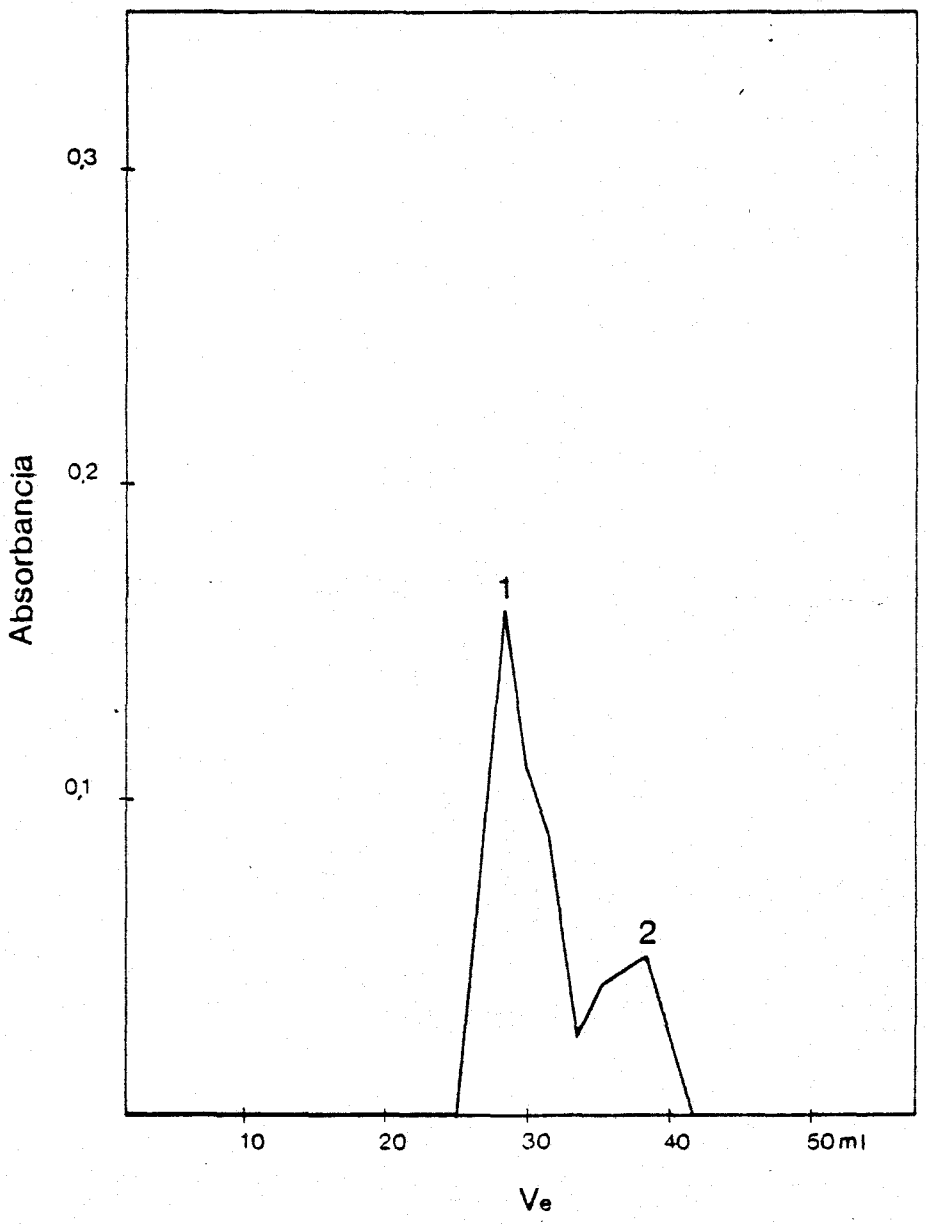


Fig. 47. Hidrólisis parcial de la fracción B-6, con H_2SO_4 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1,-1995 y 2, 180.

Tabla XXXVII

Hidrólisis parcial de la fracción B-6 con H_2SO_4 0,01N.

Tiempo de hidrólisis(h)	$(\alpha)_D^{30}$	Peso molecular medio
0	+21°	53000
1	+37,5°	40000
3	+30°	23800
5	+17,5°	20000
8	+27,5°	12900
24	+12,5°	8500
48	+ 7,5°	2900

4.6.3.2.Interpretación de los resultados.

Después de 1 hora de hidrólisis se detectan en la cromatografía sobre papel arabinosa y xilosa. El diagrama de elución es similar al del polisacárido de partida.

El peso molecular medio es de 40000, valor que coincide con el obtenido al restar del peso molecular medio del polisacárido de partida (53000) la cantidad de arabinosa y xilosa perdida en la hidrólisis (23% según la determinación cuantitativa).

Después de 3 horas de hidrólisis los picos en el diagrama de elución aparecen mejor resueltos. El pico 1 tiene un peso molecular de 70000 y el pico 2 tiene un peso molecular de 21000. La relación entre ellos es de 3:1, que es aproximadamente la misma que guardan los picos que constituyen el polisacárido nativo (95000 y 32000). Además existe una relación entre ambos pares de picos. El de peso molecular 70000 se corresponde aproximadamente con el de 95000 si a éste se le resta el porcentaje de pentosas hidrolizadas. Análogamente sucede entre el de 32000 y 21000. Por otra parte, aparece un pico importante con un peso molecular de 6500, que debe corresponder a un fragmento relativamente estable, ya que se encuentra en hidrolizados posteriores.

Para un tiempo de hidrólisis de 5 horas, la situación es similar a la anterior con un descenso de los picos de pesos moleculares 70000 y 21000 y un aumento relativo del pico de peso molecular 6500.

Cuando la hidrólisis alcanza 8 horas se produce un cambio en el diagrama de elución y en la cromatografía sobre papel. Aparece un pico de peso molecular bajo y se detecta galactosa en la cromatografía.

Cuando se cumplen 24 horas de hidrólisis la situación es análoga a la anterior, pero los picos de pe-

sos moleculares altos son cada vez menos importantes, - mientras que los que corresponden a fragmentos pequeños aumentan considerablemente.

Después de 48 horas de hidrólisis la situación - cambia totalmente. Han desaparecido los picos de pesos moleculares altos quedando tan sólo el de 6500 y se observa que el pico más importante corresponde ya a pesos moleculares muy bajos. Es en este momento cuando se detecta glucosa en la cromatografía de papel.

En la hidrólisis con H_2SO_4 0,1N y su correspon-- diente análisis sobre Sephadex G-25 la situación es -- análoga en los tres hidrolizados analizados. Nos mues-- tra la existencia de un pico de peso molecular 1995, -- que es especialmente resistente a la hidrólisis.

El análisis de los diagramas de elución nos permite deducir las siguientes conclusiones:

La fraccción B-6 tiene restos xilofuranósicos y arabinofuranósicos, que se hidrolizan en condiciones -- muy suaves.

La formación repetida de un fragmento de peso molecular 6500 indica su estabilidad e importancia en relación con la estructura básica del polisacárido. La --

disminución de este pico y la detección simultánea de - galactosa y glucosa en los hidrolizados indican que estos dos monosacáridos forman parte de una cadena principal.

La formación de otro fragmento de peso molecular 2000 en hidrólisis más enérgicas señala la posibilidad de aislamiento de otra unidad repetitiva fundamental, - al parecer constituida por glucosa y manosa.

4.6.4. Acetolisis de la hemicelulosa B. Fracción B-6.

La hemicelulosa B (fracción B-6) (100 mg) se suspende en una mezcla (5 ml) de anhídrido acético (12 ml), ácido acético (8 ml) y ácido sulfúrico concentrado(1,5ml) que se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. - El sólido que queda sin disolver se separa por filtración y el filtrado se añade sobre una solución de bi-- carbonato sódico a 0°. A continuación se extrae con cloroformo y se seca sobre sulfato sódico anhidro, El ex-- tracto clorofórmico se concentra a sequedad, se disuelve en metanol absoluto y se desacetila con metóxido sódico. Después de neutralizar con resina IR-120 H^+, se - concentra y se cromatografía sobre papel Whatman n°3.Desarrollado con n-butanol-acetona-agua (2:7:1) y revela

do con nitrato de plata se detectan dos oligosacáridos principales de R_G 0,28 y 0,38. Desarrollado con n-butanol-etanol-agua (2:1:1) se encuentran los valores de -- $R_{Celobiosa}$ 0,93 y 0,99. Desarrollado en n-butanol-piridina-agua (6:4:3) (130)se encuentran los valores de --- $R_{Celobiosa}$ 0,81 y 0,97.

4.6.4.1. Aislamiento e identificación de los oligosacáridos.

El aislamiento se efectúa de forma similar a la descrita en el apartado 4.5.3.4, obteniéndose dos oligosacáridos que denominamos A y B.

Los valores R_G del oligosacárido A y de la celobiosa sobre papel Whatman n°3 en distintos desarrolladores se detallan en la tabla XXXVIII. Estos valores demuestran que el oligosacárido A es celobiosa.

El oligosacárido B tiene $(\alpha)_D^{30}$ -5° y los siguientes valores R_G: 0,63 en n-butanol-etanol-agua (2:1:1); -0,57 en n-butanol-piridina-agua (6:4:3) y 0,20 en n-butanol-acetona-agua (2:7:1). La hidrólisis del oligosacárido B demuestra que está constituido por glucosa y manosa.

Tabla XXXVIII

Valores de R_G del oligosacárido A y de la celobiosa en distintos desarrolladores sobre papel Whatman n°3.

Compuesto	Desarrolladores		
	a	b	c
Celobiosa	0,60	0,73	0,42
Oligosacárido A	0,60	0,72	0,42

Desarrolladores:

a) n-Butanol-etanol-agua (2:1:1).

b) n-Butanol-piridina-agua (6:4:3).

c) n-Butanol-acetona-agua (2:7:1).

Estos resultados nos permiten concluir que la celobiosa y un oligosacárido de glucosa y manosa son unidades estructurales de los polisacáridos que integran la hemicelulosa B (fracción B-6).

5. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "GORDAL". POLISACARIDOS SOLUBLES EN AGUA.

5.1. Aislamiento de los polisacáridos solubles en agua.

5.1.1. Preparación de la pulpa.

Se han usado aceitunas de la variedad "gordal", recogidas el 25 de Octubre de 1976 en olivares de la Provincia de Sevilla.

El fruto deshuesado y triturado (7,3 Kg) se estabiliza con etanol del 80% durante tres horas y media. El resto insoluble se extrae en un extractor Sohxlet sucesivamente con etanol del 80%, hexano y acetona. El sólido (323 g) representa un 4,4% respecto a la pulpa fresca inicial.

5.1.2. Extracción con agua. Fracción C-1.

La pulpa tratada (50 g) se extrae con agua a la

temperatura ambiente durante 90 horas con agitación. Pasado este tiempo se separa el sólido por filtración y el filtrado se concentra a pequeño volumen y se precipita por la adición de cuatro volúmenes de etanol. Se obtiene un precipitado de aspecto gelatinoso (6,2 g) que denominamos fracción C-1. Rendimiento 12,5%.

5.1.3. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos y ácidos urónicos en la fracción C-1.

La fracción C-1 (25 mg) se hidroliza con ácido sulfúrico 1N (5 ml) calentando a ebullición durante 3 horas. Se neutraliza con carbonato de bario y se le añade inositol (2 mg). Se lleva a pH 8,5-9 con KOH 0,1N y se pasa a través de dos columnas de intercambio, una de Amberlita IR-120 H^+ y otra de Amberlita IRA-400 AcO^-. Los azúcares neutros se eluyen con agua y los ácidos urónicos con ácido acético al 10%, de la columna aniónica.

Los monosacáridos se identifican y determinan cuantitativamente por cromatografía gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles. La instrumentación y condiciones cromatográficas son análogas a las indicadas en el apartado 4.3.1, siendo la temperatura de 170º

Los resultados cuantitativos se detallan en la tabla XXXIX y en la figura 48 se representa uno de los cromatogramas obtenidos.

La fracción correspondiente a los ácidos urónicos eluida de la columna IRA-400 AcO^- se lleva a un volumen exacto de 10 ml. Se toman dos muestras alícuotas de 2 y 5 ml que se diluyen a 10 ml. De estas disoluciones se toma 1 ml de cada una de ellas, que denominamos C-1-1 y C-1-2, para la determinación cuantitativa. Ambas muestras, junto con las referencias de ácido galacturónico, se someten a la reacción con carbazol (apartado 3.2.2) y se mide su absorbancia a 530 nm frente al blanco (1 ml de agua sometido a la misma reacción y condiciones).

Con los valores de absorbancia obtenidos para las referencias, que se dan en la tabla XL, se construye la recta de calibrado de la figura 49.

Los resultados obtenidos para las muestras son:

Muestra	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Acido galacturónico (%)
C-1-1	0,124	21,5	4,4
C-1-2	0,307	56,5	4,4

Tabla XXXIX

Análisis cuantitativo de la fracción C-1.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,22	0,88	9,60
Arabinosa	1,51	6,04	65,94
Xilosa	0,13	0,52	5,68
Galactosa	0,43	1,72	18,78
Total	2,29	9,16	100,00

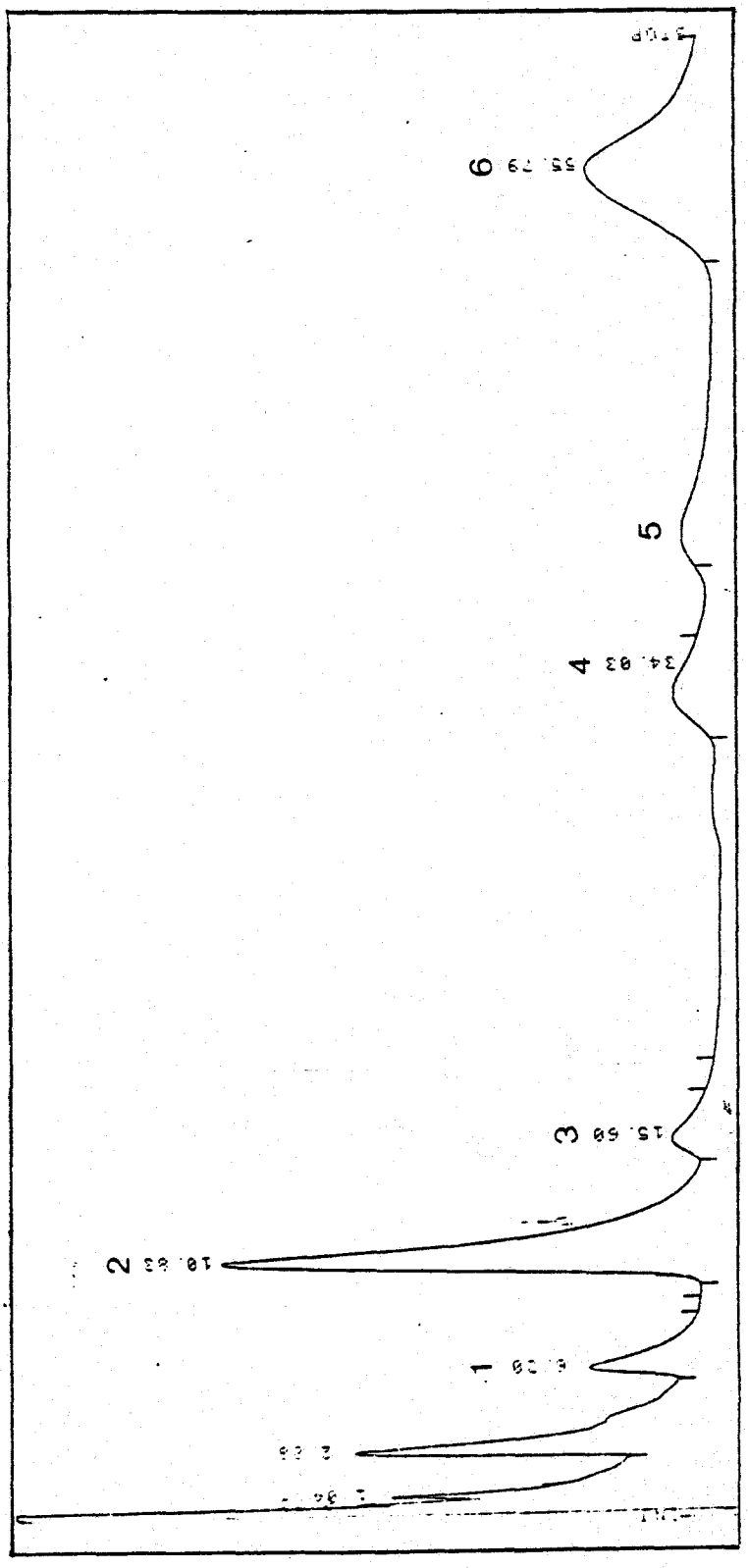


Fig. 48. Cromatografía gas-líquido como acetato de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción C-1. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura 170°.

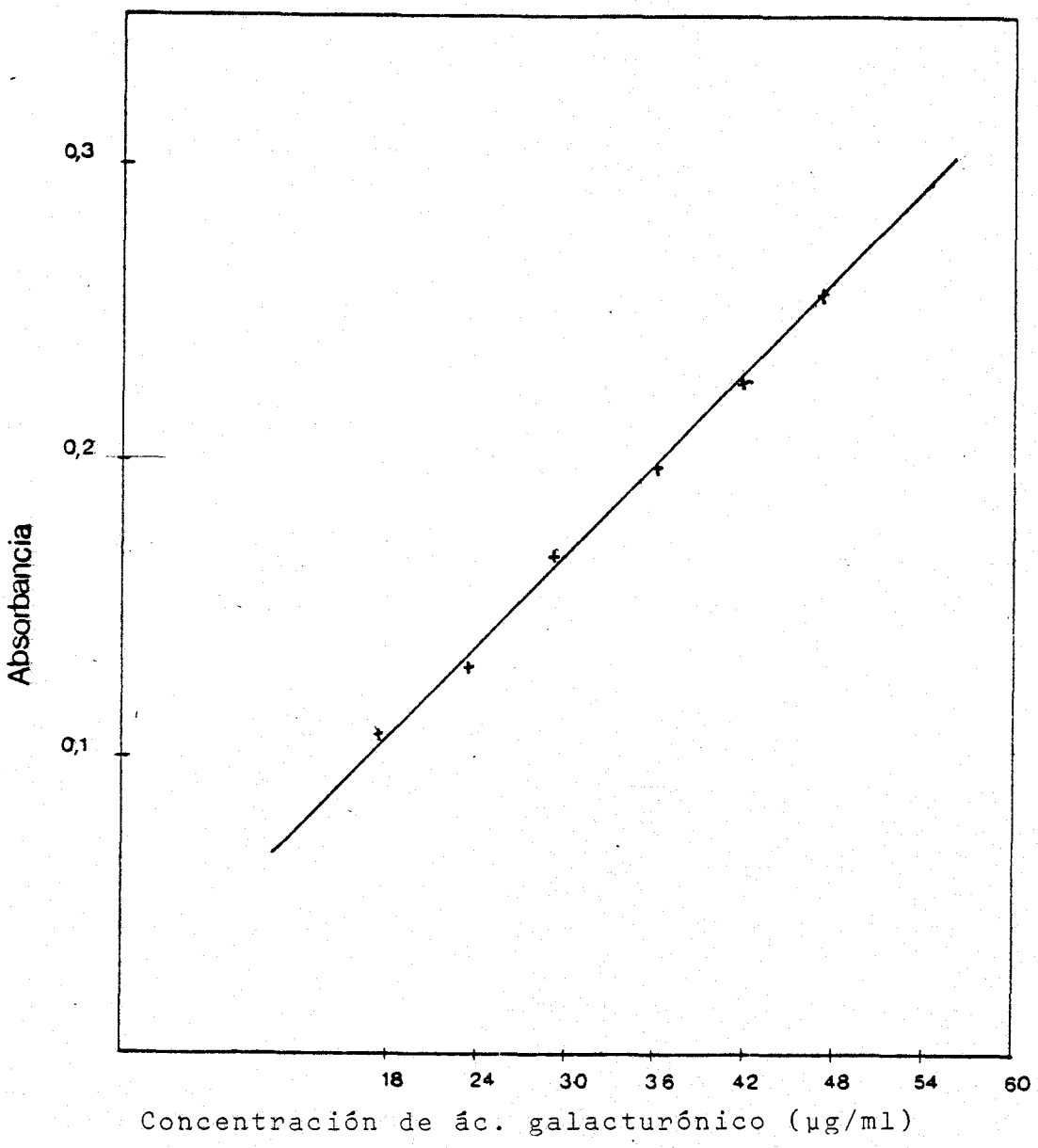


Fig. 49. Recta de calibrado para la determinación cuantitativa de ácido galacturónico por el método del carbazol.

Tabla XL

Concentraciones y absorbancias de las disoluciones de referencia de ácido galacturónico.

Disolución de referencia.	Concentración de ác. galacturónico (µg/ml).	Absorbancia
1	18	0,109
2	24	0,136
3	30	0,175
4	36	0,199
5	42	0,236
6	48	0,260
7	54	0,334

Los resultados demuestran que esta fracción soluble en agua es análoga en su composición a la correspondiente en la variedad "manzanilla".

5.2. Peso molecular medio de la fracción C-1.

El peso molecular de la fracción C-1 se determina por cromatografía de filtración sobre geles porosos siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.4.

Se utiliza una columna de Sephacryl S-300 de -- 53 cm de altura y 1,2 cm de diámetro interno. Los valores del volumen vacío y volumen interno son: V_o = 17 ml y V_i = 27,3 ml. Para la determinación de los pesos moleculares se utiliza la recta de calibrado de esta columna de la figura 18.

La fracción C-1 (4 mg) se disuelve en NaCl 0,5M (5 ml) y se eluye con este mismo disolvente (NaCl 0,5M) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, recogiéndose -- fracciones de 1,4 ml.

Los valores de absorbancia medidos para las fracciones eluidas son los que se dan en la tabla XLI y el diagrama de elución obtenido al representar estos valores frente a los volúmenes de elución se representa en la figura 50.

Los valores de V_e, K_d y los pesos moleculares para cada uno de los picos observados en el diagrama se - dan en la tabla XLII.

Tabla XLI

Determinación del peso molecular de la fracción C-1. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	18	0,190	26	0,080
11	0,030	19	0,220	27	0,070
12	0,045	20	0,160	28	0,025
13	0,083	21	0,222	29	0,060
14	0,085	22	0,165	30	0,035
15	0,125	23	0,200	31-35	0,000
16	0,130	24	0,175		
17	0,170	25	0,110		

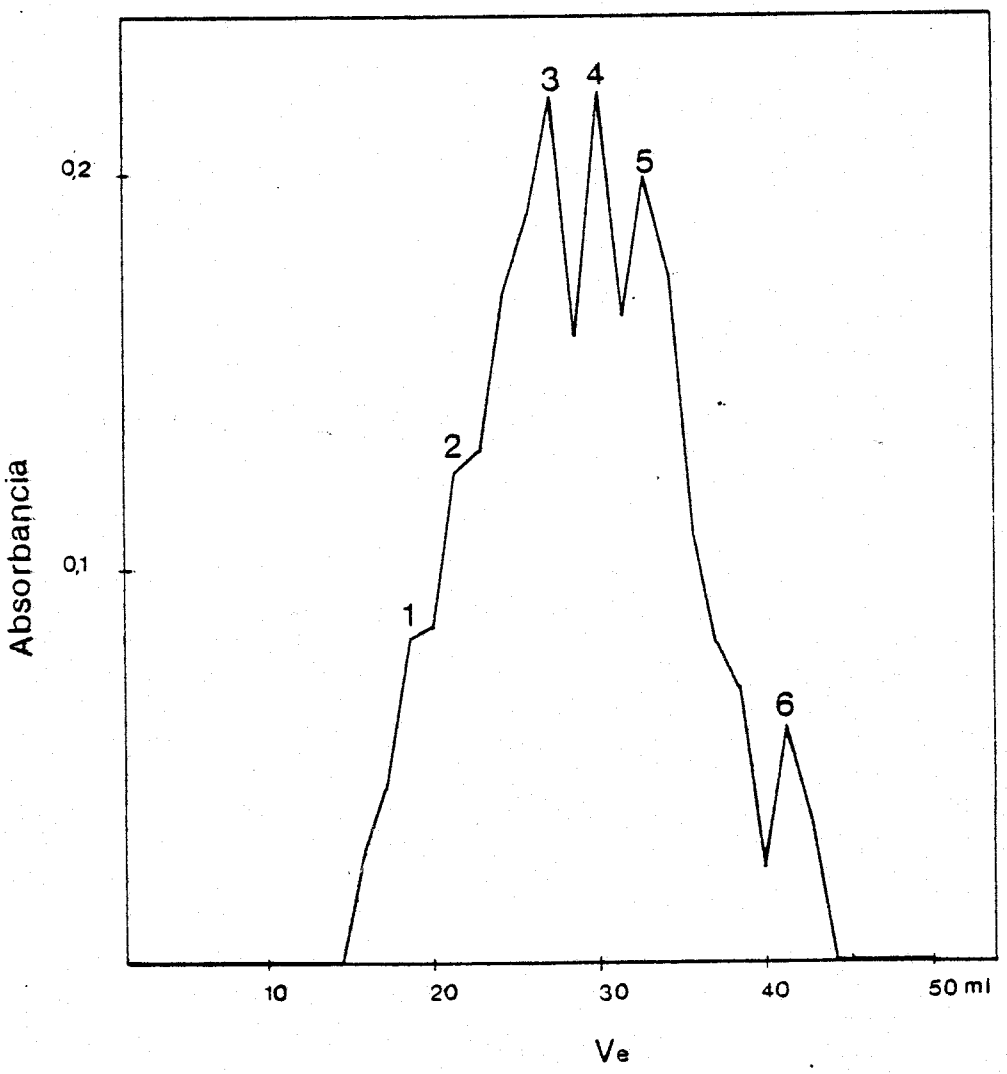


Fig. 50. Determinación del peso molecular de la fracción C-1. Diagrama de elución sobre - Sephacryl S-300.

Tabla XLII

Determinación del peso molecular de la fracción C-1. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares de los distintos picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	18,6	0,06	500000
2	21,4	0,16	165000
3	27	0 37	22000
4	30	0,48	7500
5	33	0,58	2800
6	41,4	0,89	<1000

El peso molecular medio de la fracción C-1 calculado como se detalla en el apartado 3.5.2. es de --- 73000.

6. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "GORDAL". POLISACARIDOS SOLUBLES EN ALCALI.

6.1. Aislamiento de la hemicelulosa B.

La pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "gordal" (50 g) se trata con etanol del 80%, hexano y acetona como se ha descrito en el apartado 5.1.1. El residuo se extrae con agua (apartado 5.1.2) y a continuación, una vez seco, se trata con metóxido sódico en metanol y se vuelve a extraer con agua. El material polisacarídico que queda se extrae con NaOH al 10% (500 ml), libre de carbonatos y en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, a la temperatura ambiente y con agitación. Se separa el sólido por filtración, el extracto se acidifica con ácido acético al 50% y se dializa en corriente continua de agua durante varios días. La disolución dializada se concentra, se vuelve a acidificar con ácido acético al 50% y se obtiene un pequeño precipitado que corresponde a la hemicelulosa A. Este precipitado se separa por filtración y el sobrenadante se precipita por la adición de cuatro volúmenes de etanol del 96%. Se obtiene la hemicelulosa B, que una vez seca pesa 1,5 g. - Rendimiento 3%.

6.2. Fraccionamiento de la hemicelulosa B. Polisacáridos que forman complejos insolubles con sales de Cu (II). Fracción C-2.

La hemicelulosa B procedente del apartado anterior (600 mg) se disuelve en NaOH 1N (60 ml) y se le añade lentamente solución de Fehling. Se obtiene un precipitado gelatinoso de color verde que se separa por centrifugación. El precipitado se descompone con ácido clorhídrico etanólico como se ha descrito en el apartado 4.4., aislándose un sólido pulvurulento de color blanco, que denominamos hemicelulosa B, fracción C-2. Rendimiento, 160 mg (27% respecto a la hemicelulosa B).

6.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos de la hemicelulosa B. Fracción C-2.

La hemicelulosa B (fracción C-2) (15 mg) se hidroliza calentando a ebullición con H_2SO_4 1N durante 3 horas. Después de neutralizar con carbonato de bario se añade inositol (2 mg) y se preparan los correspondientes acetatos de alditoles para la determinación cuantitativa, que se realiza como se ha descrito en el apartado 5.1.3.

En la figura 51 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos y en la tabla XLIII se recogen los resultados cuantitativos.

6.2.2. Peso molecular medio de la hemicelulosa B. Fracción C-2.

La hemicelulosa B (fracción C-2) (4 mg) se disuelve en NaCl 0,5M y se toman 0,2 ml que se cromatografían en una columna de Sephacryl S-300. Las fracciones recogidas se analizan por el método del fenol-ácido sulfúrico (apartado 3.4). Los valores de absorbancia se incluyen en la tabla XLIV y se representan en la figura 52.

Los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares para cada pico, calculados según la recta de calibrado de la figura 18, se incluyen en la tabla XLV.

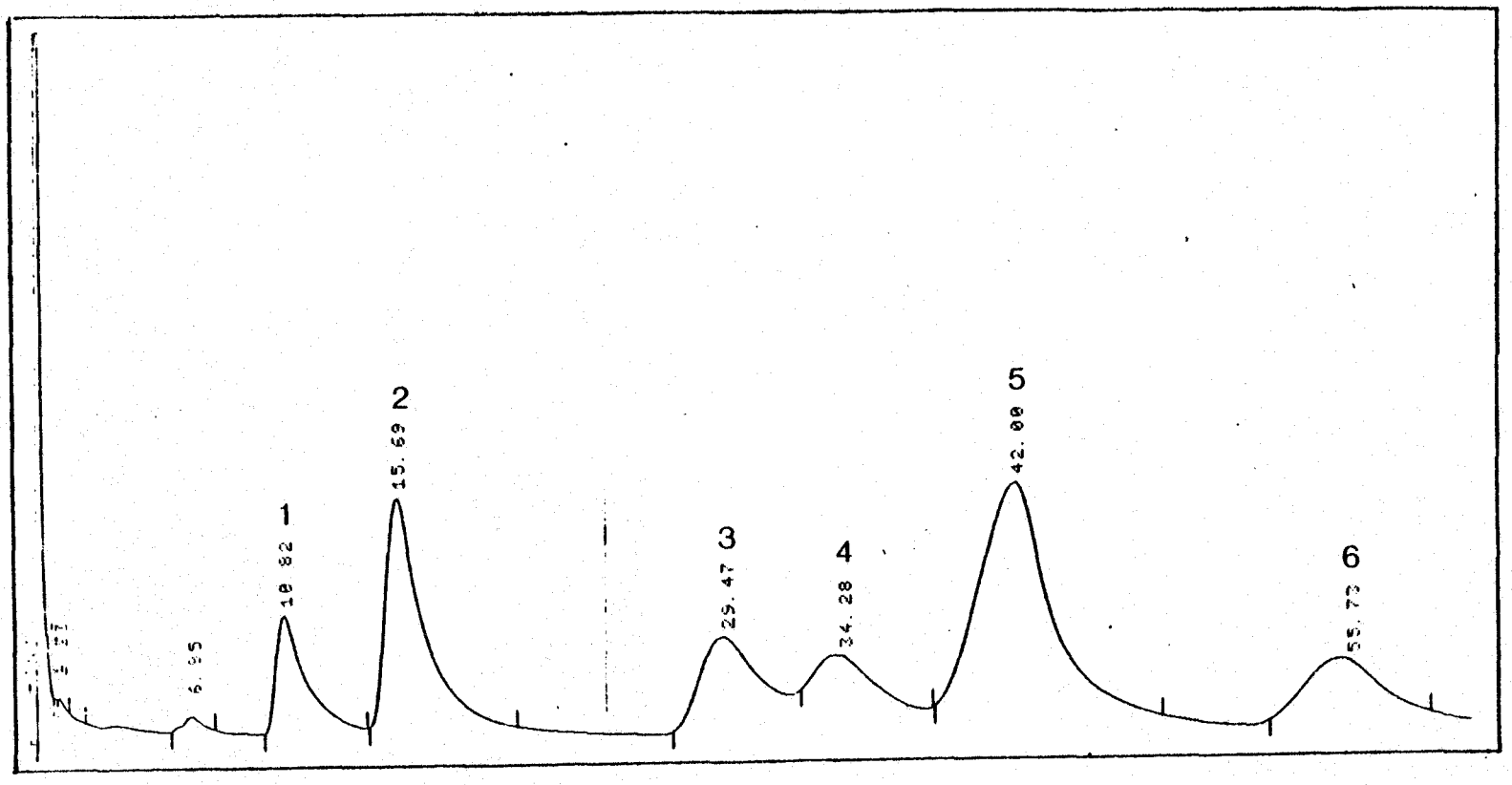


Fig. 51. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción C-2. 1, arabinosa; 2, xilosa; 3, manosa; 4, galactosa; 5, glucosa y 6 inositol (patrón interno). Columna 2m×3mm de ECNSS-M al 3% sobre Gas-Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura 170°.

Tabla XLIII

Análisis cuantitativo de la fracción C-2.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Arabinosa	0,80	5,33	5,60
Xilosa	2,68	17,87	18,75
Manosa	3,34	22,27	23,37
Galactosa	2,41	16,07	16,86
Glucosa	5,06	33,73	35,41
Total	14,29	95,27	99,99

Tabla XLIV

Determinación del peso molecular de la fracción C-2. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	16	0,397	22	0,192
11	0,009	17	0,339	23	0,153
12	0,218	18	0,272	24	0,102
13	0,805	19	0,244	25	0,082
14	0,584	20	0,202	26	0,003
15	0,470	21	0,198	27-32	0,000

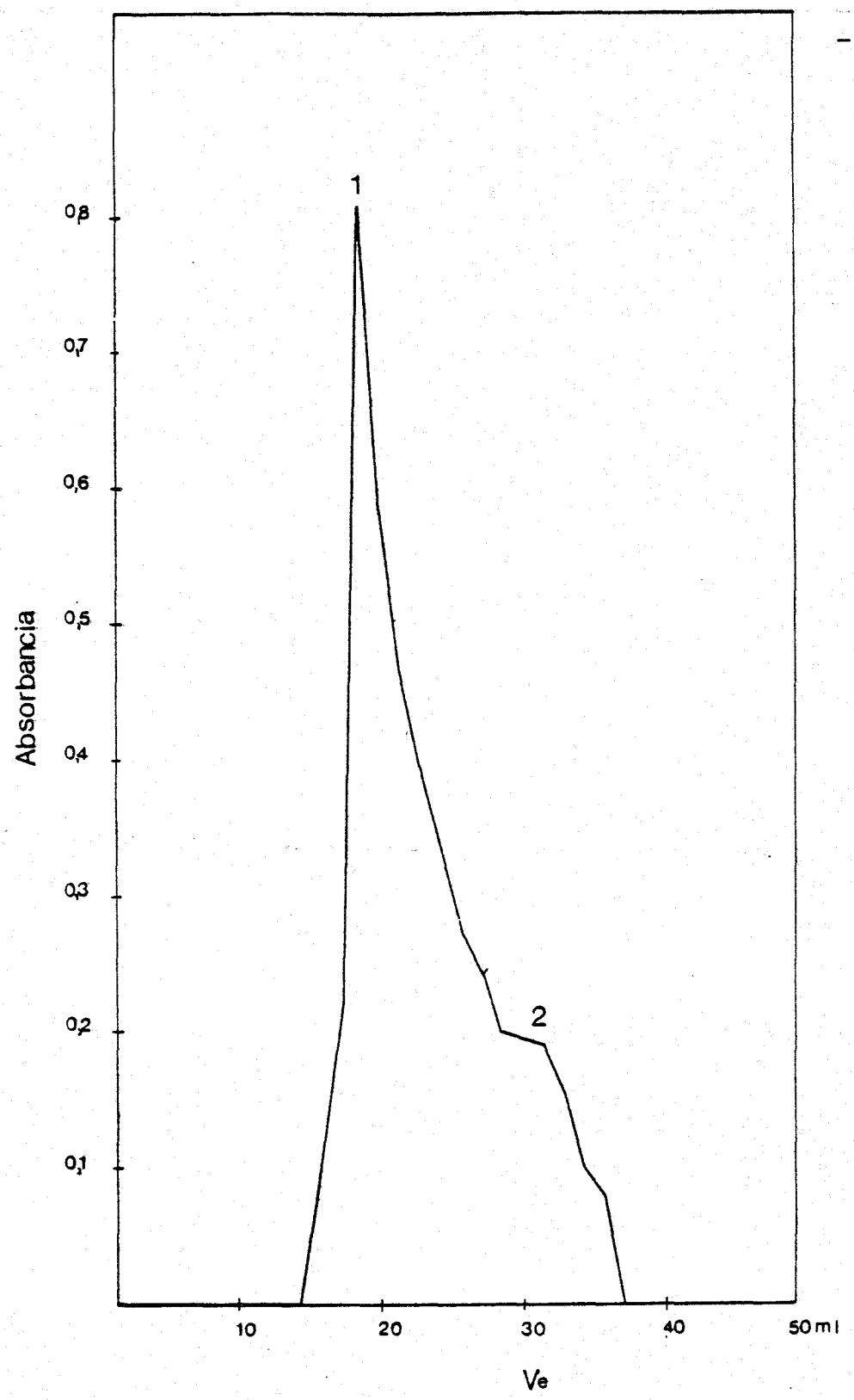


Fig. 52. Determinación del peso molecular de la fracción C-2. Diagrama de elución - sobre Sephacryl S-300.

Tabla XLV

Determinación del peso molecular de la fracción C-2. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares de los distintos picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	18,6	0,06	500000
2	30	0,48	7000

El peso molecular medio calculado para esta fracción es de 420000.

6.2.3. Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción C-2.

Se realiza un estudio similar al descrito en el apartado 4.6.3.1. La hemicelulosa B (fracción C-2) --- (100 mg) se hidroliza con ácido trifluoroacético 0,01N (25 ml) calentando en baño de agua a 100°. Se toman - muestras del hidrolizado a intervalos de tiempo de 1; 3; 5; 8; 24 y 48 horas. En cada muestra se determina - el poder rotatorio y se elimina el ácido trifluoroacético por evaporación. El residuo se disuelve en agua - (2 ml) y se toman dos fracciones de 1 ml cada una. Una de las fracciones se utiliza para el control por cromatografía de papel y la otra se concentra a sequedad y se disuelve en NaCl 0,5M (1 ml). Partes alícuotas de - 0,2 ml se destinan a estudiar el comportamiento en la cromatografía de filtración sobre Sephacryl S-300.

Después de las 48 horas de hidrólisis con ácido trifluoroacético 0,01N se cambia la normalidad del -- ácido hasta 0,1N. Se continúa el calentamiento y se toman muestras a intervalos de 1; 6 y 24 horas y se procede de forma similar. La cromatografía de filtración se lleva a cabo sobre Sephadex G-25.

En las cromatografías sobre papel se usa el papel Whatman n°3, n-butanol-acetona-agua (2:7:1) como -

desarrollador y nitrato de plata como revelador.

La cromatografía de filtración sobre Sephacryl - S-300 se realiza en una columna de 52×1,2 cm. V_o = 20ml y V_i = 26,6 ml. Se eluye con NaCl 0,5M a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se recogen fracciones de 1,7 ml que se analizan por el método del fenol-ácido sulfúrico.

La columna de Sephadex G-25, que tiene unas dimensiones de 50×1,2 cm, se eluye con agua a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se recogen fracciones de - 1,7 ml.

Para el cálculo de los pesos moleculares en ambas columnas se utilizan las rectas de las figuras 18 y 38.

Los diagramas de elución de los hidrolizados de la hemicelulosa B (fracción C-2) con ácido trifluoroacético 0,01N para distintos tiempos de hidrólisis se representan en las figuras 53-58. Al pie de cada gráfica se indican los pesos moleculares de cada pico, calculados según la recta de calibrado de la figura 18.

Los diagramas de elución de los hidrolizados de la hemicelulosa B (fracción C-2) con ácido trifluoroacético 0,1N para distintos tiempos de hidrólisis, se representan en las figuras 59-61. Estos diagramas per-

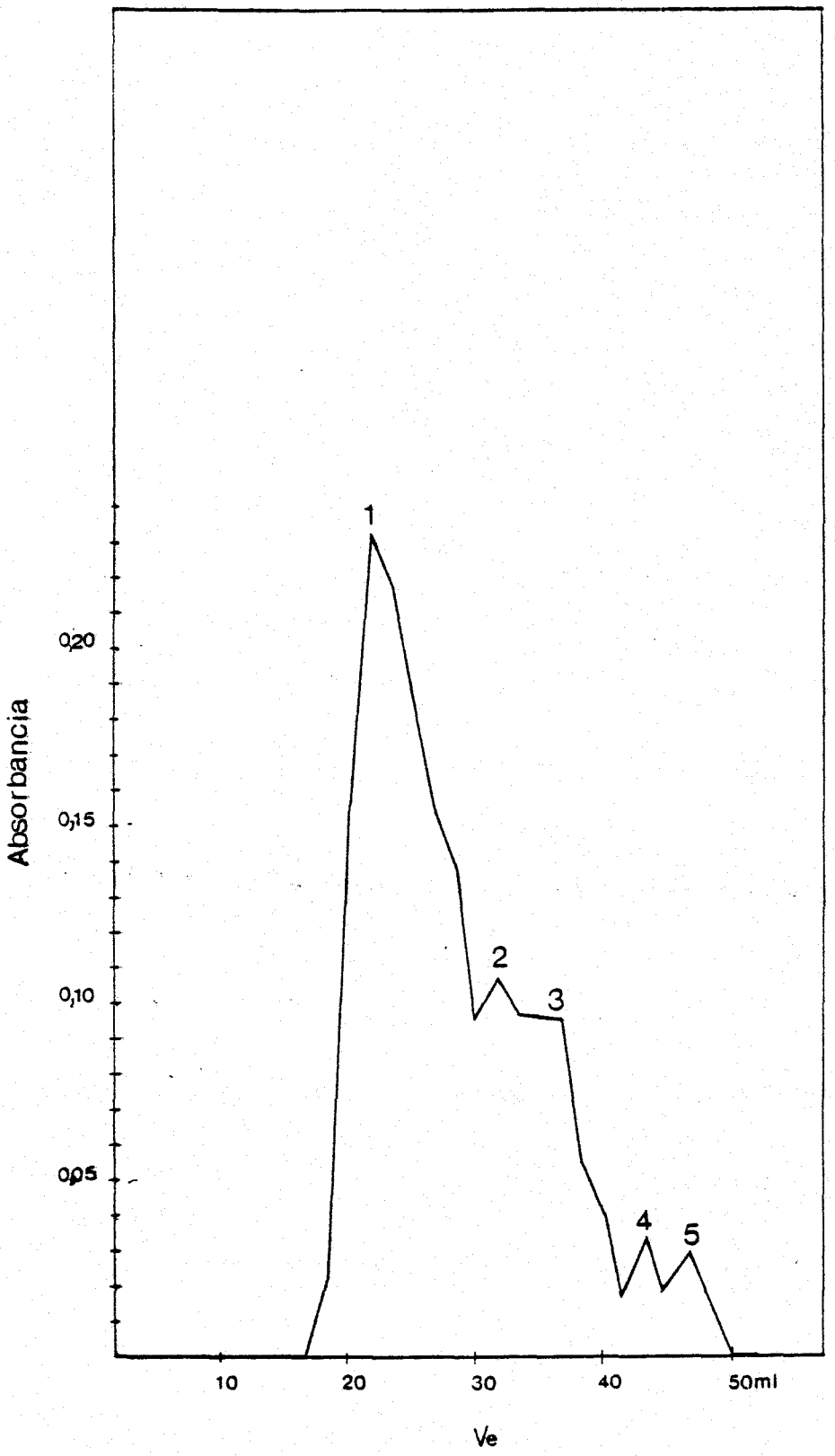


Fig. 53. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 500000; 2, 11000; 3, 3400; 4, <1000 y 5, <1000.

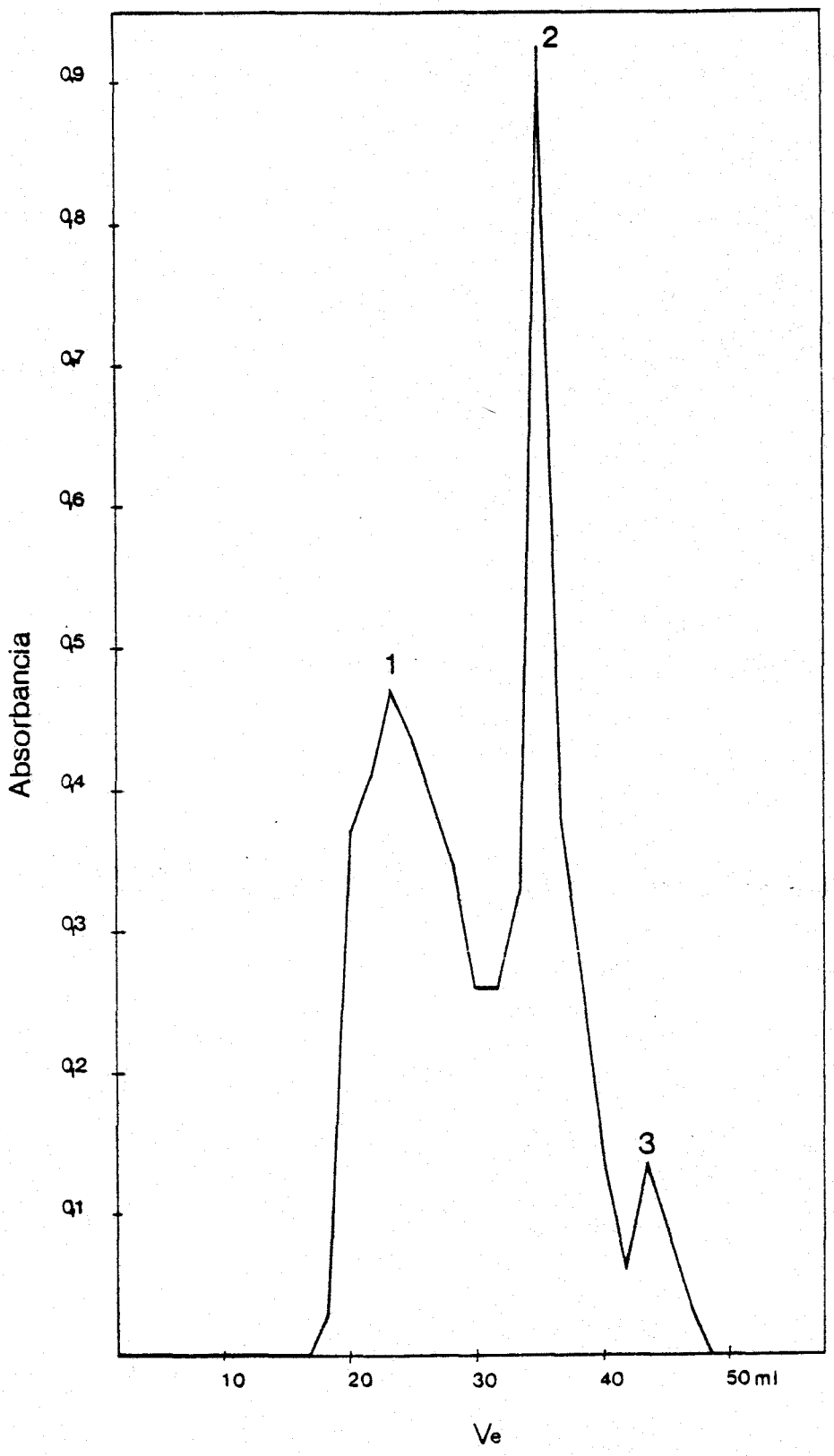


Fig. 54. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a -- 100°. Tiempo de hidrólisis, 3 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 240000; 2, 3400 y 3, <1000.

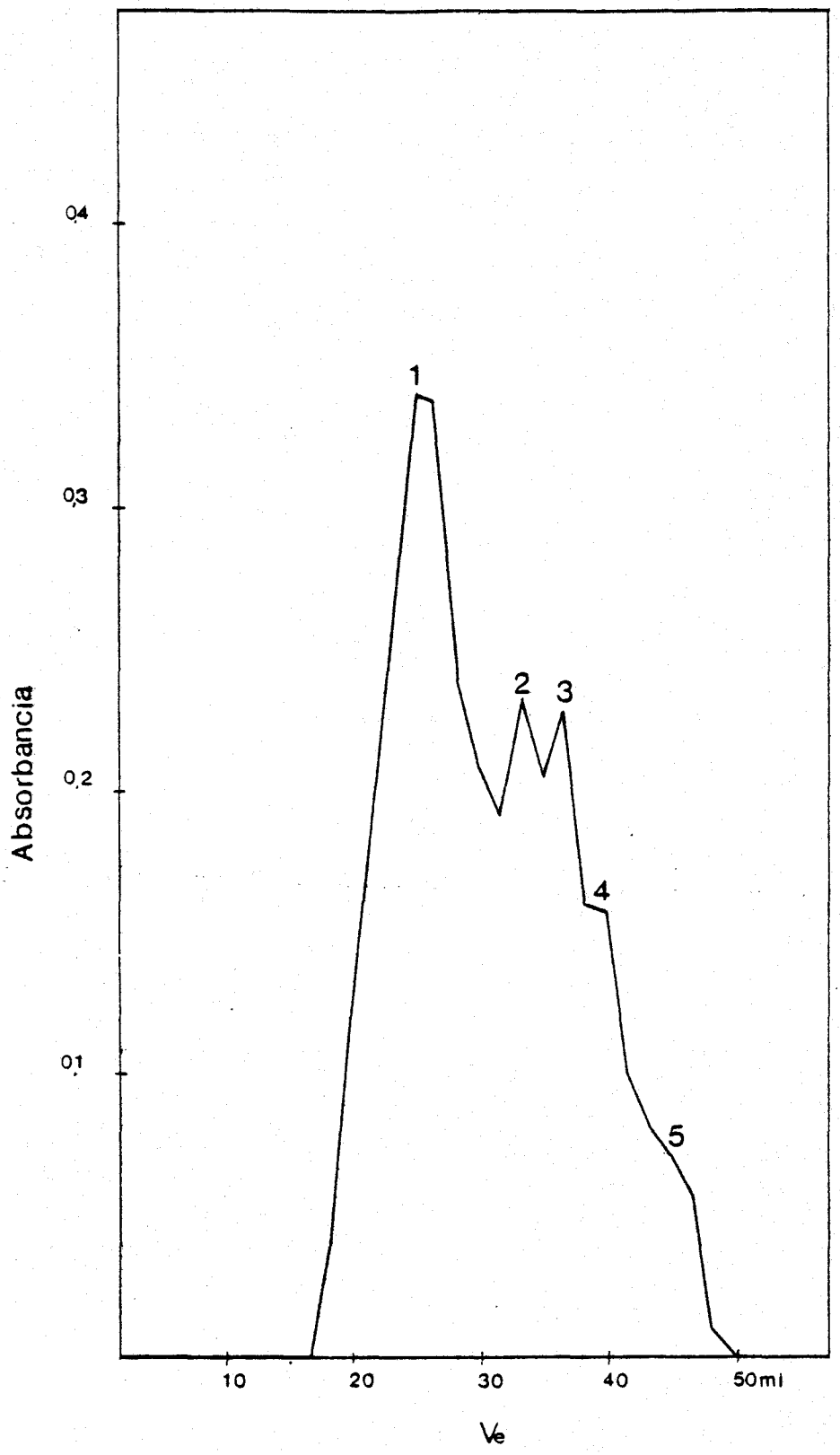


Fig. 55. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a -- 100°. Tiempo de hidrólisis, 5 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 125000; 2, 6500; 3, 1800; 4, <1000 y 5, <1000.

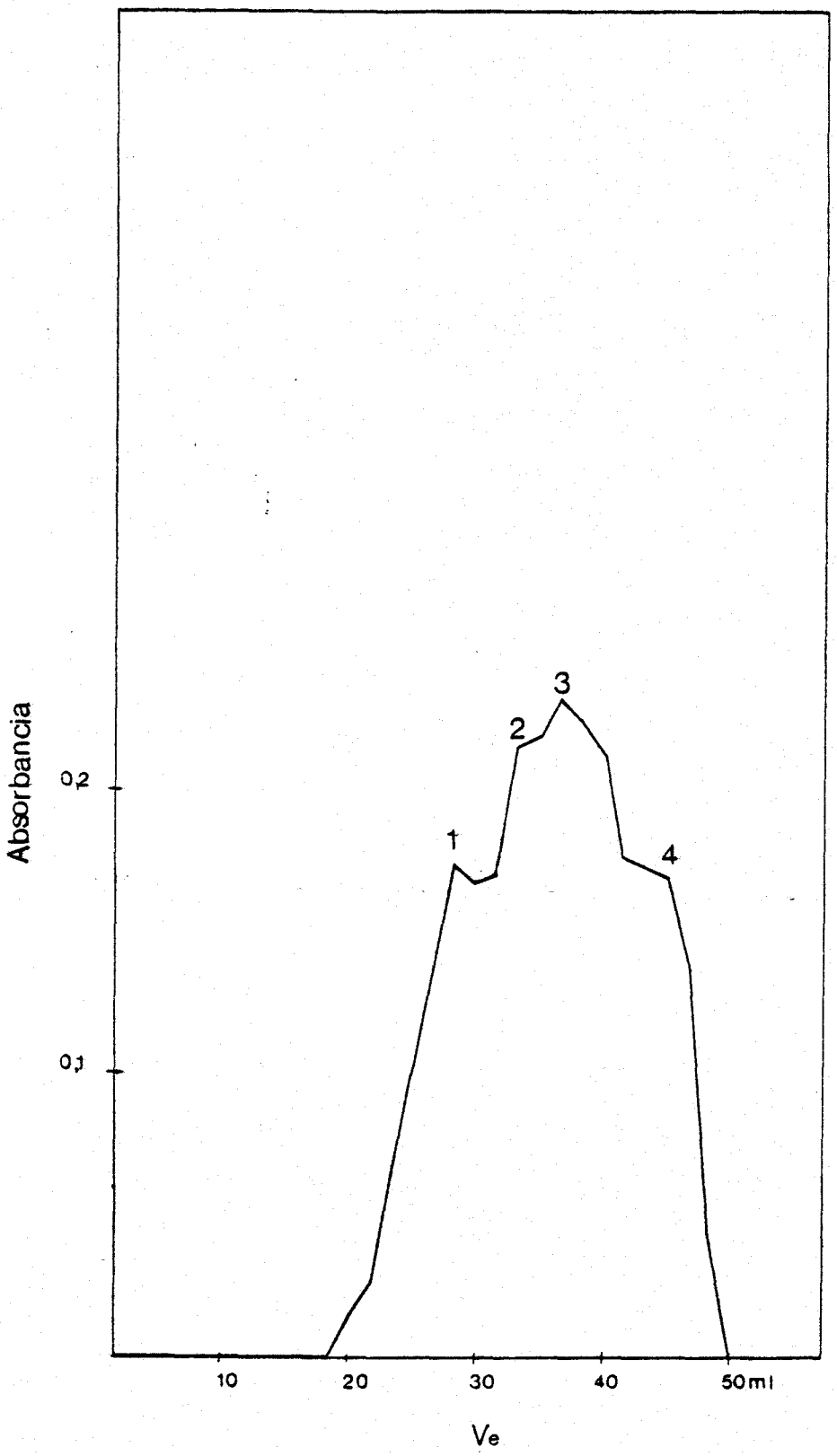


Fig. 56. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a -- 100°. Tiempo de hidrólisis, 8 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 40000; 2, 6000; 3, 1800 y 4 <1000.

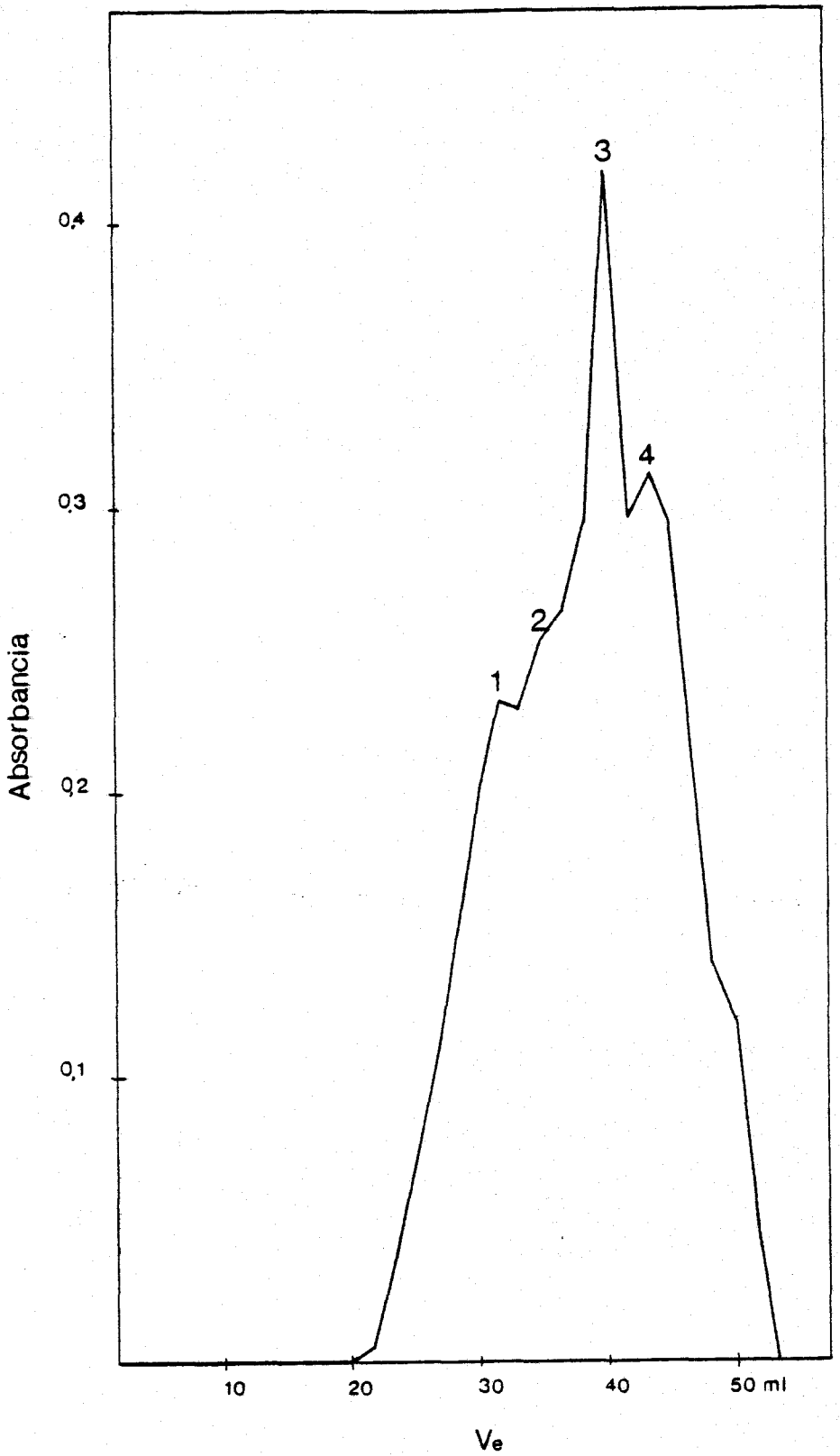


Fig. 57. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a -- 100°. Tiempo de hidrólisis, 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1,11000; 2, 3400; 3, <1000 y 4, <1000.

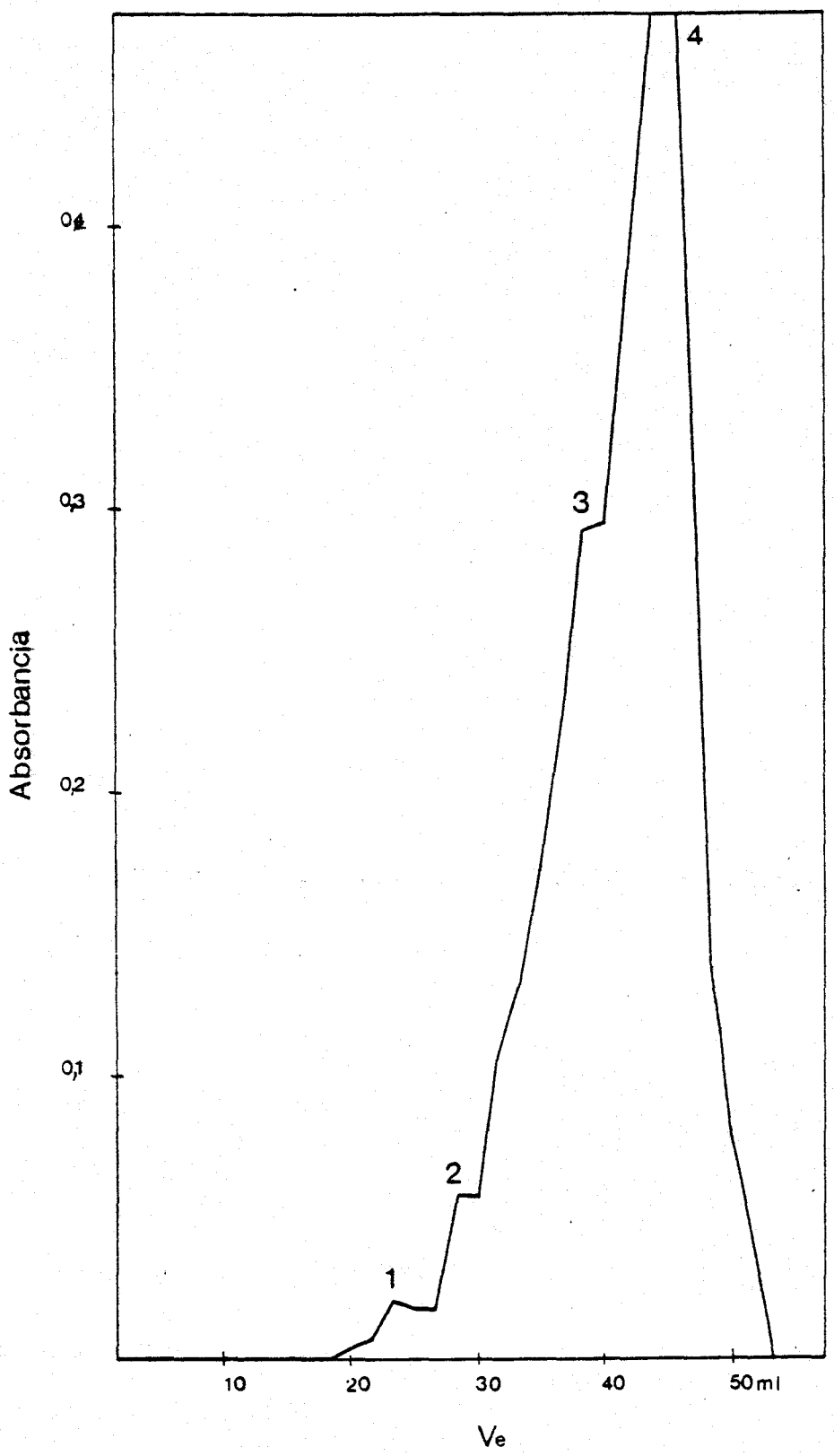


Fig. 58. Hidrólisis parcial de la fracción C-2, con ácido trifluoroacético 0,01N a -- 100°. Tiempo de hidrólisis, 48 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son; 1, 240000; 2, 40000; 3, <1000 y 4,< 1000.

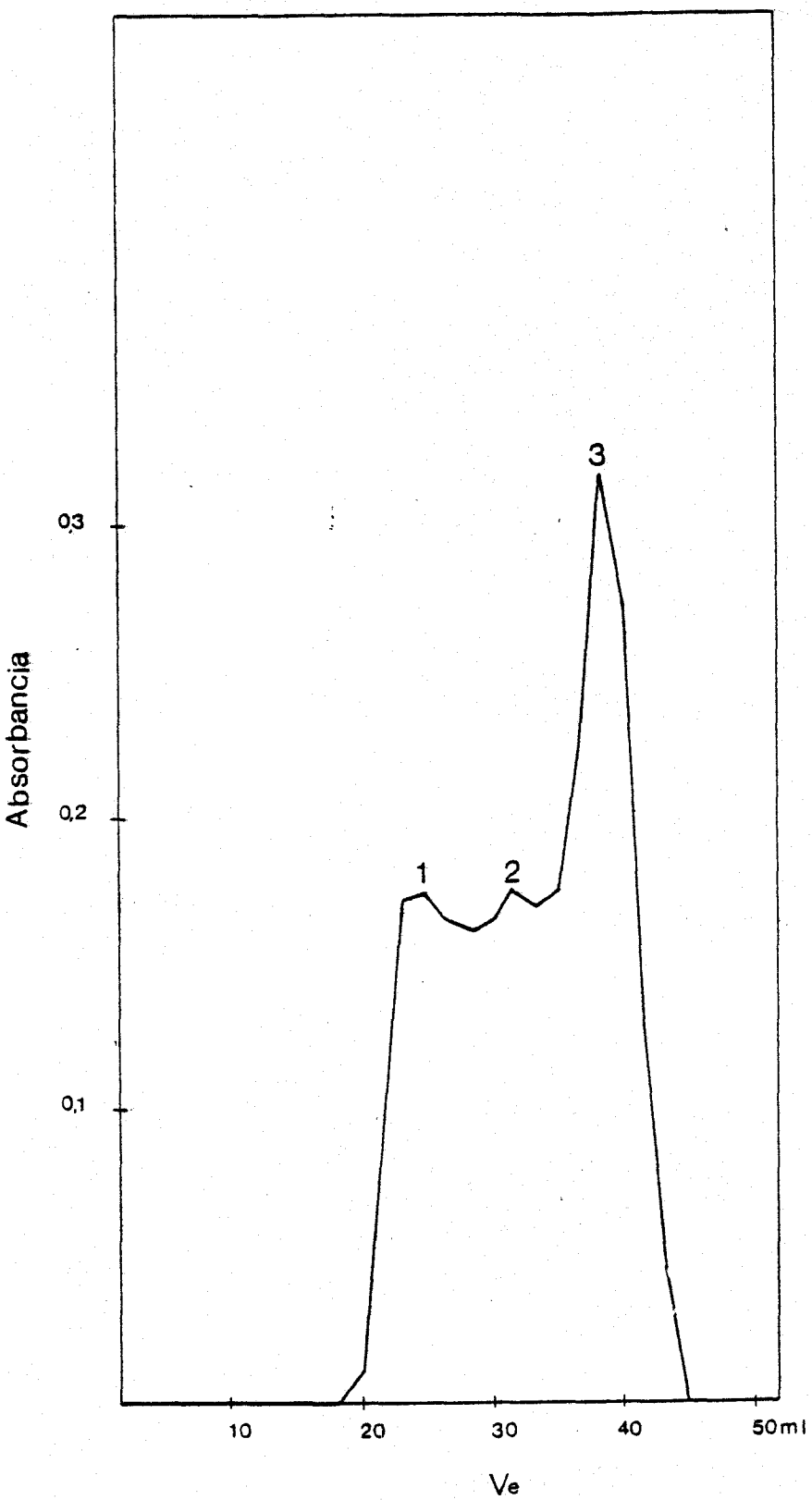


Fig 59. Hidrólisis parcial de la fracción C-2 con ácido trifluoroacético 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1 3980; 2, 977 y 3, 180.

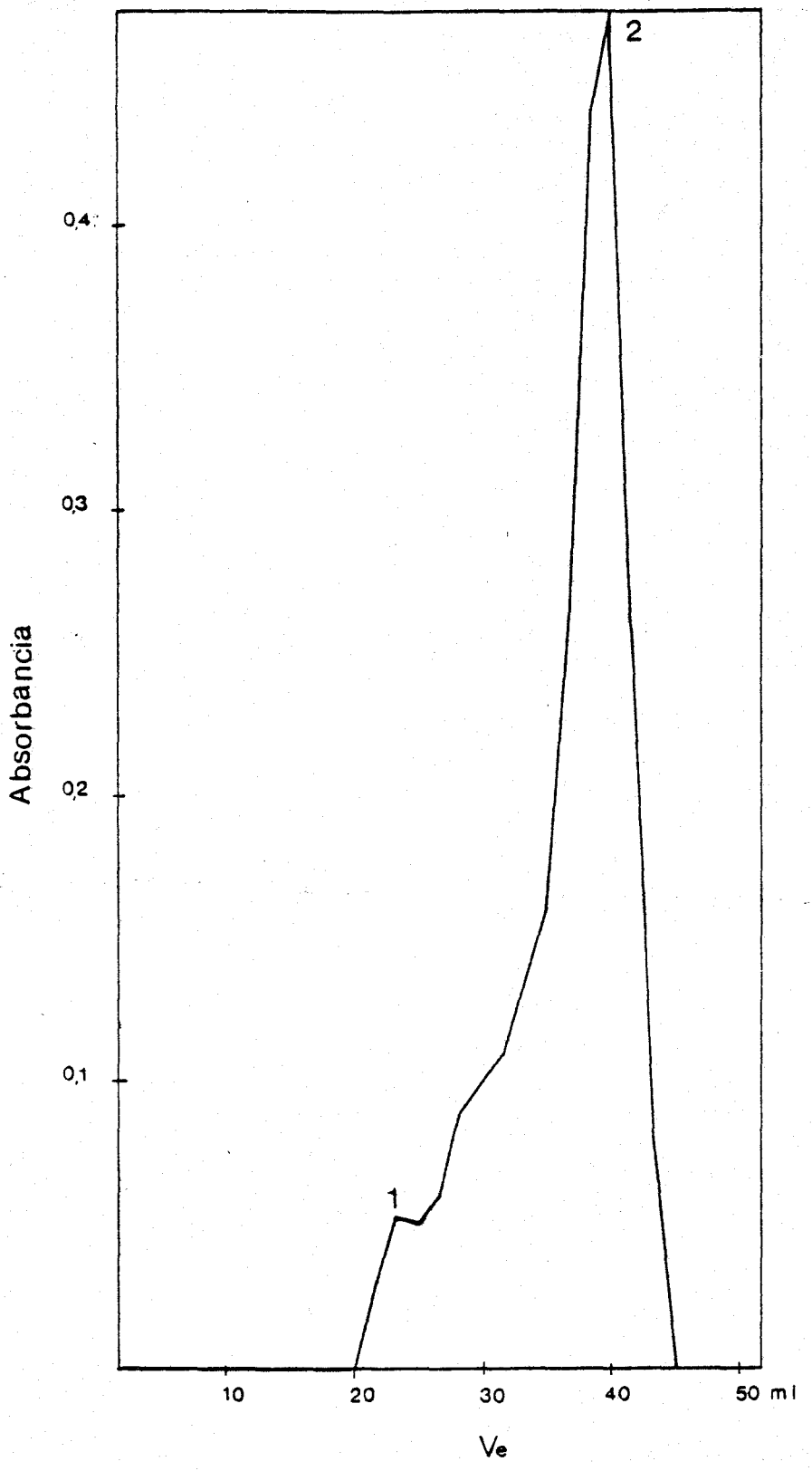


Fig. 60. Hidrólisis parcial de la fracción C-2 con ácido trifluoroacético 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 5 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre - Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 3980 y 2, 180.

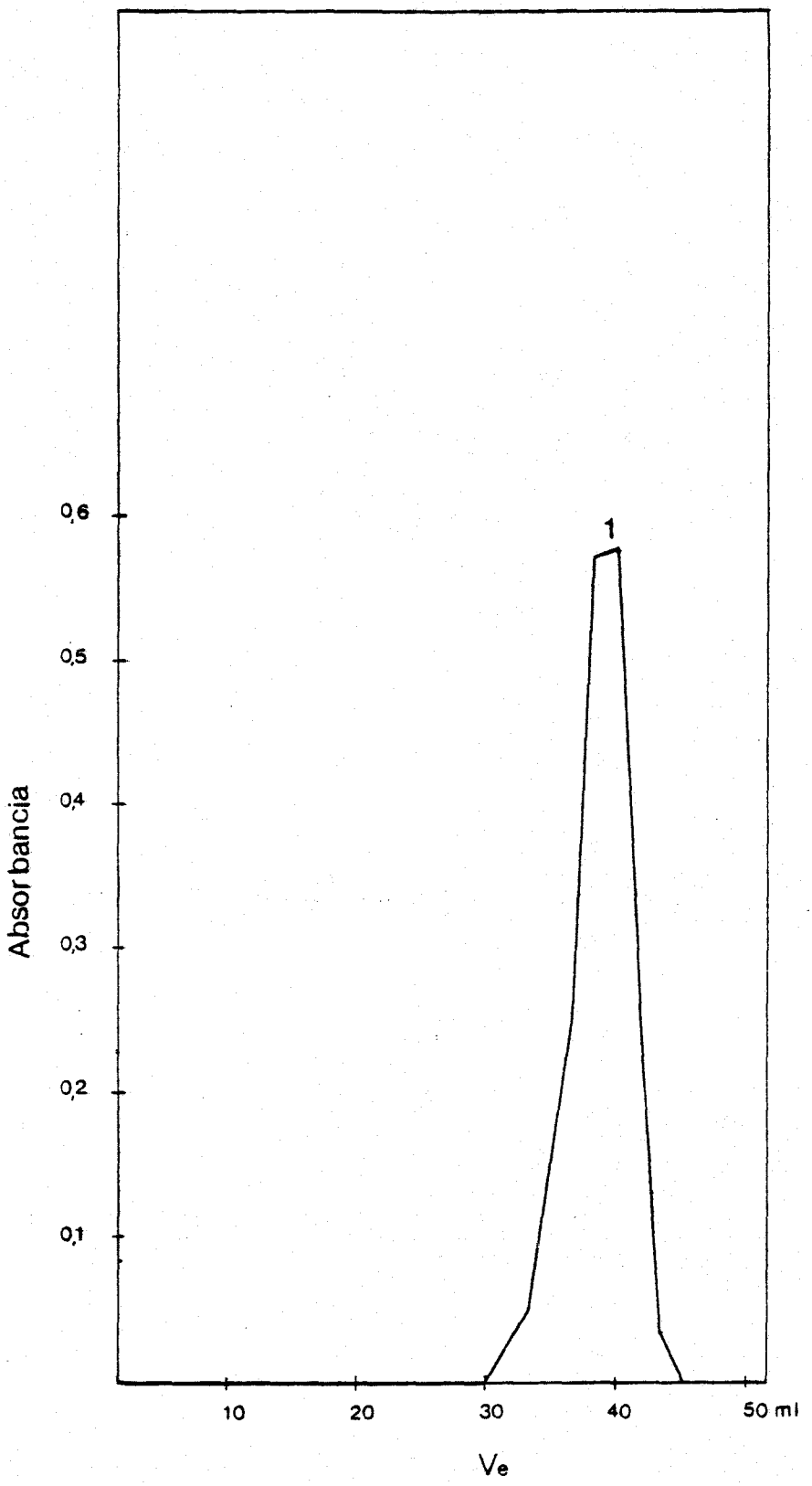


Fig. 61. Hidrólisis parcial de la fracción C-2 con ácido trifluoroacético 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre - Sephadex G-25. El peso molecular del pico 1 es 180.

miten determinar, con la ayuda de la recta de calibrado de la figura 38, el peso molecular de cada uno de los picos, valores que se recogen al pie de cada gráfica.

Los pesos moleculares medios y los poderes rotatorios de los distintos hidrolizados con ácido trifluoracético 0,01N se recogen en la tabla XLVI.

6.2.4. Interpretación de los resultados.

En la hidrólisis con ácido trifluoroacético 0,01N se detecta arabinosa en la cromatografía de papel después de 1 hora de hidrólisis. Después de 3; 5; 8 y 24 horas de hidrólisis se detectan arabinosa, galactosa y xilosa observándose que las pentosas van disminuyendo en intensidad. A las 48 horas aparece también la glucosa.

La aparición de arabinosa y xilosa bajo condiciones de hidrólisis muy suaves, indica que estos azúcares se encuentran en posiciones terminales y ramificadas.

En la hidrólisis con ácido trifluoroacético 0,1N, se detectan oligosacáridos que se identifican con los que aparecen en la hidrólisis de la fracción B-6 de la

Tabla XLVI

Hidrólisis parcial de la fracción C-2 con ácido tri---fluoracético 0,01N.

Tiempo de hidrólisis (h)	$(\alpha)_D^{30}$	Peso molecular medio
0	+24°	421000
1	+40°	302000
3	+45°	122000
5	+47,5°	72000
8	+50°	14000
24	+52,5°	4200
48	+27,5°	≈1000

variedad "manzanilla".

En los diagramas de elución se observa un desplazamiento de los máximos hacia la zona de pesos moleculares menores y una disminución en intensidad de los picos de peso molecular alto y un aumento de los de peso molecular bajo.

El incremento en la intensidad de un pico que corresponde a un peso molecular de 240000 y la disminución simultánea de otro correspondiente a un peso de 500000, pudiera interprestarse como una rotura de cadena en dos trozos iguales o una despolimerización. Esto mismo se -

observa entre los picos que corresponden a pesos moleculares de 240000 y 125000.

Por otra parte se aprecia la aparición de dos picos estables con pesos moleculares de 6500 y 3980, que indican su importancia en relación con la estructura básica del polisacárido. La disminución en la intensidad del pico de peso molecular de 6500 y el aumento de galactosa en los hidrolizados, parece indicar que existe una estructura fundamental con galactosa.

6.3. Fraccionamiento de la hemicelulosa B. Polisacáridos que no forman complejos insolubles con sales de Cu (II). Fracción C-3.

El sobrenadante y las aguas de lavado que se recogen al separar el complejo insoluble de Cu (II) de los polisacáridos de la hemicelulosa B (fracción C-2) (apartado 6.2) se acidifican con ácido acético y se dializan. La solución resultante se concentra a pequeño volumen y se precipita con etanol. El precipitado se trata con HCl al 5% en etanol como se describe en el apartado 4.4. Se aisla un sólido de color marrón claro, que pesa 240 mg y denominamos fracción C-3. Rendimiento 40% (respecto a la hemicelulosa B).

6.3.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos de la hemicelulosa B. Fracción C-3.

La fracción C-3 (12 mg) se hidroliza con H_2SO_4 1N (5 ml) calentando en baño de agua a ebullición. Después de neutralizar se añade inositol (2 mg) y se preparan los acetatos de alditoles. Las condiciones cromatográficas son las descritas en el apartado 5.1.3.

Los resultados obtenidos se incluyen en la tabla XLVII y uno de los cromatogramas realizados se representa en la figura 62.

6.3.2. Peso molecular medio de la hemicelulosa B. Fracción C-3.

Se utiliza la misma columna y las condiciones que se describen en el apartado 3.5. La hemicelulosa B (fracción C-3) (4 mg) se disuelve en NaCl 0,5M (1 ml) y se toman 0,2 ml que se eluyen en la columna de Sephacryl S-300. Se recogen fracciones de 1,7 ml que se analizan de la forma usual. Los valores de absorbancia se incluyen en la tabla XLVIII y se representan en la figura 63.

Tabla XLVII

Análisis cuantitativo de la fracción C-3.

Azúcares	Cantidad (mg)	Muestra (%)	Azúcares (%)
Ramnosa	0,29	2,42	3,63
Arabinosa	1,56	13,00	19,00
Xilosa	2,63	21,92	32,87
Galactosa	1,68	14,00	21,00
Glucosa	1,84	15,33	23,00
Total	8,00	66,67	99,50

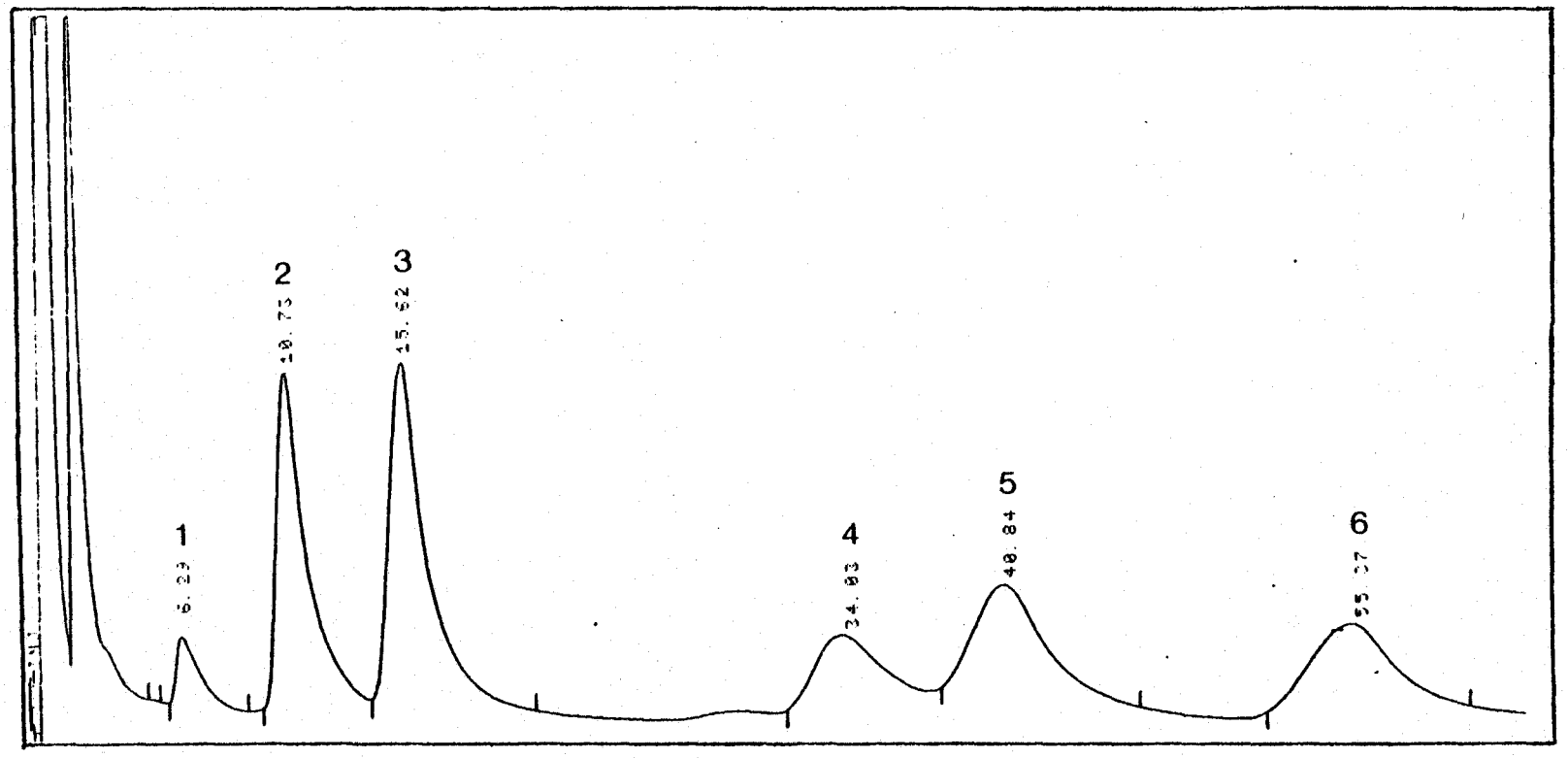


Fig. 62. Cromatografía gas-líquido como acetatos de alditoles. Azúcares presentes en el hidrolizado de la fracción C-3. 1, ramnosa; 2, arabinosa; 3, xilosa; 4, ga-- lactosa; 5, glucosa y 6, inositol (patrón interno). Columna 2m×3mm de ECNSS-M al - 3% sobre Gas-Chrom Q, 100-120 mesh. Temperatura 170°.

Tabla XLVIII

Determinación del peso molecular de la fracción C-3. Valores de absorbancia de las fracciones eluidas en la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia	Fracciones	Absorbancia
1-10	0,000	17	0,282	24	0,207
11	0,008	18	0,295	25	0,168
12	0,054	19	0,286	26	0,136
13	0,239	20	0,285	27	0,082
14	0,299	21	0,287	28	0,049
15	0,252	22	0,270	29-32	0,000
16	0,256	23	0,288		

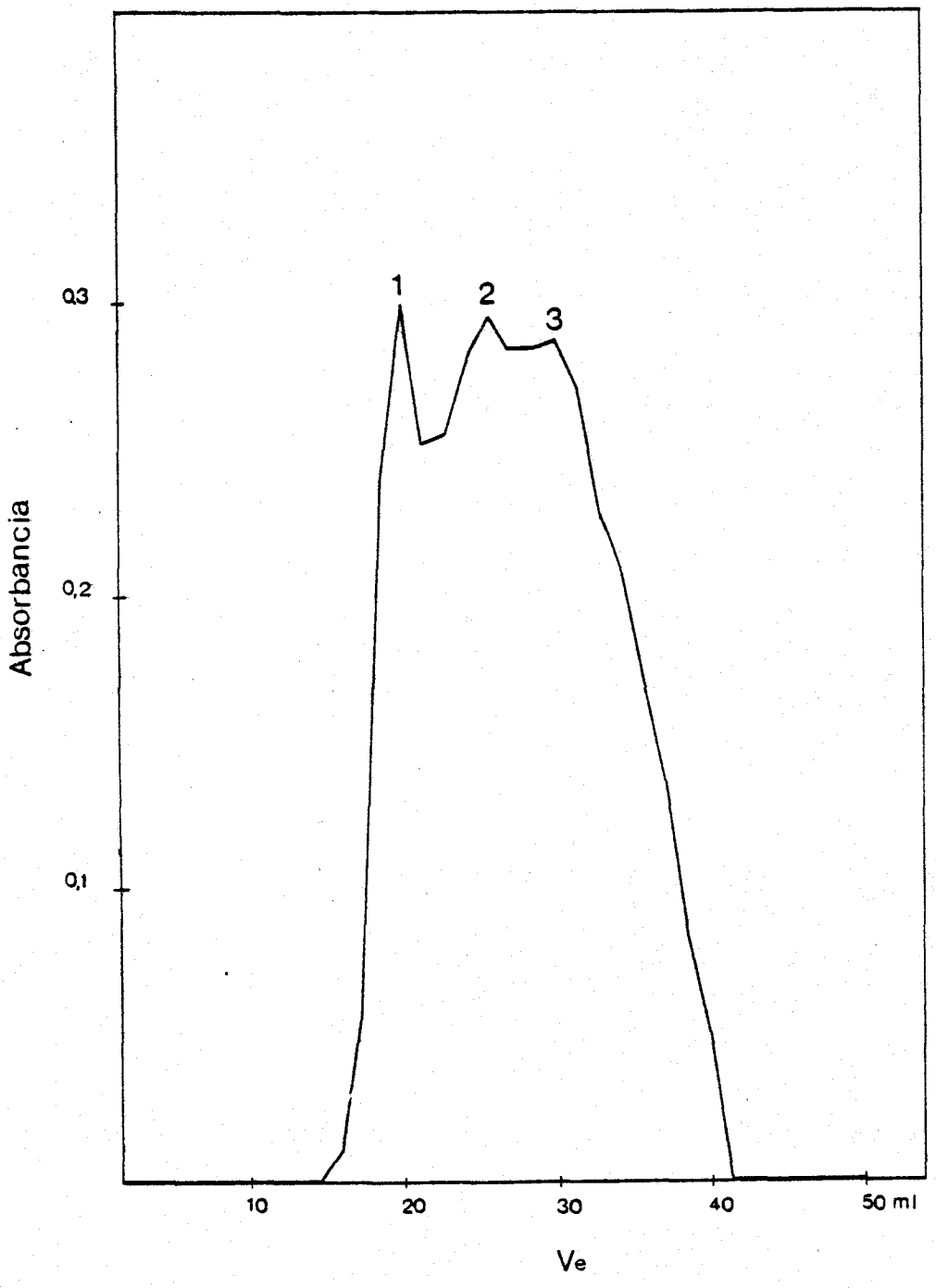


Fig. 63. Determinación del peso molecular de la fracción C-3. Diagrama de elución sobre - Sephacryl S-300.

Tabla XLIX

Determinación del peso molecúlar de la fracción C-3. Valores de los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares de los distintos - picos del diagrama de elución de la cromatografía sobre Sephacryl S-300.

Pico	V_e	K_d	Peso molecular
1	20	0,11	280000
2	25,7	0,32	36000
3	30	0,48	7500

Los picos observados en el diagrama de elución - tienen los volúmenes de elución, coeficientes de distribución y pesos moleculares que se indican en la tabla - XLIX.

El peso molecular medio calculado para la fracción C-3 es de 80000.

6.3.3. Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción C-3.

La hidrólisis parcial de la fracción C-3 se realiza con H_2SO_4 0,01N y 0,1N siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.6.3.1.

Los diagramas de elución de los hidrolizados de la fracción C-3 con H_2SO_4 0,01N para distintos tiempos de hidrólisis, se representan en las figuras 64-69. Estos diagramas permiten determinar, con la ayuda de la recta de calibrado de la figura 18, el peso molecular de cada pico, valores que se recogen al pie de cada gráfica.

Las curvas de elución de los hidrolizados de la fracción C-3 con H_2SO_4 0,1N para distintos tiempos de hidrólisis, se representan en las figuras 70-72. Al pie de cada gráfica se indican los pesos moleculares de cada pico, calculados según la recta de calibrado de la figura 38.

Los pesos moleculares medios de los distintos hidrolizados con H_2SO_4 0,01N se recogen en la tabla D.

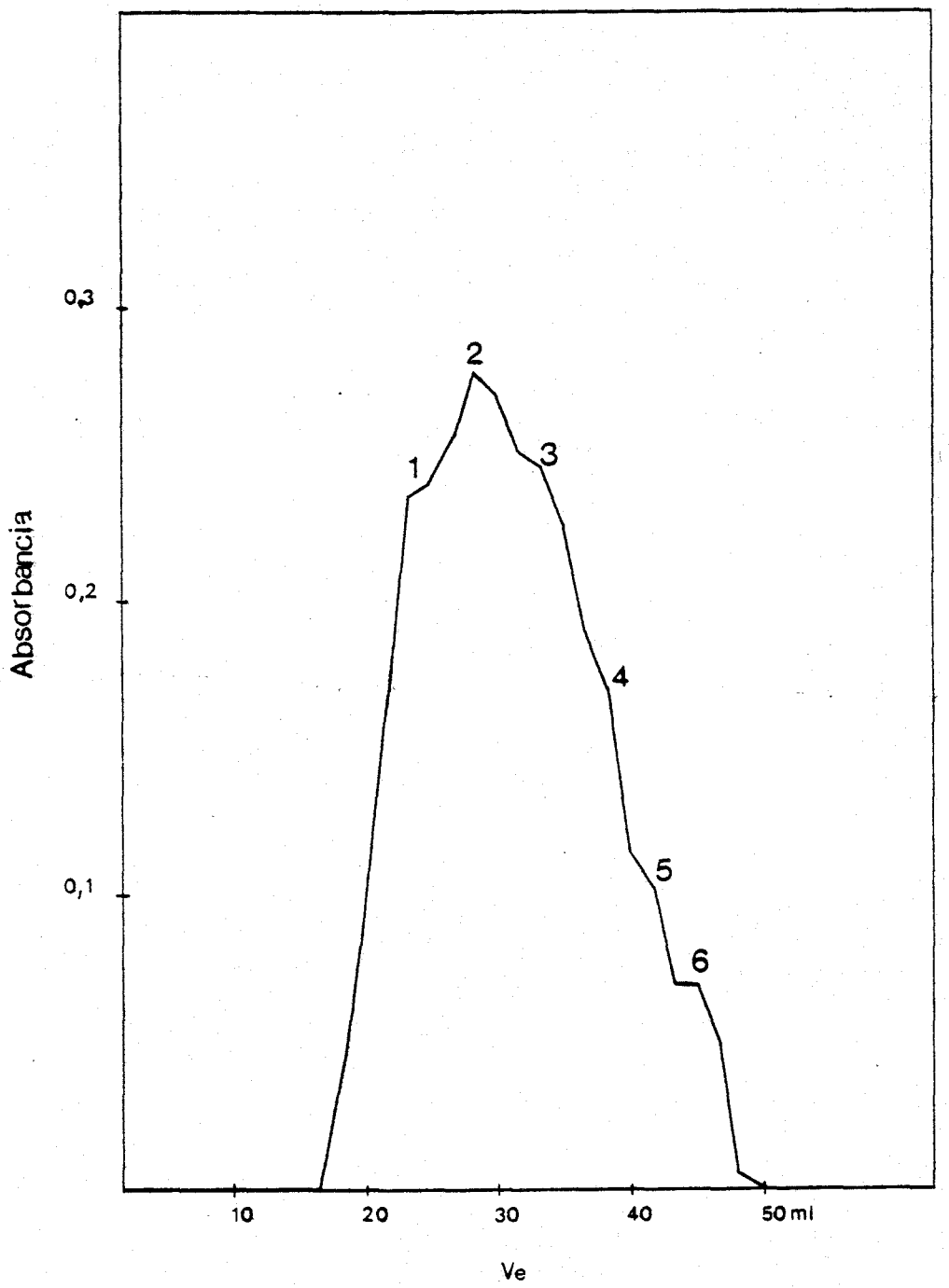


Fig. 64. Hidrólisis parcial de la fracción C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1,240000; 2, 40000; 3, 6500; 4, <1000; 5, <1000 y 6, <1000.

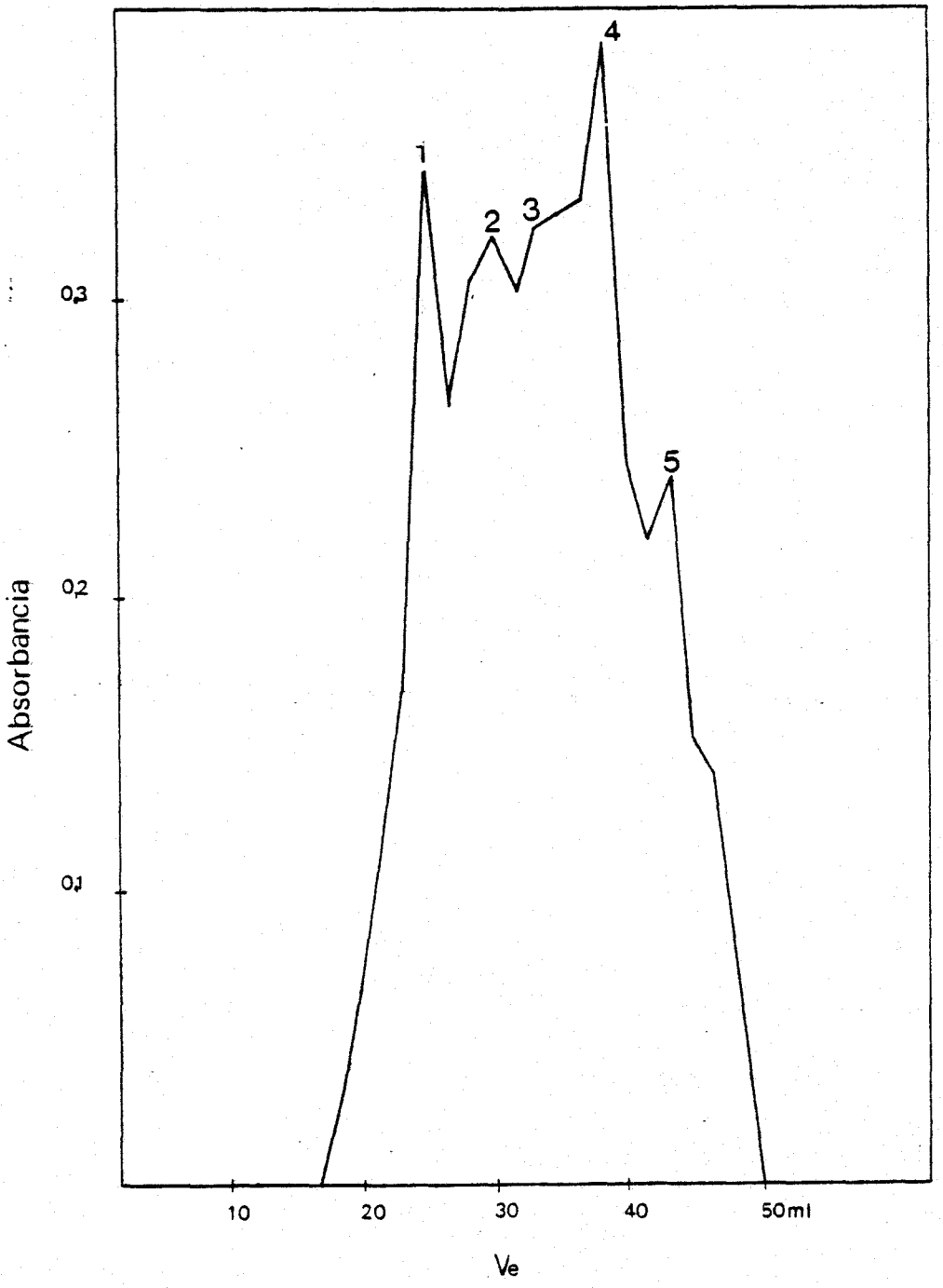


Fig. 65. Hidrólisis parcial de la fracción -- C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis 3 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 125000; 2, --- 20000; 3, 6500; 4, <1000 y 5, <1000.

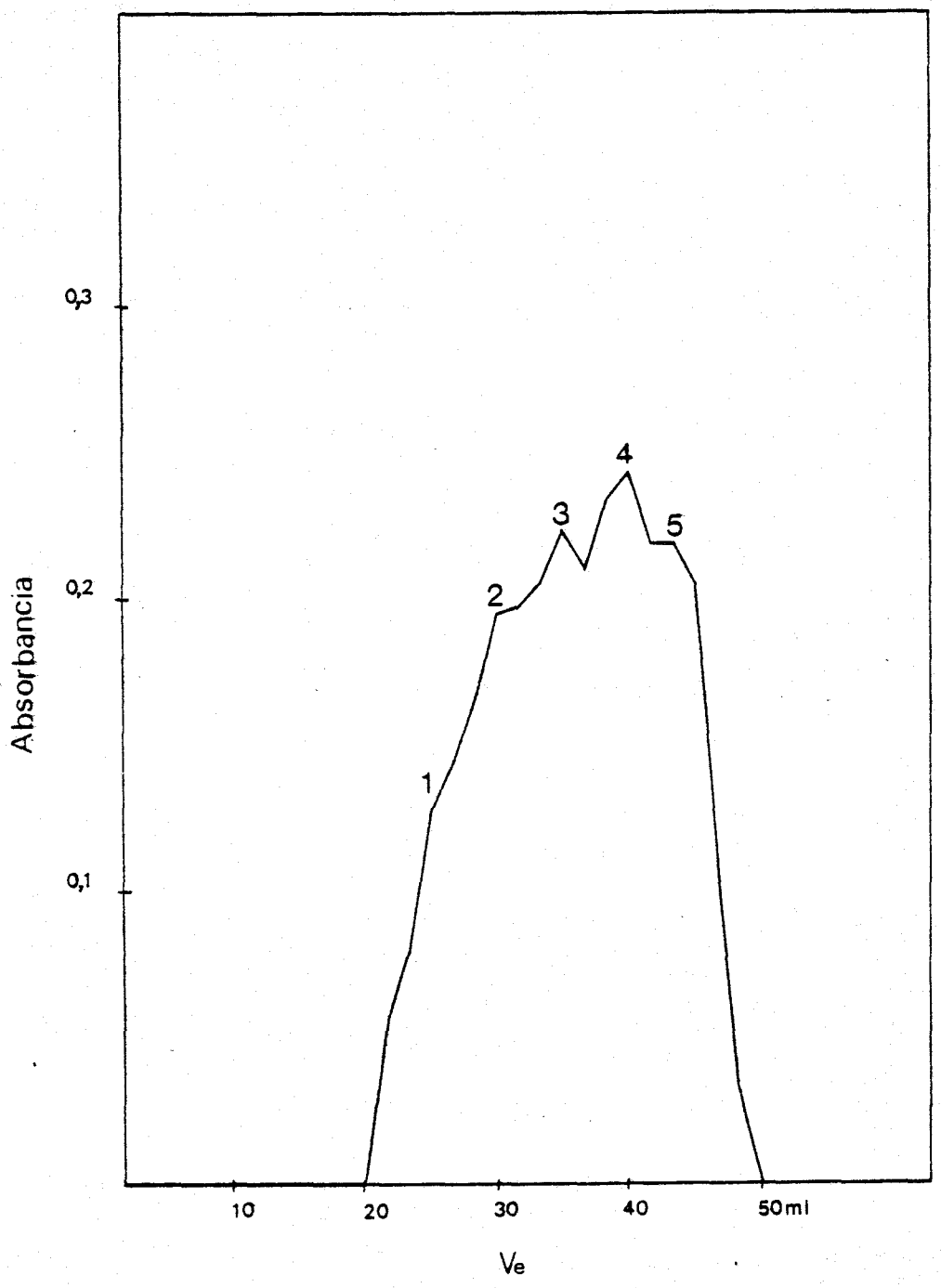


Fig. 66. Hidrólisis parcial de la fracción -- C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 6 h. Diagrama de elución del - hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 125000; 2, - 20000; 3, 3400; 4, <1000 y 5, <1000.

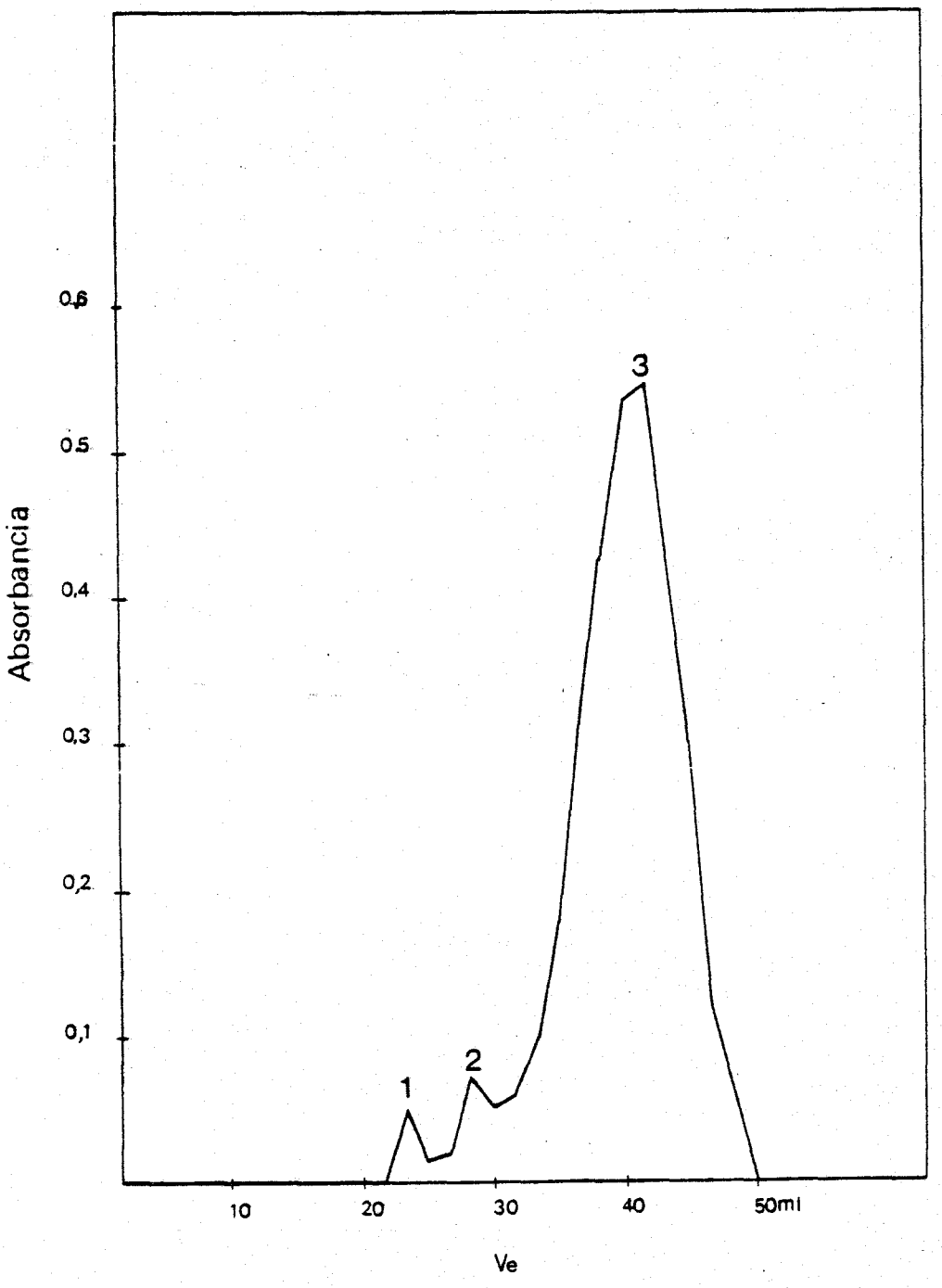


Fig. 67. Hidrólisis parcial de la fracción -- C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 9 h. Diagrama de elución del - hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 240000; 2, - 40000 y 3, <1000.

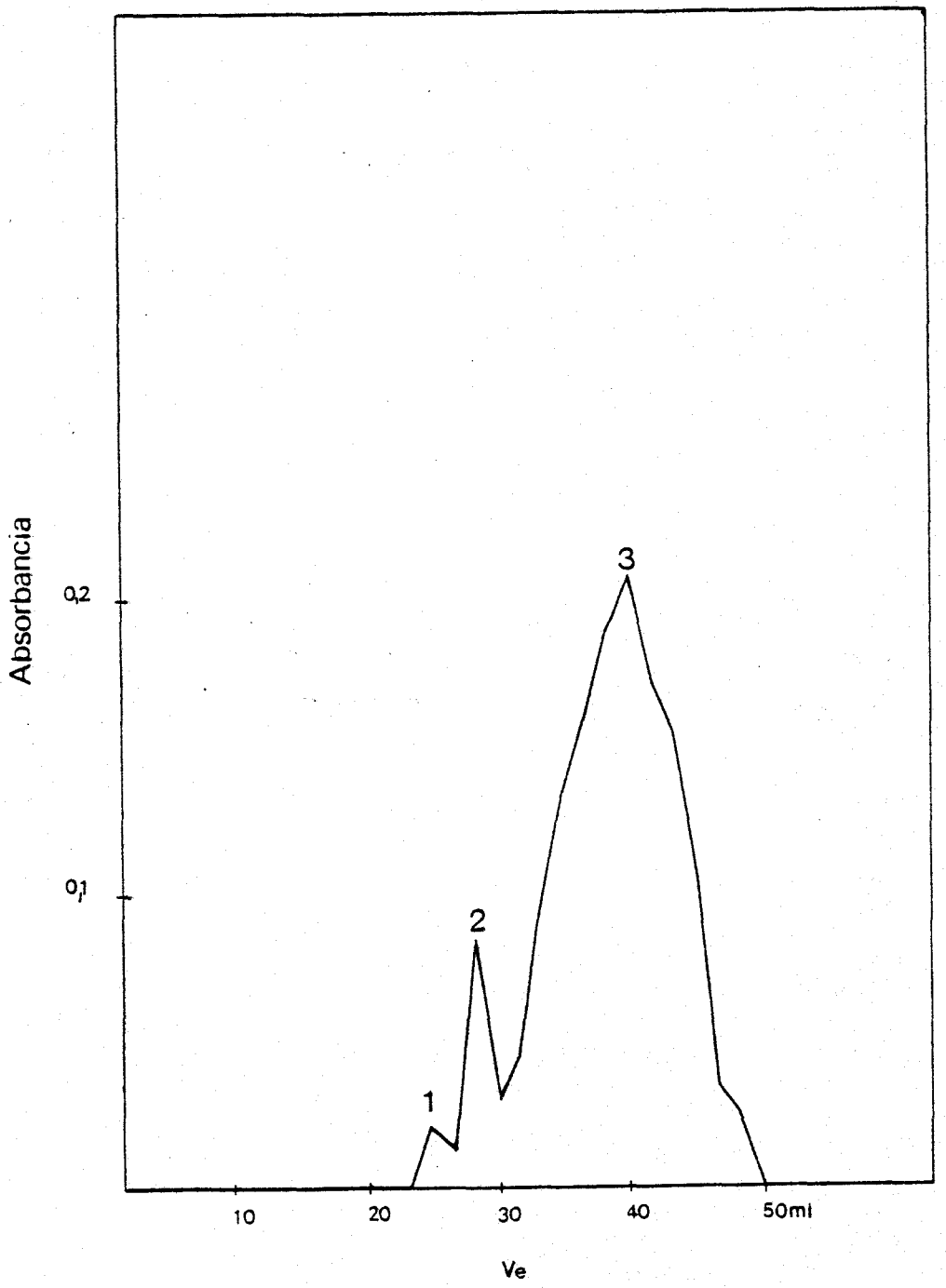


Fig. 68. Hidrólisis parcial de la fracción -- C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100º. Tiempo de hidrólisis, 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 125000; 2, - 40000 y 3, <1000.

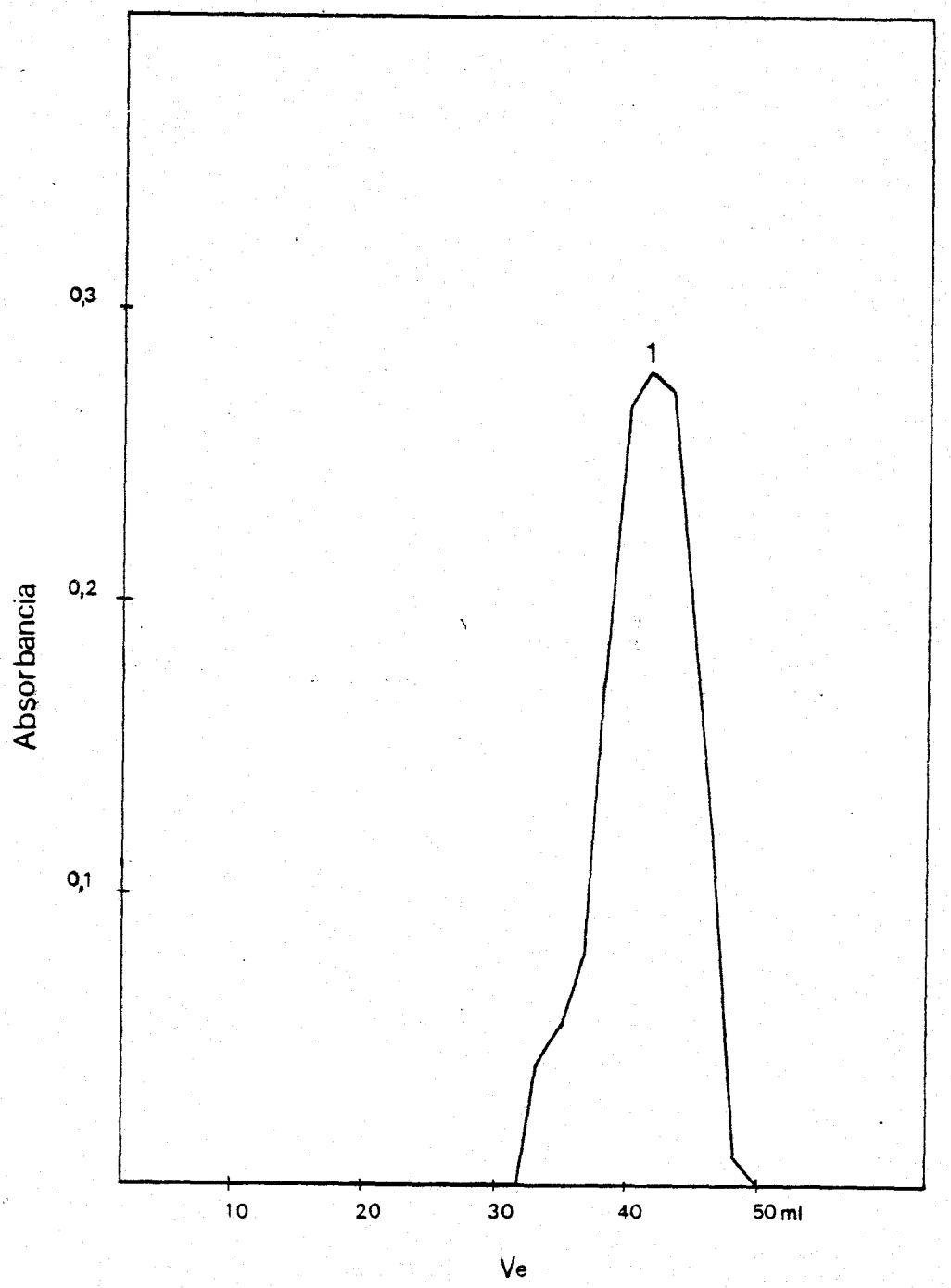


Fig. 69. Hidrólisis parcial de la fracción -- C-3, con ácido sulfúrico 0,01N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 48 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephacryl S-300. El peso molecular del pico 1 es <1000.

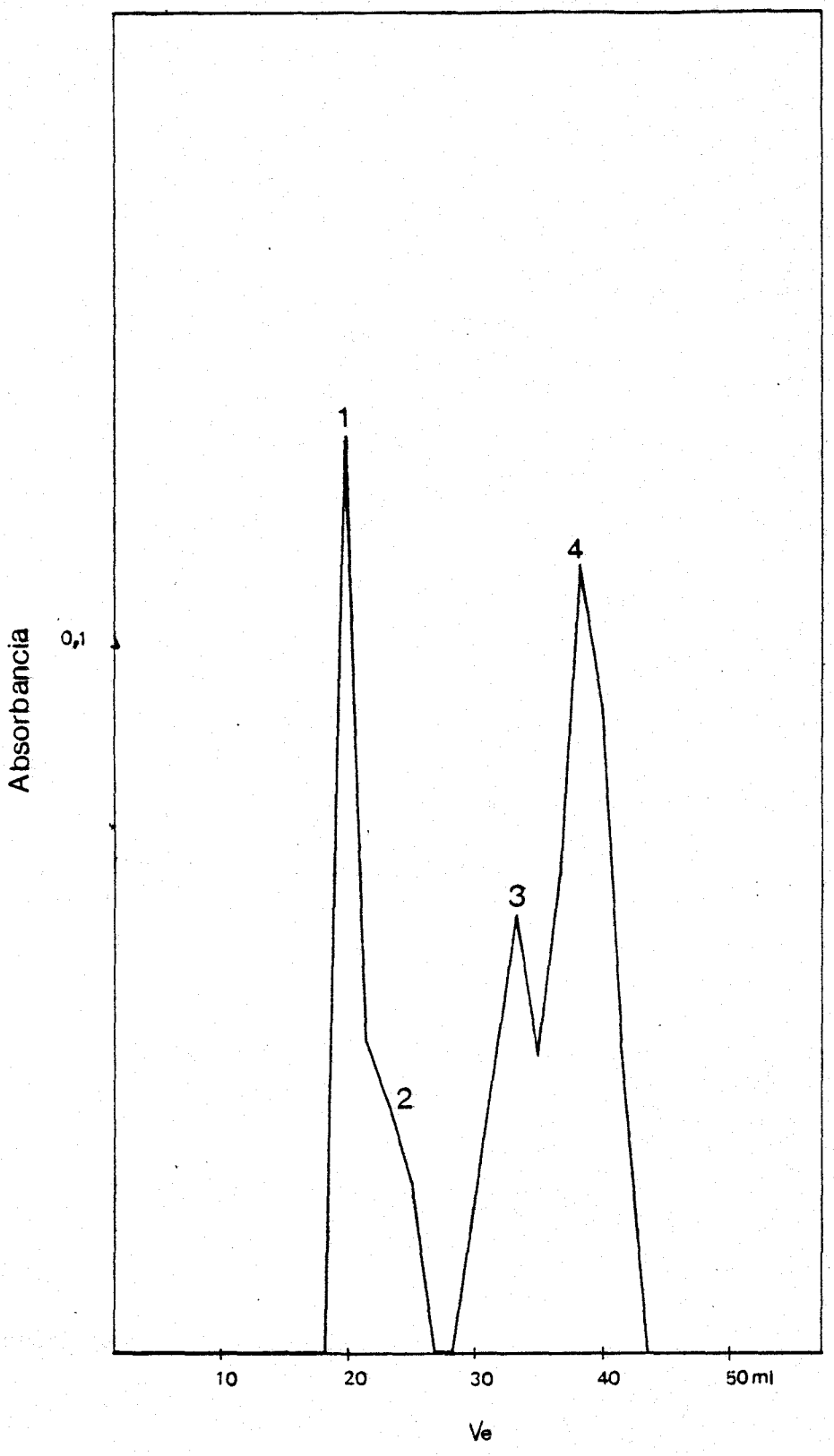


Fig. 70. Hidrólisis parcial de la fracción C-3, con ácido sulfúrico 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 1 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, ≥5000; 2, 5000; 3, 708 y 4, 180.

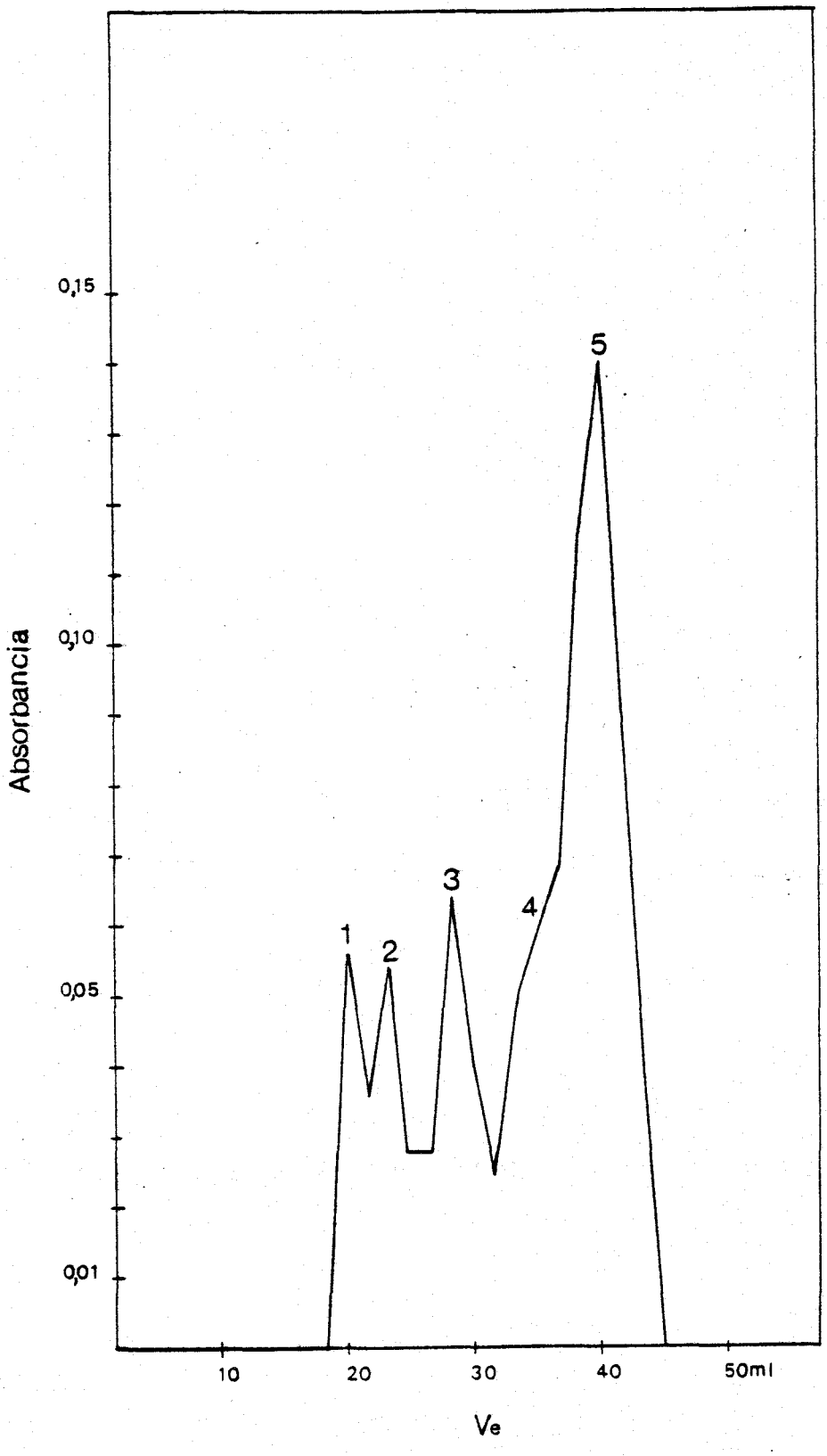
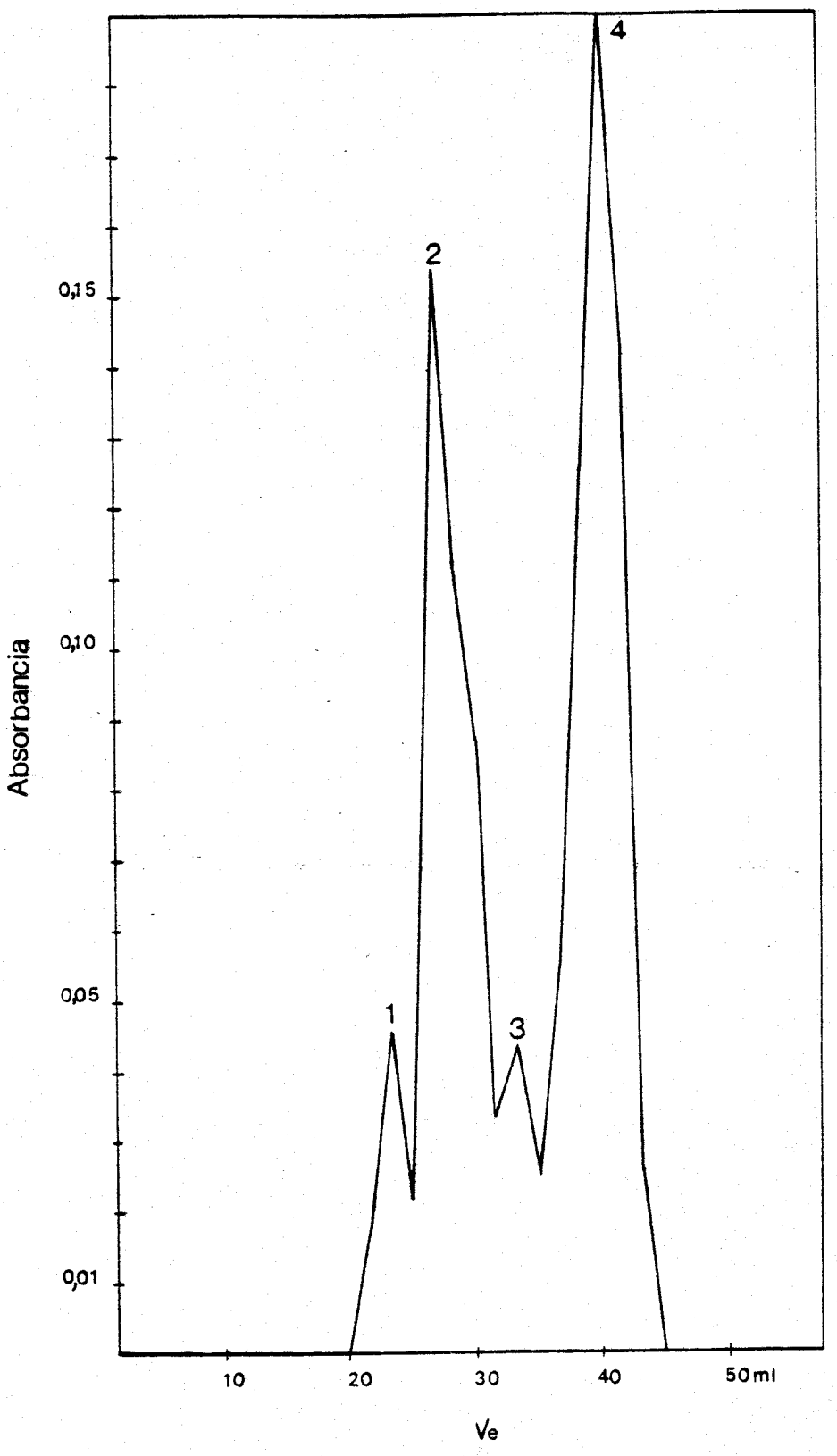


Fig. 71. Hidrólisis parcial de la fracción C-3, con ácido sulfúrico 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 6 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares son: 1,>5000; 2, 5000; 3, 1995; 4, 504 y 5, 180.



Fig, 72. Hidrólisis parcial de la fracción C-3, con ácido sulfúrico 0,1N a 100°. Tiempo de hidrólisis, 24 h. Diagrama de elución del hidrolizado sobre Sephadex G-25. Los pesos moleculares de cada pico son: 1, 5000; 2, 2754; 3, 708 y 4, 180.

Tabla L

Hidrólisis parcial de la fracción C-3 con H_2SO_4 0,01N.

Tiempo de hidrólisis (h)	$(\alpha)_D^{30}$	Peso molecular medio
0	-5°	80000
1	+12,5°	72000
3	+25°	32500
6	+32,5°	20000
9	+20°	6000
24	+17,5°	6000
48	+15°	≈ 1000

6.3.4. Interpretación de los resultados.

En el análisis por cromatografía de papel se observa la aparición de arabinosa, ramnosa y galactosa en condiciones muy suaves de hidrólisis, lo que indica que estos azúcares se encuentran en posiciones terminales y ramificadas. A las 6 horas se detecta xilosa y la glucosa sólo aparece después de 48 horas de hidrólisis. Esto sugiere como estructura fundamental la de xiloglucana - con ramificaciones de arabinosa, ramnosa y galactosa o bien la existencia de dos polisacáridos: una xiloglucana y una arabinogalactana.

7. CONCLUSIONES

1. Se aisla y purifica un material hemicelulósico soluble en agua de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", que previamente se ha extraído con etanol del 80% y con disolventes orgánicos (hexano y cloroformo-metanol). El contenido en monosacáridos es del 30% y en ácido galacturónico del 10%. El porcentaje de los monosacáridos es el siguiente: Ramnosa, 5,8; arabinosa, 56,5; xilosa, 3,6; manosa, 2,1; galactosa, 25,8 y glucosa, 6,1. El peso molecular medio determinado por cromatografía de filtración sobre Sephacryl S-300 es de 45000. Se le asigna por su composición una estructura de arabinogalactana.

2. Se aisla una hemicelulosa B de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", que previamente se ha extraído con etanol del 80%, hexano, agua y KOH al 10% y precipita con etanol del 80%. El contenido en monosacáridos de una de las fracciones purificadas es del 52% y su porcentaje es el siguiente: Ramnosa, 6,4; arabinosa, 46,6; xilosa, 19,7; galactosa, 14,8 y glucosa, 12,6.

3. Se aisla una hemicelulosa A de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", que

previamente se ha extraído con etanol del 80%, clorofor mo-metanol y se ha deslignificado con NaOH al 1% en eta nol del 80%. Esta hemicelulosa se extrae con NaOH al 10% y precipita al acidificar con ácido acético. Está com-- puesta de glucosa (85%) y de xilosa. En la acetolisis - se aisla celobiosa y se identifica su serie homóloga -- hasta un grado de polimerización de cinco unidades. Se le asigna la estructura de una glucana con enlaces --- β(1→4) y posibles ramificaciones de xilosa.

4. Se aisla una hemicelulosa B de la pulpa de --- aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", pre- parada como se ha indicado en el apartado anterior. Es- ta hemicelulosa se extrae con NaOH al 10% y precipita - con etanol cuando se alcanza una concentración del 80%. Tiene un contenido total de monosacáridos del 73,5% con el siguiente porcentaje: Arabinosa, 6,5; xilosa, 62,3;- galactosa, 2,2 y glucosa, 29,0. Por su composición se - le asigna la estructura de una glucoxilana.

5. Se aisla una hemicelulosa B de la pulpa de --- aceitunas deshuesadas de la variedad "manzanilla", que previamente se ha extraído con etanol del 80%, con clo- roformo-metanol, con agua y se ha sometido a un trata-- miento con metilato sódico. Esta hemicelulosa se extrae con NaOH al 10% y precipita formando un complejo de co- bre con licor de Fehling. El contenido en monosacáridos

es del 65% y su porcentaje el siguiente: Arabinosa, 7,7; xilosa, 15,1; manosa, 17,8; galactosa, 13,6 y glucosa, 45,9. En la acetolisis se aislan celobiosa y un disacárido de glucosa y manosa. Su peso molecular medio, determinado por cromatografía de filtración sobre Sephacryl S-300, es de 53000. Por su composición y el comportamiento en las hidrólisis parciales se le puede asignar la estructura de una galactomanoglucana con ramificaciones de xilosa y arabinosa.

6. Se aisla un material hemicelulósico soluble en agua de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "gordal", que previamente se ha extraído con etanol del 80% y con disolvente orgánico (hexano y acetona). El contenido en monosacáridos es del 9,2% y en ácidos urónicos del 4,4%. El porcentaje de los monosacáridos es: Ramnosa, 9,6; arabinosa, 65,7; xilosa, 5,7 y galactosa, 18,8. El peso molecular determinado por filtración sobre Sephacryl S-300 es de 73000. Por su composición se le asigna la estructura de una arabinogalactana, análoga a la obtenida en la variedad "manzanilla".

7. Se aisla una hemicelulosa B de la pulpa de aceitunas deshuesadas de la variedad "gordal", que previamente se ha extraído con etanol del 80%, disolventes orgánicos, agua y después de tratada con metóxido sódico, extraída de nuevo con agua. La hemicelulosa B se ex

trae con NaOH al 10% y se precipita con etanol del 80%. Esta hemicelulosa se purifica por tratamiento con el licor de Fehling, aislándose una fracción que forma un complejo insoluble con las sales de Cu(II) y otra que no forma complejo insoluble con las sales de Cu (II).

La primera fracción tiene un contenido en monosacáridos del 95,3% y presenta el siguiente porcentaje:-- Arabinosa, 5,6; xilosa, 18,8; manosa, 23,4; galactosa, 16,9 y glucosa, 35,4. El peso molecular determinado por filtración sobre Sephacryl S-300 es de 420000.

La fracción que no forma complejo insoluble con las sales de Cu (II) tiene un contenido en monosacáridos del 66,7% con la siguiente composición: Ramnosa, 3,6; arabinosa, 19,0; xilosa, 32,9; galactosa, 21,0 y glucosa, 23,0. El peso molecular medio determinado por filtración sobre Sephacryl S-300 es de 80000.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Vázquez; Grasas y aceites, 16, 292 (1965).

2. M.J. Fernández-Díez; "The Olive". Capítulo de la obra "The Biochemistry of fruits and their Products". Volumen n°2, Academic Press, New York --- (1971).

3. A. Corrao; Olearia, (2-3), 57 (1964).

4. J.I. Chung, S. Sakamura y B.S. Luh; Confructa, 19, n°5, 227 (1974).

5. M.J. Fernández-Díez, M.I. Mínguez y J. Castillo; Grasas y aceites, 25, 331 (1974).

6. M.I. Mínguez, J. Castillo y M.J. Fernández-Díez; Grasas y aceites, 27, 27 (1976).

7. M.J. Fernández-Díez, M.I. Mínguez, J. Castillo, J. Cabrera y A. Heredia; Grasas y aceites, 27, 405 - (1976).

8. A. Heredia; Grasas y aceites, 30, 105 (1979).

9. A. Heredia y M.J. Fernández-Díez; Grasas y aceites, 30, 141 (1979).

10. A. Heredia; Grasas y aceites, 31, 121 (1980).

11. A. Heredia; Grasas y aceites, 31, 251 (1980).

12. E. Ragazzi, G. Veronese y A. Pietrogrande; Ann. - Chim. (Roma),57 (11), 1398 (1967).

13. E. Schulze; Ber., 24, 2277 (1891).

14. R.L. Whistler y C.L. Smart; "Polysaccharide Chemis try", Academic Press Inc., New York, 1953.

15. G.O. Aspinall; "Polysaccharide", Pergamon Press, - Oxford, 1970.

16. B. Monties; "Les Polymères Végetaux", Gauthier-Villars., Paris, 1980.

17. F.W. Norris y J.A. Preece; Biochem.J., 24, 59 (1930)

18. S. Angell y F.W. Norris; Biochem. J., 30, 2155 (1936).

19. H.W. Buston; Biochem. J., 28, 1028 (1934).

20. R.L. Whistler y J.N. BeMiller; Methods Carbohyd. Chem., 3, 21 (1963).

21. W.W. Binkley; Methods Carbohyd. Chem., 5, 54 (1965).

22. R.L. Whistler y M.S. Feather; Methods Carbohyd.Chem., 5, 144 (1965).

23. R.L. Whistler y J.L. Sannella; Methods Carbohyd.Chem. 5, 34 (1965).

24. S. Gardell; Methods Carbohyd. Chem., 5, 9 (1965).

25. H. Neukom y W. Kuendig; Methods Carbohyd. Chem.; 5, 14 (1965).

26. K.A. Granath; Methods Carbohyd. Chem., 5, 20 (1965).

27. Y.C. Lee y R. Montgomery; Methods Carbohyd.Chem.; 5, 28 (1965).

28. J.K.N. Jones y R.J. Stoodley; Methods Carbohyd.Chem., 5, 36 (1965).

29. H. Meier; Methods Carbohyd.Chem., 5, 45 (1965).

30. J.E. Scott; Methods Carbohyd. Chem., 5, 38 (1965).

31. A.I. Vogel; "Elementary Practical Organic Chemistry". Part III. Logmans, Green and Co., Londres, 1958, p. 652.

32. M. Rivas; Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 1980.

33. J.D. Blake y G.N. Richards; Carbohyd. Res., 14, 375 (1970).

34. K.V. Giri y V.N. Nigan; J. Indian Inst. Sci., 36, 1 (1954).

35. P.A. Garcia Ruiz, A. Soler y F. Barba; An. Quim., 71, 391 (1975).

36. J.K.N. Jones; J. Chem. Soc., 1672 (1953).

37. W.E. Trevelyan, D.P.Procter y J.S. Harrison; Nature, 166, 444 (1950).

38. R.W. Bailey; J. Chromatog., 8, 57[illegible] (1962).

39. H.R. Bolliger, M. Brenner, H. Gänshirt, H.K. Mangold, H. Seiler, E. Stahl y D. Waldi; "Thin-Layer Chromatography". Academic Press Inc. New York, (1965).

40. C.C. Sweeley, R. Bentley , M. Makita y W.W. Wells; J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963).

41. C.C. Sweeley, M. Makita, R. Bentley y W.W.Wells; Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 14 (1963).

42. C.T. Bishops; Advanc. Carbohyd. Chem., 19, 95 (1964).

43. J. H. Sloneker; "Biomedical Applications of Gas -- Chromatography". H.A. Szymanski, ed. Plenum Press, New York, 2, 87 (1968).

44. K.M. Brobst y C.E. Lott Jr.; Cereal Chem., 43, 35 (1969).

45. P.K. Davison y R. Young; J. Chromatog., 41, 12 (1969).

46. K.M. Brobst y C.E. Lott Jr; Amer. Soc. Brew. Chem. Proc., 71 (1966).

47. L. Marinelli y D. Whitney; J. Inst. Brew.,73, 35 - (1967).

48. S.W. Gunner, J.K.N. Jones y M.B. Perry; Chem. Ind. (Londres), 255 (1961).

49. S.W. Gunner, J.K.N. Jones y M.B. Perry; Can. J. Chem. 39, 1892 (1961).

50. J.S. Sawardeker, J.H. Sloneker y A. Jeanes; Anal. Chem., 37, 1602 (1965).

51. P. Albersheim, D.J. Nevins, P.D. English y A. Karr; Carbohyd. Res., 5,340 (1967).

52. E.P. Crowell y B.B. Burnett; Anal. Chem., 39, 121 (1967).

53. K. Kringstad y Ö. Ellefsen; Papier, 18, 583 (1964).

54. S.A. Barker, P. Finch, M.H.B. Hayes, R.G. Simmonds y M. Stacey; Nature, 205, 68 (1965).

55. S.A. Barker, M.H.B. Hayes, R.G. Simmons y M. Stacey; Carbohyd. Res., 5, 13 (1967).

56. S.A. Barker, S.M. Bick, J.S. Brimacombe y P.J. Somers; Carbohyd. Res. , 1, 393 (1966).

57. E. Romanowska; Anal. Biochem., 33, 383 (1970).

58. E.G. Brunngraber y B.D. Brown; Biochem. J., 103, 65 (1967).

59. J.H. Roe; J. Biol. Chem., 212, 335 (1955).

60. T. Bitter y H.M. Muir; Anal.Biochem., 4, 330 (1962).

61. J.S.D. Bacon, A.H. Gordon, E.J. Morris y V.C. Farmer; Biochem. J., 149, 485 (1975).

62. R.D. Hartley; J. Sci. Food Agric., 23, 1347 (1972).

63. R.D. Hartley; Phytochemistry, 12, 661 (1973).

64. I.M. Morrison; Carbohyd. Res., 57, C4 (1977).

65. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith; Nature, 168, 167 (1951).

66. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith; Anal. Chem., 28, 350 (1956).

67. D.M.W. Anderson y J.F. Stoddart; Anal. Chim. Acta, 34, 401 (1966).

68. D.M.W. Anderson, I.C.M. Dea, S. Rahman y J.F. Stoddart; Chem. Commun., 145 (1965).

69. K.A. Granath y B.E. Kvist; J.Chromatog., 28, 69 - (1967).

70. S.C. Churms y A.M. Stephen; S. Afr. Med. J., 43, - 124 (1969).

71. J. Porath y P. Flodin; Nature, 183, 1657 (1959).

72. K.A. Granath y P. Flodin; Makromol. Chem., 48, 160 (1961).

73. T.C. Laurent y K.A. Granath; Biochim. Biophys. Acta, 136, 191 (1967).

74. B.C.W. Hummel y D.C.Smith; J.Chromatog., 8, 491 -- 1962.

75. I.Bremner, J.S.G. Cox y G.F. Moss; Carbohyd. Res., 11, 77 (1969).

76. D.M.W. Anderson y J.F. Stoddart; Carbohyd. Res., 2, 104 (1966).

77. D.M.W. Anderson, Sir Edmund Hirst y J.F. Stoddart; J. Chem. Soc.(C), 1959 (1966).

78. D.M.W. Anderson y I.C.M. Dea; Carbohyd. Res., 6, - 104 (1968).

79. D.M.W. Anderson, I.C.M. Dea y R.N. Smith; Carbohyd. Res. 7, 320 (1968).

80. D.M.W. Anderson y I.C.M. Dea; Carbohyd. Res., 8, - 440 (1968).

81. D.M.W. Anderson y I.C.M. Dea; Carbohyd. Res., 8, - 448 (1968).

82. D.M.W. Anderson, I.C.M. Dea y Sir Edmund Hirst; -- Carbohyd. Res.,8, 460 (1968).

83. D.M.W. Anderson y A.C. Munro; Carbohyd. Res., 11, 43 (1969).

84. P.I. Bekker, S.C. Churms, A.M. Stephen y G.R. Woolard; Tetrahedron, 25, 3359 (1969).

85. D.M.W. Anderson, I.C.M. Dea y A.C. Munro; Carbohyd. Res., 9, 363 (1969).

86. B.V. Ettling y M.F. Adams; Tappi, 51, 116 (1968).

87. B.W. Simson, W. A. Cote, Jr., y T.E. Timell; Svensk Papperstidn., 71, 699 (1968).

88. H. A. Swenson, H.M. Kaustinen, J.J. Bachhuber y J. A. Carlson; Macromolecules, 2, 142 (1969).

89. P. Nordin; Arch. Biochem. Biophys., 99, 101 (1962).

90. J. Heller y M. Schramm; Biochem. Biophys. Acta, 81, 96 (1964).

91. H.K. Tong, K.H. Lee y H.A. Wong; Carbohyd, Res., 81, 1 (1980).

92. S.C. Churms, E.H. Merrifield y A.M. Stephen; Carbo hyd. Res., 81, 49 (1980).

93. S.C. Churms y A.M. Stephen; Carbohyd. Res., 15, 11 (1970).

94. J.F. Saeman, W.F. Moore, R.L. Mitchell y M.A. Millett; Tappi, 37, 336 (1954).

95. E. Salkowski; Z. Physiol. Chem., 34, 162 (1901).

96. E. Salkowski; Z. Physiol. Chem, 35, 240 (1902).

97. C.T. Bishop, G.A. Adams y E.O. Hughes; Can. J. --- Chem., 32, 999 (1954).

98. E.S. Amin; J. Chem. Soc., 282 (1955).

99. E.L. Hirst y S. Dunstan; J. Chem. Soc., 2332 (1953).

100. D.G. Easterby y J.K.N. Jones; Nature, 165, 614 --- (1950)..

101. G.G.S. Dutton y F. Smith; J. Am. Chem. Soc., 78, - 2505 (1956).

102. J.K.N. Jones y T.J. Painter; J. Chem. Soc., 669 -- (1957).

103. J.K. Jones y T.J. Painter; J. Chem. Soc., 573 (1959).

104. M.K. Ewart y R.A. Chapman; Anal. Chem., 24, 1460 (1952).

105. H. Meier; Acta Chem, Scand., 12, 144 (1958).

106. H. Meier; Acta Chem. Scand., 12, 1911 (1958).

107. J.K. Hamilton y N.S . Thompson; Pulp. Paper Mag. Can., 59, (10), 233 (1958).

108. M.O. Gyaw y T.E. Timell; Can. J. Chem., 38, 1957 (1960).

109. T.E. Timell; Svensk Papperstidn., 63, 472 (1960).

110. T.E. Timell; Svensk Papperstidn., 64, 651 (1961).

111. H.O. Bouveng y H. Meier; Acta Chem. Scand., 13, -- 1884 (1959).

112. L. Rosenfeld y C.E. Ballou; Carbohyd. Res., 32, -- 287 (1974).

113. P.A.J. Gorin y A.S. Perlin; Can. J. Chem., 34, 1796 (1956).

114. J.K.N. Jones y W.H. Nicholson; J. Chem. Soc., 27, (1958).

115. Y.C. Lee y C.E. Ballou; Biochemistry, 4, 257 (1965).

116. K. Matsuda, H. Watanabe, K. Fujimoto y K. Aso; Nature, 191, 278 (1961).

117. M. Torii, E.A. Kabat y S. Beychok; Arch. Biochem. Biophys., 103, 283 (1963).

118. H. Suzuki y E.J. Hehre; Arch. Biochem. Biophys., - 104, 305 (1964).

119. D. Abbot y H. Weigel; J. Chem. Soc., (C), 816 (1966).

120. B.A. Lewis, M.J. St.Cyr y F. Smith; J. Org. Chem., 33, 3139 (1968).

121. K. Sakakibara, M. Torii, A. Misaki y H. Miyaji; Carbohyd. Res., 25, 443 (1972).

122. M.L. Wolfrom, J.T. Tyree, T.T. Galkowski y A.N. -- O'Neill; J. Am. Chem. Soc., 73, 4927 (1951).

123. A. Thompson, M.L. Wolfrom y E.J. Quinn; J. Am. Chem. Soc., 75, 3003 (1953).

124. M.L. Wolfrom y N.E. Franks; Methods. Carbohyd. Chem. 4, 269 (1964).

125. K.J. Schaffer y P.G. Morel du Boil; J. Chromatog., 72, 212 (1972).

126. D. French y G.M. Wild; J. Am. Chem. Soc., 75, 2612 (1952).

127. A.J. Mian y T.E. Timell; Can. J. Chem., 38, 1511 (1960).

128. S.C. Churms y A.M. Stephen; Carbohyd. Res., 21, 91 (1972).

129. S.C. Churms y A.M. Stephen; Carbohyd. Res., 35, 73 (1974).

130. A. Jeanes, C.S. Wise y R.J. Dimler; Anal. Chem., 25, 415 (1951).

INDICE

1. INTRODUCCION..... 5
2. POLISACARIDOS EN TEJIDOS VEGETALES..... 8
2.1. Naturaleza y nomenclatura..... 8
2.2. Aislamiento y purificación..... 12
3. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA.VARIEDAD "MANZANILLA". POLISACARIDOS SOLUBLES EN AGUA..... 16
3.1. Aislamiento de polisacáridos solubles en agua. Muestra A..... 17
3.1.1. Preparación de la pulpa..... 17
3.1.2. Análisis..... 17
3.1.3. Extracción con agua. Fracción A-1..... 18
3.1.4. Identificación y determinación cuantitativa de monosacáridos y ácidos urónicos..... 19
3.1.4.1. Hidrólisis..... 19
3.1.4.2. Cromatografía sobre papel..... 19
3.1.4.3. Cromatografía gas-líquido..... 22
3.2. Purificación de los polisacáridos solubles en agua por cromatografía sobre geles porosos. Fracciones A-1-1 y A-1-2..... 34
3.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos en la fracción A-1-1..... 41
3.2.2. Determinación de ácido galacturónico en la fracción A-1-1..... 44
3.2.3. Identificación y determinación de monosacáridos en la fracción A-1-2..... 48

3.2.4. Determinación de ácido galacturónico en la fracción A-1-2..... 48
3.3. Aislamiento de polisacáridos solubles en agua. --- Muestra B..... 51
3.3.1. Preparación de la pulpa..... 51
3.3.2. Extracción con agua. Fracción B-1..... 52
3.3.3. Extracción con agua caliente. Fracción B-2..... 53
3.3.4. Tratamiento con metóxido sódico y extracción con agua caliente. Fracción B-3..... 53
3.4. Cromatografía de filtración sobre geles porosos... 54
3.4.1. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-50..... 60
3.4.2. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephadex G-75..... 63
3.4.3. Cromatografía de la fracción B-1 sobre Sephacryl S-300..... 66
3.4.4. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-50..... 70
3.4.5. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephadex G-75..... 70
3.4.6. Cromatografía de la fracción B-2 sobre Sephacryl S-300..... 75
3.4.7. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-50..... 78
3.4.8. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephadex G-75..... 81

3.4.9. Cromatografía de la fracción B-3 sobre Sephacryl S-300..... 83
3.5. Determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración sobre geles porosos de los polisacáridos solubles en agua..... 87
3.5.1. Determinación de los pesos moleculares de los polisacáridos solubles en agua. Fracciones B-1, -- B-2 y B-3..... 90
3.5.1.1. Calibrado de la columna de Sephacryl S-300..... 92
3.5.1.2. Calibrado de la columna de Sepharosa 2B..... 93
3.5.2. Peso molecular medio..... 95
3.5.2.1. Peso molecular medio de la fracción B-1..... 95
3.5.2.2. Peso molecular medio de la fracción B-2.....101
3.5.2.3. Peso molecular medio de la fracción B-3.....107
4. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "MANZANILLA". POLISACARIDOS SOLUBLES EN ALCALI.....113
4.1. Aislamiento de polisacáridos solubles en KOH al -- 0,5%. Fracción A-2.....114
4.1.1. Identificación y determinación cuantitativa de - monosacáridos. Fracción A-2.....114
4.2. Aislamiento de la hemicelulosa B. Fracción A-3....118
4.2.1. Identificación de monosacáridos.....119
4.2.2. Purificación de la hemicelulosa B. Precipitación fraccionada con etanol. Fracciones A-3-1 y A-3-2.....120
4.2.2.1. Determinación cualitativa y cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción --- A-3-1-..... 121

4.2.2.2. Determinación cualitativa y cuantitativa de monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción -- A-3-2.....124

4.3. Aislamiento de hemicelulosas A y B. Fracciones B-4 y B-5.....127

4.3.1. Identificación y determinación cuantitativa de - monosacáridos en la hemicelulosa A. Fracción B-4.129

4.3.2. Identificación y determinación cuantitativa de - monosacáridos en la hemicelulosa B.Fracción B-5.133

4.4. Aislamiento de la hemicelulosa B. Fracción B-6....136

4.4.1. Identificación y determinación cuantitativa de -139 monosacáridos en la hemicelulosa B. Fracción B-6.

4.4.2. Purificación de la hemicelulosa B. Fracción B-6. Precipitación fraccionada con etanol.....,142

4.4.3. Purificación de la hemicelulosa B. Fracción B-6. Precipitación con $Ba(OH)_2$.....142

4.5. Estructura de la hemicelulosa A. Fracción B-4.....143

4.5.1. Hidrólisis con ácido sulfúrico.....145

4.5.2. Hidrólisis con ácido trifluoroacético.....146

4.5.3. Acetolisis de la hemicelulosa A. Fracción B-4...147

4.5.3.1. Análisis de los oligosacáridos por cromatografía sobre papel.....150

4.5.3.2. Aislamiento de la celobiosa por cromatografía de papel.....152

4.5.3.3. Identificación de la celobiosa por cromatografía gas-líquido.....156

4.6. Estructura de la hemicelulosa B. Fracción B-6.....159
4.6.1. Cromatografía de filtración sobre geles porosos.159
4.6.1.1. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-50.....159
4.6.1.2. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephadex G-75.....162
4.6.1.3. Cromatografía de la fracción B-6 sobre Sephacryl S-300.....165
4.6.2. Peso molecular medio de la fracción B-6.....168
4.6.3. Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción B-6.....172
4.6.3.1. Hidrólisis parcial con H_2SO_4 0,01N y 0,1N.....172
4.6.3.2. Interpretación de los resultados.....186
4.6.4. Acetolisis de la hemicelulosa B. Fracción B-6...189
4.6.4.1. Aislamiento e identificación de los polisacáridos.....190
5. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "GORDAL". POLISACARIDOS SOLUBLES EN AGUA.....192
5.1. Aislamiento de los polisacáridos solubles en agua.192
5.1.1. Preparación de la pulpa.....192
5.1.2. Extracción con agua. Fracción C-1.....192
5.1.3. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos y ácidos urónicos en la fracción C-1.....193
5.2. Peso molecular medio de la fracción C-1.....199

6. POLISACARIDOS EN LA ACEITUNA. VARIEDAD "GORDAL" POLI SACARIDOS SOLUBLES EN ALCALI.....203

6.1. Aislamiento de la hemicelulosa B.....203

6.2. Fraccionamiento de la hemicelulosa B. Polisacáridos que forman complejos insolubles con sales de Cu(II). Fracción C-2.....204

6.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos de la hemicelulosa B. Fracción C-2.....204

6.2.2. Peso molecular medio de la hemicelulosa B. Fracción C-2.....205

6.2.3. Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción C-2.....211

6.2.4. Interpretación de los resultados.....222

6.3. Fraccionamiento de la hemicelulosa B.Polisacáridos que no forman complejos insolubles con sales de Cu (II). Fracción C-3.....224

6.3.1. Identificación y determinación cuantitativa de los monosacáridos de la hemicelulosa B. Fracción C-3.....225

6.3.2. Peso molecular medio de la hemicelulosa B. Fracción C-3.....225

6.3.3. Hidrólisis parcial de la hemicelulosa B. Fracción C-3.....231

6.3.4. Interpretación de los resultados.....241

7. CONCLUSIONES.....242

BIBLIOGRAFIA.....246

INDICE.....257

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Antonio Miguel Gil Serrano titulada: Polisacáridos en aceitunas de las Variedades "Manzanilla y Gordal". Aislamiento y purificación

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"

Sevilla, 2 de octubre 1.981

El Vocal, El Vocal, El Vocal,

El Presidente, El Secretario, El Doctorado,