

X
468

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICA

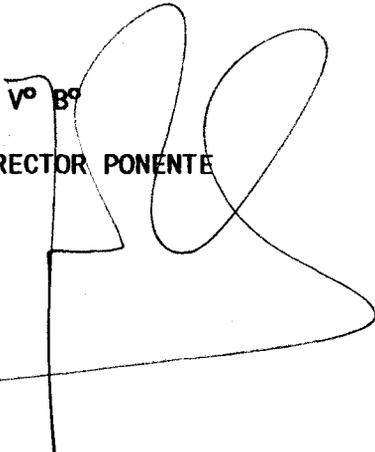
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR DE ACEITUNAS, VARIEDAD
HOJIBLANCA: ACCION DE GLICOSIDASAS

Memoria presentada por el Ldo
RAFAEL GUILLEN BEJARANO para
optar al grado de Doctor en
Ciencias Químicas.

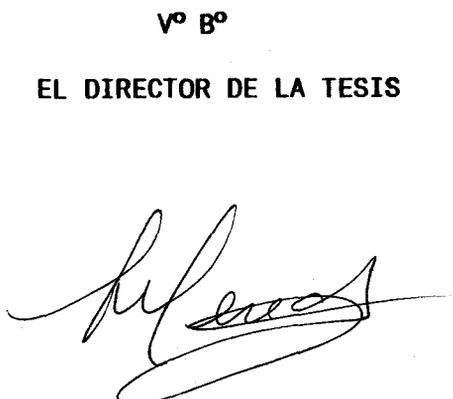
Sevilla, Octubre 1990



Vº Bº


EL DIRECTOR PONENTE

f/ Dr. D. Juan Pereda Marin

Vº Bº


EL DIRECTOR DE LA TESIS

f/ Dr. Dª Antonia Heredia Moreno

Juan Pereda Marín, Catedrático del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Químicas de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que los trabajos correspondientes a la Tesis Doctoral presentada por Rafael Guillén Bejarano han sido realizados en su totalidad en este Departamento y en la Unidad de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa y sus Derivados.



Sevilla, Octubre 1990.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en el Dpto. Ing. Química Queda registrada esta Tesis Doctoral
de la Facultad de Química al folio 87 número 117 del libro
de esta Universidad desde el día 3/10/90 correspondiente. 26 SET. 1990
hasta el día 25/10/90. Sevilla.

Sevilla 3 de Octubre de 1990

EL DIRECTOR DE

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alba Lafitte

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Juan Pereda Marin, Catedrático de Química Industrial, Director ponente, por sus valiosas orientaciones y sugerencias aportadas.

A la Dra. D^a Antonia Heredia Moreno, Investigador Científico del Instituto de la Grasa y sus Derivados, Directora de la Tesis, por su eficaz dirección y continuo estímulo y apoyo.

A D^a Ana Jiménez Araujo, Licenciada en Farmacia, por su constante e incansable ayuda en todos los aspectos relacionados con esta Tesis.

Al Dr. D. Juan Fernández Bolaños, por sus orientaciones y valiosa ayuda.

A D^a Blanca Felizón Becerra, Licenciada en Farmacia, por su inestimable ayuda en el desarrollo del trabajo experimental.

A D. Enrique Longay Martín y D^a Magdalena Arregui Dominguez quienes, aparte de su entrañable amistad, me han brindado todo tipo de facilidades y ayuda para la toma de muestra en la finca de su propiedad.

A D. Javier Moreno Onorato, Profesor Titular de Citología y Biología vegetal, por la realización de las fotografías de microscopía

electrónica.

A D^a Elena Cabello, Auxiliar de Investigación, por su colaboración en el trabajo experimental.

Al Dr. D. Antonio Garrido Fernández, Profesor de Investigación, director de la Unidad de Biotecnología de Alimentos, así como al resto del personal de dicha Unidad con cuya colaboración he contado en todo momento.

A mis padres

INDICE

INDICE

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICO

2.1. PARED CELULAR	4
2.1.1. Composición química	7
2.1.1.1. Celulosa	7
2.1.1.2. Sustancias pécticas	9
2.1.1.3. Hemicelulosas	18
2.1.1.4. Glicoproteínas	21
2.1.1.5. Lignina	24
2.1.2. Análisis y aislamiento de los componentes de la pared celular	28
2.1.2.1. Métodos de determinación de celulosa	29
2.1.2.2. Métodos de determinación de hemicelulosas	31
2.1.2.3. Métodos de determinación de sustancias pécticas	31
2.1.2.4. Determinación de lignina	36
2.1.2.5. Métodos de fraccionamiento	37
2.1.2.6. Métodos de aislamiento	41
2.1.3. Evolución de los componentes de la pared celular durante la maduración y almacenamiento de algunos frutos	43

2.2. GLICOSIDASAS Y SU RELACION CON EL ABLANDAMIENTO
DE FRUTOS

51

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MUESTRAS UTILIZADAS	57
3.1.1. Preparación de la muestra	57
3.2. HUMEDAD	57
3.3. GRASA	59
3.4. NITROGENO PROTEICO	60
3.5. AZUCARES LIBRES	63
3.6. TEXTURA DEL FRUTO	64
3.7. ACTIVIDADES ENZIMATICAS	65
3.7.1. Extracción de glicosidasas	66
3.7.2. Medida de actividades enzimáticas	67
3.7.3. Extracción de enzimas celulolíticos	69
3.7.4. Medida de la actividad celulolítica	69
3.7.5. Extracción de poligalacturonasa	71
3.7.6. Medida de la actividad de poligalacturonasa	71
3.8. ANALISIS DE LA PARED CELULAR	72
3.8.1. Residuo insoluble en alcohol	72
3.8.2. Aislamiento de pared	73
3.8.3. Fraccionamiento de pared	74
3.8.3.1. Fracción soluble en agua fria	75
3.8.3.2. Fracción soluble en agua caliente	75
3.8.3.3. Fracción soluble en oxalato amónico	76
3.8.3.4. Delignificación	76
3.8.3.5. Extracción de hemicelulosas	77

3.9. CUANTIFICACION DE AZUCARES NEUTROS	78
3.9.1. Hidrólisis	78
3.9.2. Determinación por cromatografía gaseosa	79
3.10. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION SOBRE GEL	81
3.11. MICROSCOPIA ELECTRONICA	84
4. RESULTADOS	
4.1. ASPECTO DE LA PARED CELULAR AL MICROSCOPIO ELECTRONICO	89
4.2. GLICOSIDASAS	92
4.2.1. Condiciones óptimas para la medida de actividades de glicosidasas	92
4.2.1.1. Extracción de los enzimas	92
4.2.1.2. Tiempo de incubación	94
4.2.1.3. Concentración del enzima	94
4.2.1.4. Concentración de iones H ⁺	101
4.2.1.5. Temperatura	106
4.2.1.6. Fuerza iónica del medio	117
4.2.2. Evolución de actividades enzimáticas durante la maduración	124
4.2.3. Determinación de pesos moleculares	135
4.3. EVOLUCION DE LOS COMPONENTES DEL FRUTO DURANTE LA MADURACION	142
4.3.1. Humedad	142
4.3.2. Relación pulpa hueso	143
4.3.3. Materia grasa	143
4.3.4. Proteínas	143
4.3.5. Textura	152

4.3.6. Azúcares neutros de pared	156
4.4. PARED CELULAR	165
4.4.1. Fracciones de pared	165
4.4.2. Distribución de pesos moleculares	168
5. CONCLUSIONES	
6. BIBLIOGRAFIA	

1.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS

INTRODUCCION

Uno de los principales caracteres organolépticos de los alimentos vegetales, que puede determinar su aceptabilidad o rechazo, es la textura. Por esta razón, entre los objetivos más importantes de su conservación y procesado industrial, figura el de mantener esta dentro de unos márgenes que sean aceptables comercialmente.

Parece evidente que el proceso de pérdida de textura, aún cuando no está totalmente dilucidado, está asociado a modificaciones de los polímeros que constituyen la pared celular, que es la encargada de dar consistencia a la célula. Estas modificaciones pueden ser debidas a acciones enzimáticas, si se trata de productos en fresco, o a la acción conjunta de enzimas y otros agentes químicos tales como álcalis, ácidos etc., si se refiere a productos procesados industrialmente. El conocimiento de estas modificaciones y sus causas constituye un tema de investigación básico-aplicada del mayor interés, por las repercusiones que tiene sobre la calidad de los alimentos vegetales y sobre la economía de los procesos.

La pared celular contiene moléculas de celulosa organizadas en fibrillas y rodeadas de una matriz de pectinas, hemicelulosas y lignina. Los detalles estructurales son poco conocidos y no está determinada exactamente la forma en que están asociados los distintos polímeros. Hasta el momento los únicos datos que aparecen confirmados son que la celulosa se halla rodeada de una cubierta de xiloglucano, unidos a ella por enlaces de hidrógeno, y que algunas cadenas

laterales (normalmente galactanos y arabinogalactanos) de las sustancias pécticas actúan de nexos de unión de éstas con la celulosa dando así coherencia a la pared celular.

Hasta hace algunos años los enzimas más estudiados en relación con el ablandamiento de frutos eran los pectinolíticos. Sin embargo, a medida que se profundiza en el conocimiento de la estructura de la pared, aparecen más evidencias experimentales que indican que su degradación es un proceso complejo que requiere la acción conjunta de estos enzimas con hemicelulasas, celulasas y glicosidasas. En la mayoría de frutos estudiados hasta ahora (manzanas, fresas, tomates mango, pepinillos, kiwi, papaya, pera etc.) se encuentra un modelo de cambio común durante la maduración caracterizado por un periodo inicial en el que se produce una importante pérdida de galactosa y arabinosa sin que haya degradación aparente de las cadenas de poligalacturonanos, seguido de una disminución de la longitud de las cadenas de ácido poligalacturónico. Este hecho lleva a pensar que previa a la solubilización de las sustancias pécticas, debe existir una reducción importante de las cadenas laterales de estos polímeros, siendo los responsables los enzimas glicosidasas y hemicelulasas.

En la unidad Estructural de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa y sus Derivados, se lleva varios años estudiando los posibles enzimas que inciden en el ablandamiento de aceituna de mesa, tanto pectinolíticos como celulolíticos. Dentro de esta línea de

investigación el presente trabajo se centra en estudiar los cambios que se producen en los componentes de las paredes celulares de vegetales, así como en determinar la posible incidencia de hemicelulasas y glicosidasas en el proceso de degradación de dicha pared. Este estudio contribuirá a dilucidar los mecanismos enzimáticos implicados en la degradación y abordar más efectivamente la resolución de los problemas que, a escala industrial, presenta la pérdida de textura de la aceituna de mesa.

OBJETIVOS

1.- Estudiar las modificaciones que sufren los polisacáridos de la pared celular de la aceituna durante su maduración.

2.- Examinar los enzimas implicados en la degradación de dichos polisacáridos.

3.- Relacionar las modificaciones de la pared celular con los cambios de textura.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1.- PARED CELULAR

Las células vegetales presentan, rodeando a la membrana plasmática, otra muy gruesa y consistente (hecho que no ocurre en las células animales) que recibe el nombre de pared celular. Es una estructura dinámica en cuanto a su composición, forma y propiedades, que va cambiando como respuesta al crecimiento de la planta, estado de diferenciación, desarrollo de las células y función de las mismas.

La pared celular constituye un sistema tampón entre el medio y el contenido protoplasmático que interviene de múltiples formas en la vida de los tejidos y de los órganos. Es el compartimento de donde el citoplasma toma las diversas sustancias necesarias para su metabolismo y excreta los compuestos que elabora. Permeable al agua y a los metabolitos, la pared se opone a la presión osmótica interna y asegura la turgencia y el mantenimiento del organismo. La pared de células jóvenes de tejido meristemático es capaz de crecer en longitud de forma muy rápida, esto le obliga a ser al mismo tiempo resistente y extensible, lo que implica una organización y unos mecanismos reguladores muy precisos. Una vez que el crecimiento ha cesado, tienen lugar unas modificaciones estructurales y químicas que contribuyen a dar a la célula su especificidad funcional dentro de un determinado tipo de tejido.

Constituye una capa relativamente gruesa, pudiendo llegar a medir varias micras de espesor, de un orden de magnitud de 10^4 Å, mientras que el plasmalema tiene un espesor del orden de 100 Å.

El microscopio fotónico permite distinguir tres zonas bien diferenciadas en la pared de una célula desarrollada: *lámina media*, *pared celular primaria* y *pared celular secundaria* (Figura 1).

La lámina media se forma durante la citocinesis o división del citoplasma, etapa final del proceso de la división celular, constituyendo un tabique separador de las células hijas, el cual crece en diámetro hasta establecer contacto con la lámina media de la célula madre. Es muy rica en pectinas y no presenta ningún tipo de ordenación de las moléculas, es coloidal y ópticamente inactiva.

Una vez formada la lámina media empiezan a depositarse a ambos lados de la misma otros hidratos de carbono, fundamentalmente celulosa, segregados por las dos células hijas contiguas que están separadas por aquella, formándose la pared celular primaria. Al mismo tiempo que se da un engrosamiento de la pared, se tiene que dar un crecimiento en superficie para permitir el de la célula. El mecanismo según el cual se produce es complejo y no es aún totalmente conocido precisándose de la acción de diversas hormonas vegetales. En la pared primaria, al igual que ocurre en la lámina media, no existe una ordenación de las moléculas, por lo cual es también ópticamente inactiva.

Cuando la célula ha dejado de crecer, pueden empezar a depositarse sobre la pared primaria cubiertas de celulosa en las cuales las fibras se disponen con una orientación determinada,

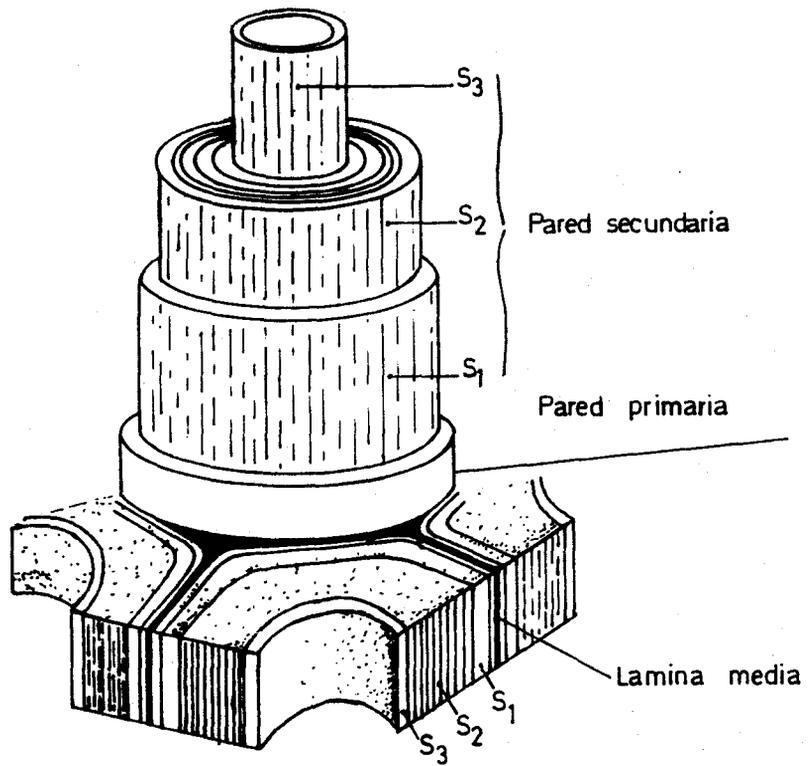


Figura 1.- Esquema de las distintas regiones de la pared celular.

formándose la pared secundaria. Son paredes suplementarias, cuya función primordial es mecánica (Monties, 1980) (Figura 2).

2.1.1.- Composición química.

Desde el punto de vista químico, los principales constituyentes de la pared se pueden clasificar en a) *Polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas)*, b) *Glicoproteínas*, c) *Ligninas y ésteres fenólicos* y d) *Complejos lipídicos (gomas, cutina y suberina)*.

La proporción relativa y la composición de los distintos polímeros varía ampliamente, dependiendo del tipo de planta analizada, del tejido y del grado de desarrollo de la célula.

2.1.1.1.- Celulosa.

La mayor parte de la química de la celulosa se ha estudiado en algodón y madera. La estructura básica, esquematizada en la figura 1, está constituida por residuos de β -D-glucosa unidos mediante enlaces glicosídicos desde el carbono 1 de un residuo al carbono 4 del contíguo. En cada unidad de glucosa el hidrógeno del grupo -OH del carbono 3 está próximo al oxígeno del adyacente, formándose un enlace de hidrógeno que ayuda a estabilizar la cadena intramolecularmente. Por otra parte, se produce una asociación intercadenas entre el O-6 de un residuo y el oxígeno del enlace glicosídico (O-1) entre moléculas

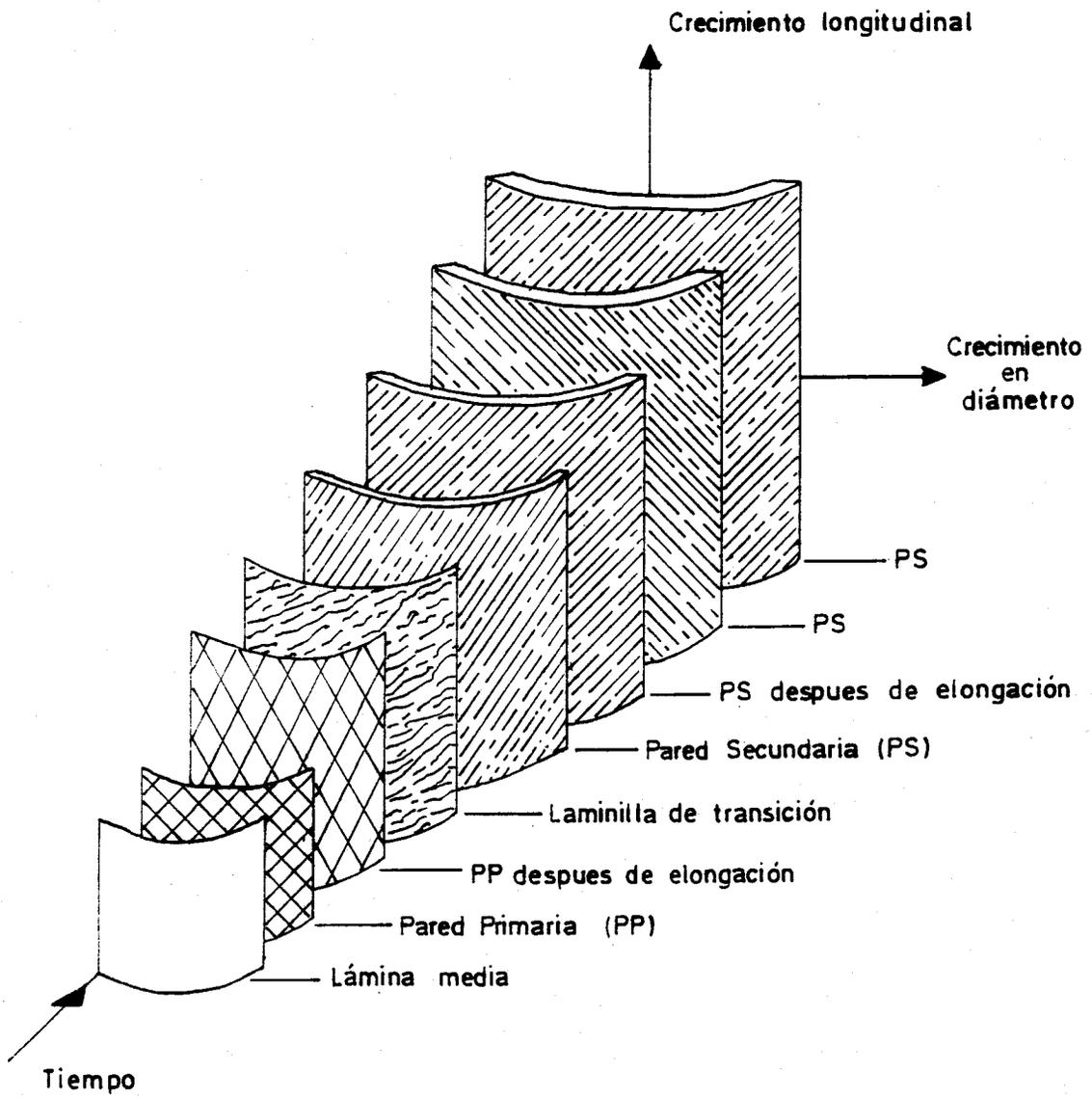


Figura 2.- Representación esquemática del crecimiento longitudinal y en diámetro de la pared celular.

de glucosa en cadenas adyacentes (Figura 3).

En la naturaleza, las moléculas de celulosa se unen de una manera ordenada dentro de la microfibrilla. Las regiones cristalinas de la microfibrilla pueden alcanzar longitudes de 800-1200 Å y un diámetro de 50-100 Å, en tanto que el núcleo cristalino tiene un diámetro de alrededor de 40 Å. La longitud de las cadenas individuales es probablemente mucho mayor, puesto que el grado de polimerización de la celulosa va desde 8000 a 12000, lo que corresponde a una longitud de cadena de 40000 Å a 60000 Å y a un peso molecular de más de un millón. Por lo tanto, se supone que las cadenas de celulosa pasan sucesivamente de regiones altamente cristalinas a regiones amorfas de un bajo grado de ordenamiento (Figura 4). Las proporciones de celulosa cristalina a amorfa son probablemente de considerable importancia a la hora de explicar las diferencias en propiedades entre la celulosa en la pared primaria y secundaria. Este aspecto también puede ser interesante al estudiar los cambios que se producen en las propiedades de la pared celular de frutos y vegetales, tema este que hasta el momento ha sido poco investigado.

2.1.1.2.- Sustancias pécticas.

Son una mezcla compleja de polisacáridos coloidales que pueden extraerse de la pared celular con agua o con disoluciones de agentes quelatantes, tales como AEDT, oxalato amónico o hexafosfato de sodio. La cantidad que se extrae varía desde 0,5-1,5% en las paredes

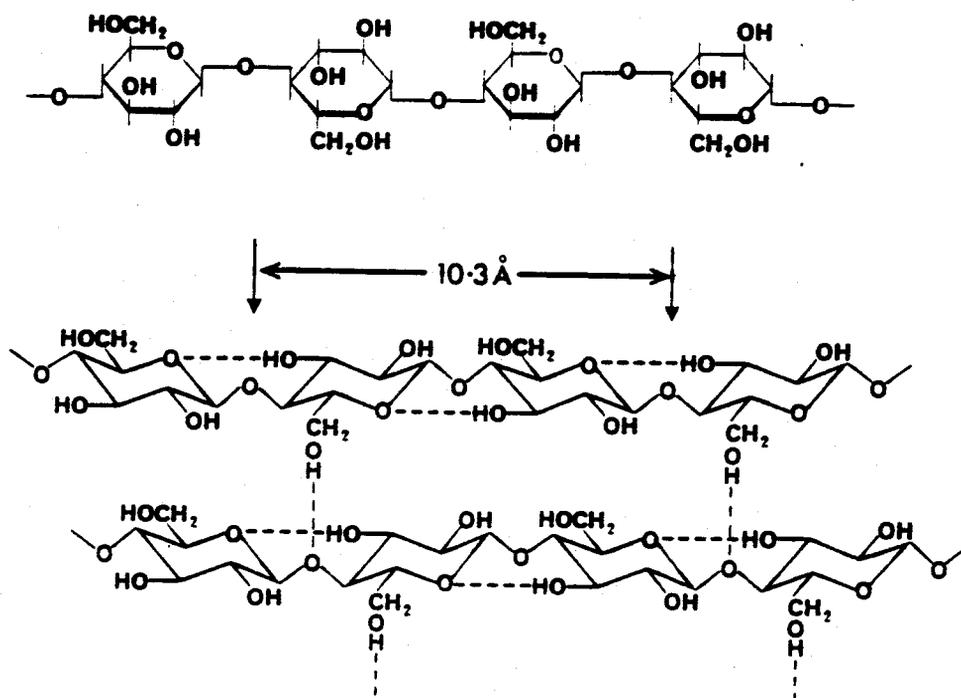


Figura 3.- Estructura básica de las cadenas de celulosa.

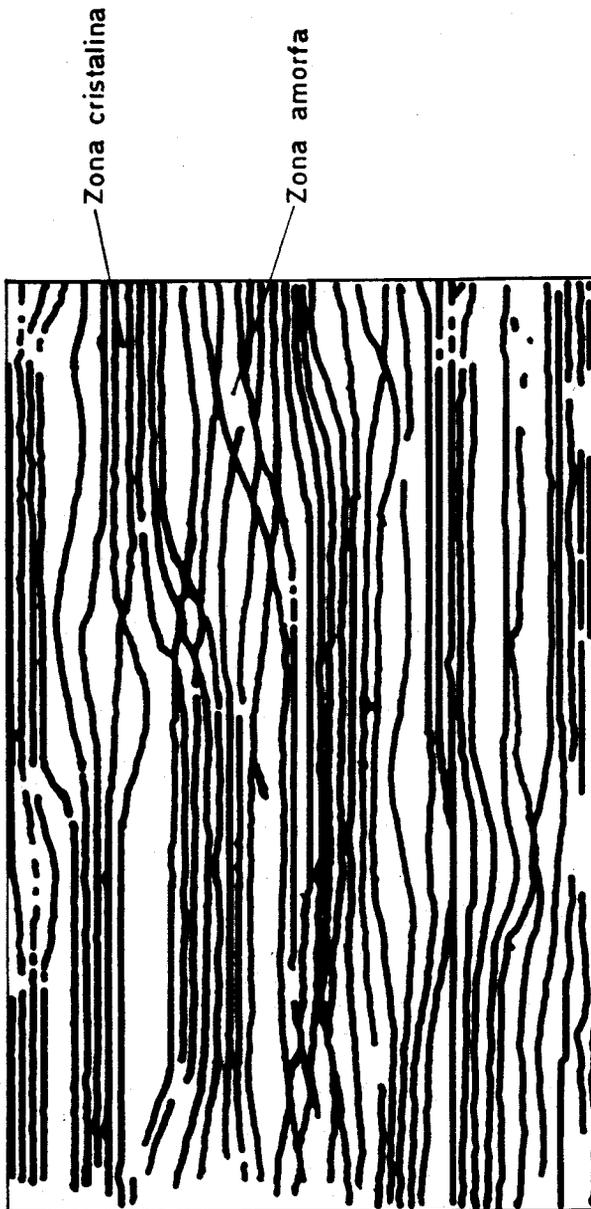


Figura 4.- Esquema de la ordenación de las cadenas de celulosa en la pared celular.

de tejidos altamente lignificados hasta 20-30% en la de tejidos meristemáticos y parenquimáticos. Incluso en estos últimos, sólo pueden extraerse alrededor del 60-80% del total de sustancias pécticas (Albersheim, 1980).

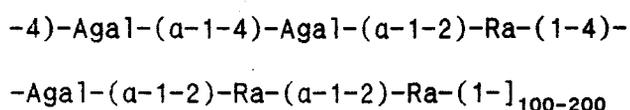
Lo más característico de los polisacáridos pécticos son los residuos de ácido galacturónico, poseyendo además residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente, la ramnosa forma parte de la cadena principal del polisacárido, mientras que arabinosa y galactosa se encuentran en cadenas laterales de galactanos y arabinanos, unidos covalentemente a la principal. Parte de la arabinosa y galactosa constituyen cadenas laterales de arabinogalactano, pero es posible que estos no se encuentren unidos por enlace covalente a la principal.

No se han aislado polisacáridos que contengan sólo ramnosa y ácido galacturónico, ya que siempre tienen otros azúcares unidos a ellos covalentemente. Sin embargo, se piensa que la cadena principal de los polisacáridos pécticos está compuesta de ramnogalacturonanos, de los que se han aislado dos, que se distinguen por la nomenclatura I y II.

El conocimiento que se posee actualmente sobre la estructura del *ramnogalacturonano I*, se ha obtenido a través del estudio de fragmentos originados en la hidrólisis ácida parcial y en la acetólisis (Darvill et al., 1985). La ramnosa parece que se encuentra unida en un 50% a través de sus carbonos 1 y 2 y en otro 50% mediante

los 2 y 4. Generalmente, se cree que el carbono 4 de la ramnosa es un punto de enlace de otros residuos glicosídicos; sin embargo, todavía no se ha establecido la forma en la que los oligosacáridos que han sido caracterizados se encuentran unidos en el ramnogalacturonano intacto.

Mc Neil et al. (1980; 1982), a partir de cultivos de Sycamore, han encontrado que el ramnogalacturonano I contiene, además de residuos de ramnosa y ácido galacturónico, importantes cantidades de arabinosa y galactosa, siendo la relación ramnosa:ácido galacturónico:arabinosa:galactosa de 1:2:1.5:1.5. Posee un grado de polimerización aproximado de 2000. Si la cadena principal es lineal simple, entonces esta contiene 300 residuos de ramnosa y 600 de ácido galacturónico. La estructura que proponen para este polisacárido se puede esquematizar de la siguiente forma:



El *ramnogalacturonano II* se aisló por primera vez de cultivos celulares de Sycamore (*Darvil et al.* 1978). Su hidrólisis origina los azúcares 2-o-metilfucosa, 2-o-metilxilosa y apiosa. Su solubilización se consigue por acción de una endo-1-4-galacturonasa y contiene entre 25 y 50 residuos de azúcares. Se caracteriza por una amplia variedad de residuos terminales como ácido galacturónico, galactosa, arabinosa, 2-o-metilxilosa, 2-o-metilfucosa y ramnosa y también posee

sustituyentes de la cadena muy variados, tales como ácido glucurónico, apiosa, ramnosa, galactosa y fucosa. La gran cantidad de residuos glicosídicos encontrados sugiere una molécula altamente ramificada, de hecho, parece ser la molécula más compleja de todas las que existen en los polisacáridos vegetales.

La cadena principal de los polisacáridos pécticos se caracteriza no sólo por regiones de ramnogalacturonano sino también por otras no ramificadas de residuos de ácido galacturónico unidos por enlace α -1-4, *Homogalacturonano*. Los grupos carboxilos del ácido galacturónico se encuentran normalmente esterificados con grupos metilo, cuyo grado de esterificación depende de la fuente de la que se obtenga el polisacárido péctico (Figura 5). Se sabe que a lo largo de la cadena de homogalacturonano se encuentran zonas altamente esterificadas, no susceptibles de ataque por endopoligalacturonasa y zonas que los son menos, susceptibles a dicho ataque.

Los *arabinanos* son polímeros muy ramificados en los que el residuo de arabinosa se encuentra fundamentalmente en forma de furanosa y los enlaces son mayoritariamente α (*Darvil et al. 1980*). Su grado de polimerización se ha estimado convirtiendo el extremo reductor de los polímeros en arabitol con borohidruro de sodio, hidrólisis del polímero reducido y determinación de la relación arabitol a arabinosa. Por este método se han encontrado en *Rosa Glauca* dos arabinanos de grados de polimerización 34 y 100. No está aún claramente dilucidada la estructura de estos

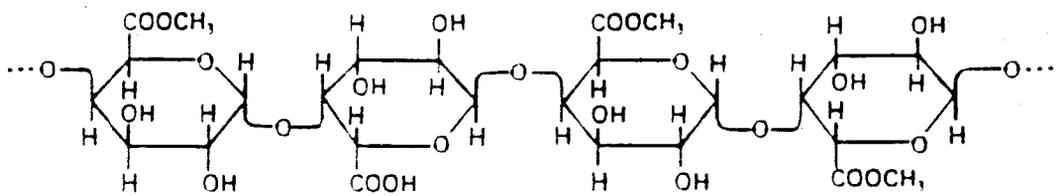
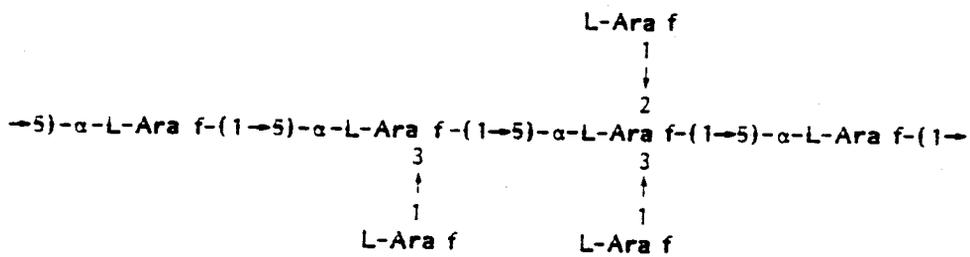


Figura 5.- Estructura de una cadena de homogalacturano.

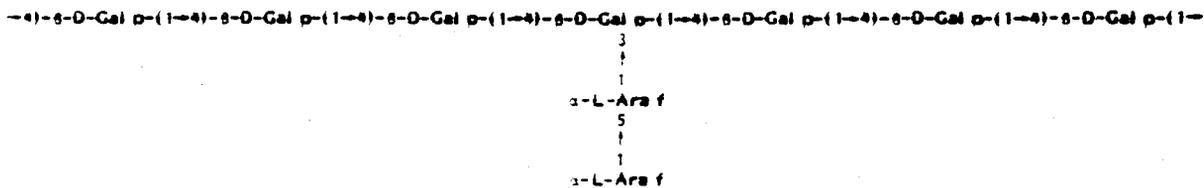
polímeros altamente ramificados ni se tiene certeza de que los residuos de arabinanos unidos a los polisacáridos pécticos se encuentran en forma de cadenas largas o cortas pero sí se sabe que son unos componentes importantes de la pared celular primaria (Figura 6).

Los *galactanos* se han aislado de pectinas de cítricos (Labavitch et al, 1976). Como ocurre con los arabinanos, nunca se han aislado homogalactanos de la pared primaria. La cadena principal está constituida de residuos de galactosa unidos por enlace β -1-4 y presentan grados de polimerización entre 33 y 50 (Mc Neil et al. 1984). En algunos casos se han encontrado residuos de galactosa unidos en el carbono 6, suponiendo un 4% del total del polisacárido (Talmadge et al., 1973).

Existe una gran diversidad en la composición de *arabinogalactanos* aislados de distintas fuentes. Los de semilla de uva contienen un 90% de arabinosa en tanto que el aislado de Larch un 88% de galactosa (Selvendran, 1985). Tres de los arabinogalactanos estudiados poseen residuos de ramnosa, mientras que otros cuatro no. El arabinogalactano de soja consiste en una cadena de unidades de galactosa unidos a los carbonos 3 de algunas de las moléculas de galactosa (Aspinal et al. 1967). Los dímeros de arabinosa tienen la estructura $Ar_f-(1-5)-Ar_f$. La gran variabilidad entre arabinogalactanos aislados de distintas fuentes, hace difícil el exponer un esquema general de estos compuestos (Figura 6).



A



B

Figura 6.- Polisacáridos pécticos: A.- Arabinano
B.- Arabinogalactano

2.1.1.3.- Hemicelulosas.

El término hemicelulosas se utiliza para designar aquellos polisacáridos que son solubles en álcali y que se encuentran en estrecha relación con la celulosa dentro de la pared. Evidentemente se trata de una definición poco concreta en la cual se engloban polisacáridos muy diversos.

Los trabajos de *Selvendram* en patatas, habichuelas y manzanas (1975B,1982) sugieren que los xiloglucanos son los polisacáridos hemicelulósicos predominantes en paredes primarias, y que el resto de los solubles en álcali - entre los que se encuentra fundamentalmente xilosa, arabinosa y posiblemente ácidos urónicos - están presentes en forma de complejos polisacárido-proteína-polifenol. Los trabajos de *Thornber y Northcote* () muestran que los tejidos meristemáticos contienen 4-O-metilglucuronoxilanos en sus paredes celulares. *Albersheim* y su grupo también llegan a la conclusión de que los polisacáridos hemicelulósicos presentes en la pared de células de *Sycamore* cultivadas en suspensión son los xiloglucanos.

La cadena principal del xiloglucano está constituida fundamentalmente por unidades de glucosa unidas por enlace β -1-4, a las que se unen residuos de xilosa en el carbono 6, mediante enlaces de tipo α . Las cadenas laterales se pueden extender por la aposición de β -D-galactopiranosas, L-arabinofuranosas o β -L-fucopiranosil-(1-2)- β -D-galactopiranosas (Figura 7). El peso molecular del xiloglucano de

Sycamore se ha estimado en 7600, lo que representa unos 50 residuos glicosídicos.

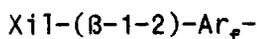
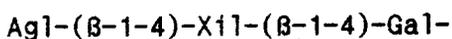
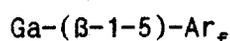
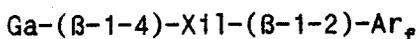
En las paredes primarias, los xiloglucanos están unidos a la celulosa mediante enlaces de hidrógeno y su función y relación con otros polímeros de la pared no están todavía muy claras. *Bauer et al.* (1973) han mostrado evidencias de que en cultivos de *Sycamore* los xiloglucanos pueden estar unidos mediante enlace covalente a los polisacáridos pécticos y no covalentemente a la celulosa. Proponen un modelo de la pared celular en el que una proporción importante de los xiloglucanos están enlazados a la cadena principal de ramnogalacturonano a través de cadenas de arabinogalactanos. *Selvendran et al.* (1985) han llegado a la conclusión de que la mayor parte de los xiloglucanos de tejidos de patata, habichuela y manzana, no están unidos covalentemente a los polisacáridos pécticos. Indican la posible presencia de enlaces fenólicos entre algunos polisacáridos pécticos y xiloglucanos.

En la pared primaria de dicotiledóneas, los polisacáridos hemicelulósicos predominantes son los xiloglucanos y en las paredes secundarias lo son los *xilanos*. Los diferentes tipos encontrados en diversas paredes celulares secundarias difieren entre sí en la naturaleza de las cadenas laterales. La más frecuente es un residuo terminal de ácido 4-O-metilglucurónico. El residuo de ácido urónico está siempre unido al carbono 2 de la xilosa. En habichuelas se ha encontrado que la mayor parte de las hemicelulosas son 4-O-metil-

glucurono y glucuroroxilanos, siendo la proporción de 4-O-metilglucurónico a glucurónico en los xilanos purificados de 3 a 1 (*Selvendran*). En el 4-Ometilglucuronoxilano de abedul, alrededor de 1 de cada 10 residuos de xilosa llevan un residuo de ácido glucurónico y 7 de cada 10 tienen un grupo acetilo ().

Los xilanos son también los componentes mayoritarios de las pared primaria de monocotiledóneas. Poseen una cadena principal de unidades de xilosa en su forma piranosa unidas mediante enlaces β -1-4. Los xilanos de diferentes fuentes poseen una amplia variedad de cadenas laterales. La más común está constituida por residuos de arabinosa en forma furanósica unidos al carbono 3 de algunos residuos de xilosa. Otros muy corrientes son ácido glucurónico y 4-O-metilglucurónico unidos al carbono 2 de la xilosa.

Como cadenas laterales se han encontrado:



2.1.1.4.- Glicoproteínas.

Las paredes celulares contienen entre un 3 y un 6% de proteínas, que se encuentran normalmente presentes como glicoproteínas (), habiéndose hallado dos tipos fundamentales: de alto y de bajo

contenido en hidroxiprolina . Las cantidades relativas de estas dos proteínas varia dependiendo de la fuente. En habichuelas, el componente rico en hidroxiprolina es el principal (*Selvendran, 1975*), mientras que en patata el pobre en hidroxiprolina es el predominante . En manzana, los dos componentes están presentes aproximadamente en las mismas cantidades.

Normalmente se han considerado como proteínas estructurales, aunque algunas pueden ser enzimas. Aún no se ha establecido su papel exacto en la formación de enlaces entre polisacáridos, pero su asociación a un amplio rango de polisacáridos está bien documentada. Estudios hechos en *Sycamore* y habichuelas(*Darvill, 1985*) han mostrado que el componente rico en hidroxiprolina está asociado con la fracción de α -celulosa, mientras que el pobre en la misma lo está con las hemicelulosas solubles en álcali.

La proteína con alto contenido en hidroxiprolina es particularmente rica en hidroxiprolina, serina, arabinosa y galactosa (()) (Figura 8). Estudios de hidrólisis alcalina parcial han mostrado que la hidroxiprolina está O-glicosídicamente unida a oligosacáridos de arabinosa (de 1 a 4 residuos). La hidrólisis parcial de paredes de tomate cultivadas en suspensión origina un glicopéptido que contiene serina sustituida con un residuo simple de galactosa.

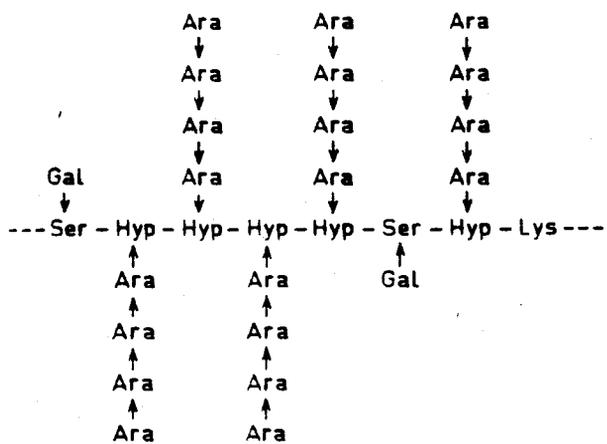


Figura 8.- Posible estructura de la proteína rica en hidroxiprolina.

Estudios de fraccionamiento de la proteína de bajo contenido en hidroxiprolina sugieren la presencia de complejos polisacárido-proteína-polifenol. Algunos de estos complejos contienen cantidades apreciables (60%) de residuos de xilosa unidos por enlaces 1-4. Es posible que una proporción importante de este tipo de proteínas sean enzimas que han sido inmovilizadas por enlaces glicosídicos y fenólicos (*Selvendran*).

2.1.1.5.- Lignina.

Las ligninas se pueden describir como redes tridimensionales constituidas por unidades de fenilpropano. Generalmente se admite que los precursores de estos compuestos son los alcoholes coniferílico, sinapílico y p-cumárico (Figura 9), los cuales se transforman en ligninas por un complejo proceso de polimerización (*B. Monties, 1980*). La proporción de estos depende de la fuente de donde proceda la lignina.

La estructura es poco compleja y poco conocida, en la figura 10 se representa un modelo ampliamente aceptado para las ligninas de gimnospermas, en general estructuras análogas se encuentran en las de la mayor parte de las plantas.

Desempeña varias funciones dentro de la pared celular: da rigidez a ciertas células especializadas de los tejidos conductores, actúa como agente de unión entre células, retarda la penetración del

agua a través de la pared celular en tejidos del xilema y protege del ataque por microorganismos.

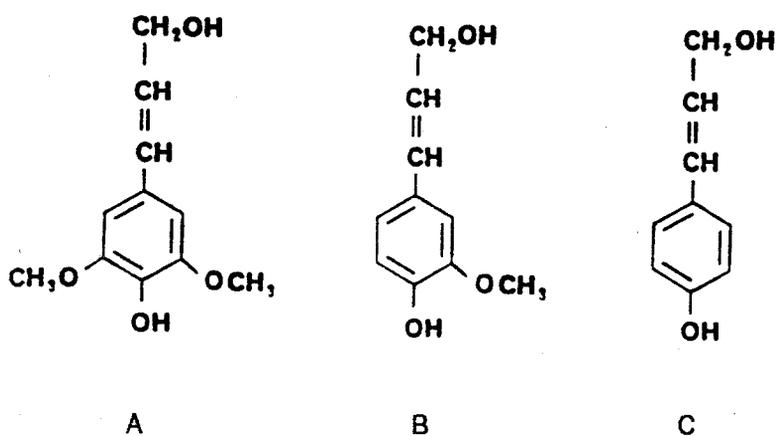


Figura 9.- Precursores de la lignina: A.- Alcohol sinapílico
 B.- Alcohol coniferílico
 C.- Alcohol cumarílico

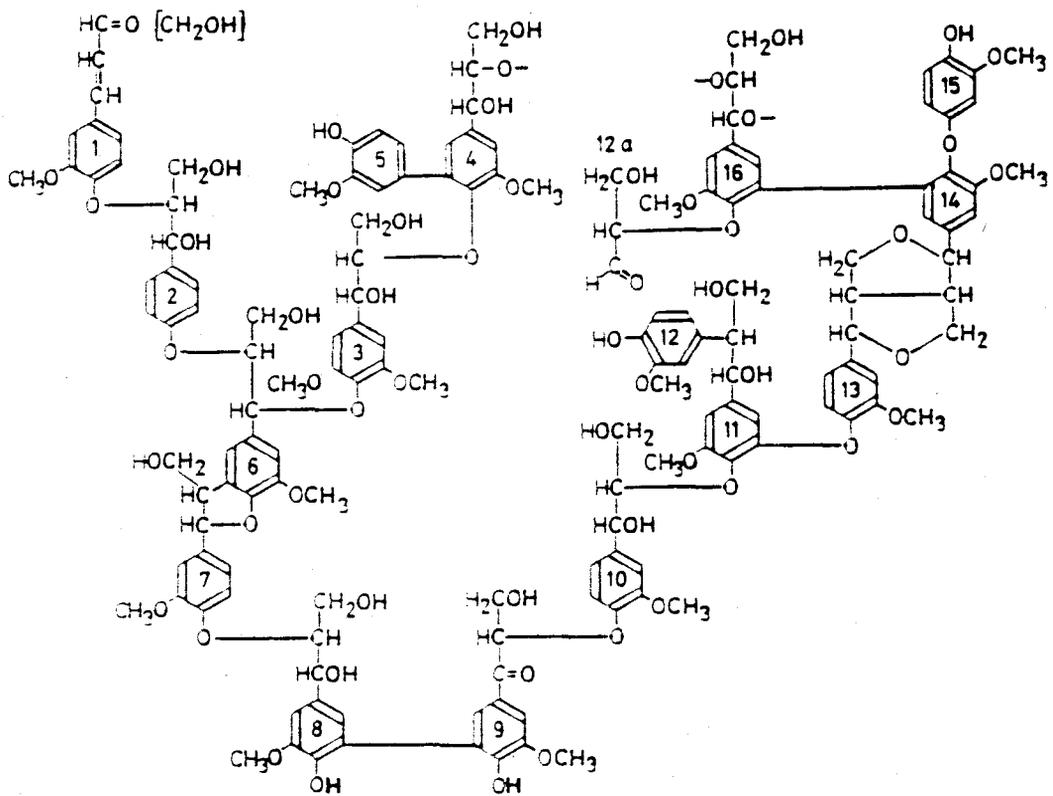


Figura 10.- Estructura de la lignina de gimnospermas.

2.1.2.- Análisis y aislamiento de los componentes de la pared celular.

La metodología existente en la bibliografía para el análisis de la pared celular es muy extensa y variada, encontrándose desde métodos rápidos para la determinación de cada uno de sus componentes, hasta complejos esquemas de aislamiento y purificación.

Gran parte de la metódica surgida en los últimos años ha ido encaminada a la determinación de los componentes de la denominada *fibra alimentaria*, de los cuales forma parte mayoritaria la pared celular. Sin embargo estos métodos obedecen a un concepto nutricional más que a uno analítico, por lo que ofrecen una información sólo parcial, aunque no por ello menos valiosa, de los constituyentes de la pared celular.

En general, cualquier método implica el aislamiento de la pared celular mediante solubilización de todos los demás componentes celulares que la acompañan (fundamentalmente proteínas y almidón), para posteriormente hacer una extracción de todos o algunos de sus componentes.

En este apartado se resumen los métodos más generales de determinación de componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosas y lignina) y de aislamiento y posterior fraccionamiento.

2.1.2.1.- Métodos de determinación de celulosa.

Método de Weende, 1806

Es uno de los más antiguos de determinación de celulosa, llamado así por haber sido desarrollado en la Weende Experimental Station de Göttinger (Alemania) por Heinrich Einbof en 1806. Implica una extracción secuencial con ácido diluido y álcali (ácido sulfúrico e hidróxido sódico respectivamente, 1,25%) y separación del residuo insoluble por filtración.

Pronto surgieron serias objeciones al método pues, tanto en la digestión ácida como en la básica, se observaban importantes pérdidas de celulosa y además la lignina recuperada podía oscilar entre un 4 y un 67% de la original (*Heredia 1979*).

Método de Van Kamer y Van Ginkel, 1952

Puesto que las mayores pérdidas por el método Weende tenían lugar durante la extracción con álcali, el método de Van Kamer (1952) utiliza sólo una extracción con ácido. El producto, finamente triturado, se trata con una mezcla de los ácidos tricloroacético, acético y nítrico, que no atacan a la celulosa aunque sí a la lignina.

Método de Van Soest, 1963.

Uno de los principales problemas de la extracción ácida es que queda un importante residuo de proteínas unido a la celulosa. En 1963, Van Soest examinó la posibilidad de utilizar detergentes catiónicos y aniónicos para facilitar la solubilización de las mismas, preservando inalterada la lignina. En un principio, el método se desarrolló para el análisis de forrajes y pastos, y posteriormente se ha utilizado con profusión en el análisis de todo tipo de alimentos de la dieta humana (*Van Soest, 1963a; 1963b; 1965*)

El sistema de extracción consta de dos métodos complementarios, el de detergente ácido (ADF) y el de detergente neutro (NDF). El primero está basado en el uso de un detergente catiónico, bromuro de cetiltrimetilamonio, en medio ácido, que disuelve las proteínas mientras mantiene íntegra la lignina, lo que resulta de gran interés. El residuo se considera formado por celulosa, lignina y cenizas insolubles. El NDF, consiste en una digestión con un detergente aniónico, laurilsulfato sódico, en medio neutro. Representa el contenido de la pared celular menos las pectinas, normalmente el residuo se considera formado por celulosa, lignina, hemicelulosas y cenizas insolubles (*Van Soest y Wine 1967*). La diferencia entre ADF y NDF da una valoración de las hemicelulosas. A partir del extracto ADF se elimina la lignina mediante solubilización con permanganato potásico, mientras que permanece inalterada la celulosa (*Van Soest y Wine, 1968*).

En su aplicación a alimentos de la dieta humana, el sistema de extracción con detergentes ha planteado diversos problemas. Así, cuando el contenido en almidón es elevado, la recuperación de este no es muy efectiva, razón por la que algunos autores han propuesto realizar una digestión del residuo NDF con α -amilasa, ya sea antes o después de la extracción con tarilsulfato sódico () () (). Por otra parte, en algunos productos se ha encontrado más de un 10% de hemicelulosas en la fracción ADF (*Robertson y Van Soest 1981*).

2.1.2.2.- Métodos de determinación de polisacáridos no celulósicos (Hemicelulosas).

No existen métodos específicos de determinación de hemicelulosas por lo que, normalmente, se determinan como una fracción más dentro de los sistemas de fraccionamiento, que se tratarán más adelante.

2.1.2.3.- Métodos de determinación de sustancias pécticas.

Para el análisis de las sustancias pécticas son necesarias tres etapas fundamentales: extracción, hidrólisis y cuantificación.

La extracción se puede realizar con álcali diluido, ácido o con agentes quelatantes como el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) o el oxalato amónico, mientras que la hidrólisis generalmente se hace con ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético o poligalacturonasa.

En general, es difícil el análisis cuantitativo de ácidos urónicos a partir de los polímeros naturales, debido a que estos son resistentes a la hidrólisis ácida y a que los monómeros no son fáciles de aislar y derivar. En parte, estas complicaciones provienen de la múltiple funcionalidad de los ácidos urónicos ya que, debido a condensaciones intramoleculares de sus grupos carbonilo y carboxilos, existen al menos en seis formas estructurales diferentes, una acíclica, dos anoméricas para cada anillo furanósico y piranósico y al menos una de lactona.

Dekker y Richards (1972) hacen un estudio comparativo entre la extracción con álcali diluído (NaOH 0,5 N) y con oxalato amónico/ácido oxálico aplicado a la legumbre, *Stylosanthes humilis*. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con álcali no es adecuado por no extraer nada más que una parte pequeña de los polisacáridos pécticos y además detectan la formación de algunos cromóforos que pueden interferir en las posteriores determinaciones colorimétricas, por lo que se decantan por una homogeneización con la disolución de oxalato, al menos dos veces, para extraer la mayor parte de los polisacáridos pécticos.

La hidrólisis la realizan en dos fases sucesivas, con ácido sulfúrico concentrado, a 30 °C y con ácido diluído y también con poligalacturonasa, a 30 °C. En la hidrólisis ácida inicial, solo se obtiene un 45% de rendimiento, que llega al 50% en la segunda fase. Estos bajos rendimientos lo achacan a una hidrólisis incompleta y/o a

reacciones de descarboxilación. En la hidrólisis enzimática obtienen, sin embargo, un rendimiento cercano al 100%, después de 24 horas de extracción.

Selvendran et al. (1979) encuentran que una extracción e hidrólisis simultáneas de los polisacáridos pécticos con H_2SO_4 del 72% a 20°C durante 3 horas, origina una rápida solubilización de todos los polisacáridos de la pared celular incluidas las sustancias pécticas. Además observan que la descarboxilación de los residuos de ácidos urónicos, que tiene lugar cuando se calientan las sustancias pécticas con ácidos minerales diluídos, se minimiza con este procedimiento.

Walters y Hedges (1988) hacen también una extracción e hidrólisis simultáneas, pero empleando ácido trifluoroacético 0,5 N, a 140 °C, durante 2 horas.

Wen et al. (1988) extraen con AEDT, a 85 °C, durante 1 hora y posteriormente hidrolizan con pectinasa.

Una vez extraídas e hidrolizadas las sustancias pécticas es necesario determinar los ácidos urónicos liberados. Hasta el momento no se han desarrollado métodos totalmente satisfactorios para su determinación en hidrolizados de productos naturales.

Uno de los más utilizados desde antiguo es el método del carbazol, desarrollado en 1947 y posteriormente modificado por *Bitter*

y Muir (1962). Está basado en que los ácidos urónicos, cuando se tratan con ácido sulfúrico y carbazol, desarrollan color cuantitativamente. Knutson y Jeans (1968a, b) introducen el uso de iones borato así como medidas a temperaturas superiores para aumentar la sensibilidad del ensayo y aumentar la selectividad para distintos ácidos urónicos.

El método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973) que utiliza meta-hidroxidifenilo como cromóforo, presenta la ventaja de que no sufre interferencias por parte de los azúcares neutros y de que tiene un sensibilidad mucho mayor que los restantes.

El gran inconveniente de estos métodos colorimétricos es que son sensibles a pequeños cambios en las condiciones de reacción y, si la disolución de partida es coloreada, algo muy habitual cuando se trabaja con productos naturales, el análisis se hace muy difícil o imposible y además no ofrecen información sobre distintos tipos de ácidos urónicos.

En los últimos años han aparecido algunos métodos más específicos que utilizan la cromatografía gaseosa consiguiéndose además una determinación específica de distintos ácidos.

Lehrfeld (1981) utiliza esta técnica para la determinación de ácidos urónicos en mezclas de azúcares neutros. Los azúcares neutros los convierte en acetatos de aldonitrilo, disolviéndolos en

piridina con cloruro de hidroxilamina para obtener sus correspondientes oximas, las cuales se deshidratan con anhídrido acético a sus nitrilos. Los ácidos urónicos no interfieren pues, o son destruidos, o se transforman en otros compuestos que no cromatografían en la zona de los azúcares neutros. Posteriormente, una alícuota de la muestra es analizada mediante el método de los acetatos de alditol modificado. El paso de reducción con borohidruro se repite tres veces para convertir los ácidos mannurónico, galacturónico y glucurónico en alditoles a través de sus lactonas como intermediarios de la reacción. Así se tiene una valoración de la concentración de ácidos urónicos y de azúcares neutros y, restándole a estos valores los obtenidos a partir de los acetatos de aldonitrilo, se obtiene una medida de cada ácido urónico.

Posteriormente *Lehrfeld (1985)* modificó el método para separar simultáneamente ácidos urónicos y azúcares neutros. Una vez hidrolizadas las muestras se secan y se añade una disolución ligeramente básica de hidróxido sódico, con lo cual se abren las lactonas presentes formándose uronato de sodio. Los grupos carbonilo de las aldosas y los uronatos se reducen cuantitativamente con borohidruro de sodio a alditoles y aldonatos, respectivamente. Después de eliminar los iones sodio y el ácido bórico, se producen aldonolactonas por deshidratación y se convierten en derivados alquilamidas. Las amidas y los aldonitrilos formados se someten a acetilación para formar derivados volátiles y se separan por cromatografía gaseosa. La hidrólisis en este método hay que realizarla

necesariamente con ácido trifluoroacético que es volátil y fácilmente eliminable.

Ha y Thomas (1988) han desarrollado un método para la determinación simultánea de azúcares neutros y ácidos urónicos. El procedimiento conlleva la metanolisis de la muestra con HCl 0,5 M en metanol, lo cual produce metilglicósidos, es tan eficiente como la hidrólisis con ácido sulfúrico y causa menos degradación oxidativa de los azúcares liberados. Se realiza a 80 °C, durante 16 horas, la muestra se evapora a sequedad con una corriente de aire y se le añade el reactivo de silanización que consiste en una mezcla de piridina: hexametildisilazano: trimetilclorosilano.

2.1.2.4.- Determinación de lignina.

El método más común para la cuantificación de lignina es el de Klason, que la considera como el residuo que queda después de tratar la muestra con ácido sulfúrico del 72%. Interfieren en gran medida los fenoles que originalmente se encuentran libres, pero que cuando se calientan o exponen a ácidos pueden polimerizarse y formar una lignina artificial.

Van Soest y Göering (1968) la determinan cómo la pérdida de peso que se origina al oxidar con permanganato potásico el residuo ADF. Tiene la ventaja sobre el anterior de que el ADF está prácticamente exento de material fenólico que pueda interferir, pero,

sin embargo, interfieren restos de hemicelulosas que puedan quedar en el ADF y parte de la celulosa que se pueda solubilizar.

2.1.2.5.- Métodos de fraccionamiento.

Método de Southgate (1969)

Implica el fraccionamiento en polisacáridos no celulósicos solubles e insolubles, celulosa y lignina y la determinación de cada uno de ellos por hidrólisis con ácido sulfúrico, cuantificando hexosas, pentosas y ácidos urónicos liberados mediante reacciones colorimétricas con antrona, orcinol y carbazol, respectivamente.

Después de extraer los azúcares libres con metanol del 85% (v/v) y la grasa con éter, una fracción de la muestra se incuba con α -amilasa durante 18 horas y los componentes solubles se precipitan con etanol del 80%.

El residuo libre de almidón se fracciona en componentes solubles e insolubles y ambos se hidrolizan con sulfúrico 1 N para liberar los azúcares de los polisacáridos no celulósicos (NCP). El residuo insoluble se extrae con sulfúrico del 72% para hidrolizar celulosa y el residuo insoluble se determina gravimétricamente como lignina. En la determinación de ácidos urónicos es necesario realizar correcciones por las interferencias de hexosas y pentosas (*Southgate 1981*) (*Hudson y Bailey, 1980*) (*Laine et al, 1981*) (*Knutson y James,*

1968).

Método de Englyst (1982)

Se apoya originalmente en el de Southgate, pero utiliza cromatografía gaseosa. Tres alícuotas de la muestra se tratan paralelamente, según procedimientos A, B y C.

En el A, realiza una separación de almidón, una hidrólisis con sulfúrico 12 M y posteriormente más diluido, para hidrolizar todos los polisacáridos celulósicos y no celulósicos. A continuación se separa una alícuota para la determinación de ácidos urónicos, se neutraliza y se determina monosacáridos por cromatografía gaseosa.

En el B, la etapa de hidrólisis ácida se lleva a cabo con ácido diluido 2 M, con lo que sólo se hidrolizan los polisacáridos no celulósicos (NCP).

Por último, en el C existe un paso de separación de polisacáridos solubles en agua inmediatamente después de la eliminación del almidón, con lo que se determinan los restantes polisacáridos insolubles (INSP).

También propone una modificación del procedimiento B para la determinación de almidón resistente, mediante una segunda incubación con amiloglucosidasa. La determinación de azúcares por cromatografía gaseosa se realiza transformándolos en acetatos de alditol.

Posteriormente, desarrolla un método simplificado para la determinación de polisacáridos distintos de almidón. El almidón resistente se separa con dimetilsulfoxido y los acetatos de alditol se preparan utilizando N-metilimidazol como catalizador de la acetilación (*Englyst 1984, 1989*).

Método de Theander y Westerlund (1986)

Describen tres métodos complementarios A, B y C que se inician con una extracción, a temperatura ambiente, con etanol del 80% y hexano en baño ultrasónico.

En el B, se determinan azúcares reductores por cromatografía gaseosa directamente sobre el residuo.

En el A y el C el residuo se trata con Termamyl (0,5 h, 96 °C) y amiloglucosidasa (16 h, 60 °C). En el A se separa la fracción insoluble por centrifugación y la soluble se recupera por diálisis del sobrenadante. En el C se precipita la fracción soluble por adición de etanol y se recupera junto con la soluble por precipitación.

Para la determinación de ácidos urónicos utilizan un método basado en su descarboxilación, el dióxido de carbono liberado se recoge en una disolución de hidróxido sódico diluido y se mide la variación en la conductividad de la disolución.

Método de Furda (1981)

La muestra se desengrasa con éter en Soxhlet durante 5-6 horas, a 60 °C y se somete a un tratamiento con HCl para romper la matriz celular, gelatinizar el almidón, y extraer las pectinas y otros polisacáridos solubles en agua. Para la extracción de almidón y proteínas se lleva a cabo una digestión con α -amilasa y proteasas, durante 12 horas. Posteriormente se filtra, separando así la fracción insoluble de la soluble, que queda en el extracto acuoso. Por último ésta se precipita añadiendo 4 volúmenes de etanol del 95%.

Método de Asp y Johansson (1983)

La extracción de grasa se realiza con éter de petróleo a temperatura ambiente y el ataque enzimático se realiza en tres etapas sucesivas: primero con Termamyl a pH 6 durante 15 minutos a 100 °C, seguidamente con pepsina a pH 1,5, 60 minutos, a 40°C y por último pancreatina a pH 6,8, durante 60 minutos, a la misma temperatura. La separación de las fracciones soluble e insoluble se realiza por filtración sobre crisol filtrante, utilizando como coadyuvante celita. La fracción soluble se precipita con etanol.

2.1.1.6.- Métodos de aislamiento.

La mayor parte de los métodos existentes para el aislamiento y fraccionamiento de la pared celular utilizan como material de partida el residuo insoluble en alcohol, fenol o acetona (*Knee, 1973*) (*Wallner, 1977*) (*Gross, 1986*) (*Siddiqui, 1990a; 1990b*).

Aunque se puede obtener una valiosa información a partir de dichos métodos, todos presentan una serie de problemas importantes. La mayor parte de las proteínas citoplasmáticas, ácidos nucleicos y polisacáridos de reserva como el almidón, coprecipitan con el material de pared. Lo mismo ocurre con compuestos de bajo peso molecular como polifenoles y ésteres. La contaminación con proteínas citoplasmáticas del residuo insoluble en alcohol varía desde el 5 al 40% de su peso dependiendo del tipo y madurez del tejido (*Selvendran, 1975*). Esta contaminación es bastante considerable en comparación con el contenido en proteína de la pared, entre un 2 y un 6% en peso.

Estos compuestos alteran los pesos relativos de los diversos grupos de polisacáridos de la pared celular, falsean los pesos moleculares de los fragmentos liberados de la misma y dificultan posteriores estudios estructurales.

La vía alternativa a estos métodos es evitar el tratamiento con disolventes orgánicos y eliminar en medio acuoso tanto proteínas como almidón y compuestos de bajo peso molecular. Dentro de este grupo

el más ampliamente utilizado es el de Selvendran, en él la muestra se trata con deoxicolato sódico en medio acuoso para eliminar proteínas, con una mezcla de fenol-ácido acético-agua para eliminar compuestos fenólicos y pigmentos y con dimetilsulfóxido para eliminar almidón. Se ha utilizado en muchos productos y probablemente con este método se obtienen las mejores preparaciones de pared celular.

Otra forma de eliminar los compuestos que contaminan los preparados de pared celular, es mediante tratamientos enzimáticos, las enzimas más utilizadas son, para la eliminación de proteínas, la pronasa, para la de almidón, amiloglucosidasa y Termamyl (una amilasa termoestable (*Brillouet et al., 1981, 1982, 1983, 1988*) (*Carré et al., 1985*). Tratamientos con estas enzimas se han utilizado con éxito, incluso para la purificación del residuo insoluble en alcohol (*Selvendran et al. 1985*).

2.1.3.- Evolución de los componentes de la pared celular durante la maduración y almacenamiento de algunos frutos.

Los trabajos en relación con los cambios de los polisacáridos de la pared celular de frutos son muy escasos y en gran parte se centra en los polisacáridos pécticos. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un creciente interés en el tema debido a que los polisacáridos juegan un importante papel en la calidad de los alimentos, la importancia de la fibra dietética que aportan en la nutrición y el papel que desempeñan en la fisiología y patología de la planta (*Albersheim 1989*).

Knee (1973, 1974) estudia los cambios que se producen en las manzanas durante su maduración en el árbol y posterior almacenamiento. A partir del "polvo de acetona" realiza cuatro extracciones sucesivas:

- a.- Tris HCl 0.1 M, pH 7.2, 20°C (polisacáridos pécticos solubles)
- b.- Acido clorhídrico, 20°C (Almidón)
- c.- NaOH 4M, 20°C (Hemicelulosas)
- d.- H₂SO₄ 72%, 20°C (Celulosa y Hemicelulosas)

Encuentra dos cambios principales en la pared celular a lo largo de la maduración del fruto, una disminución importante de galactosa y un aumento sustancial de los poliuronidos solubles, observando que en estos últimos la proporción de azúcares neutros es muy baja. Dependiendo de las condiciones de maduración estos cambios

pueden ocurrir conjuntamente o en secuencia. Cuando ocurren secuencialmente, la primera fase es la pérdida de galactosa y la segunda el aumento de poliuronidos solubles. En la maduración en el árbol, los residuos de galactosa disminuyen mientras que los poliuronidos solubles mantienen una concentración baja y, si la maduración tiene lugar durante el almacenamiento, los poliuronidos solubles aumentan al mismo tiempo que disminuye el contenido en galactosa. El aumento de poliuronidos coincide con un aumento en la velocidad de producción de etileno.

Las mayores pérdidas de textura tienen lugar durante la fase de aumento de poliuronidos solubles, observándose una correlación inversa entre ambos (coeficiente de correlación 0.923).

Gross y Wallner (1979) caracterizan los cambios de la pared celular del pericarpio del tomate durante la maduración, para lo cual la preparan homogeneizando el tejido con fosfato potásico 20 mM pH 6.9, extracción con cloroformo:metanol y posterior secado con acetona. Arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido galacturónico constituyen aproximadamente el 60% de la pared celular del tomate verde, produciéndose durante la maduración disminuciones del 58, 44 y 18% respectivamente. El contenido de xilosa, glucosa no celulósica, manosa, celulosa y proteínas permanecen prácticamente constantes. El único componente que muestra una disminución importante al pasar de verde a color cambiante es la galactosa, mientras que el ácido galacturónico prácticamente no cambia durante esta etapa.

Huber (1983) emplea la cromatografía de filtración en gel para determinar los cambios que se producen en la fracción de hemicelulosas (polisacáridos solubles en álcali) durante la maduración del tomate. La pared celular la aísla por sucesivas extracciones con metanol del 80% a ebullición, agua, acetona y cloroformo-metanol, seguidamente extrae sustancias pécticas con AEDT y hemicelulosas con álcali, sometiendo ambas fracciones a cromatografía de filtración en gel.

Los poliurónidos obtenidos de tomate inmaduro poseen un peso molecular tal que son excluidos por Ultrogel ACA 34 (límite de exclusión para moléculas globulares 7.5×10^5). A medida que el fruto madura, el perfil de elución va variando y cada vez son más los polisacáridos que sí fraccionan en este gel, indicando que hay una degradación neta de poliurónidos hasta llegar al fruto sobremaduro en el que la mayor parte de los polímeros tienen un grado de polimerización mayor o igual que diez.

En cuanto a la fracción de hemicelulosas, en el tomate verde la mayor parte de los polímeros son excluidos por el gel, mientras que los restantes eluyen en un rango de peso molecular de 40000 o menos. En el tomate de color cambiante se encuentra una disminución de polímeros de alto peso molecular y un aumento considerable de la fracción de los de bajo peso molecular, siendo estos cambios mucho más aparentes en el rojo maduro.

Arpaia et al (1987) estudian los cambios que se producen en los componentes de la pared celular del kiwi durante su almacenamiento a 0°C y en atmósfera controlada (2% O₂, 5% CO₂). Divide los polisacáridos en solubles e insolubles en agua. Los primeros los clasifica de acuerdo con su solubilidad en etanol, la fracción insoluble la somete a un tratamiento con amiloglucosidasa para eliminar almidón y posteriormente hidroliza con ácido tifluoroacético para separar hemicelulosas, quedando un residuo final de celulosa el cual hidroliza con ácido sulfúrico del 67%. La determinación de azúcares neutros la realiza por cromatografía gaseosa y la de ácidos urónicos por el método de Blumenkrantz.

El análisis de los resultados indica que, durante las ocho primeras semanas de almacenamiento, se pierde el 80% de la textura, durante el mismo periodo se pierde el 70% de los ácidos urónicos de la pared y posteriormente el nivel permanece prácticamente constante. Paralelamente a la disminución de ácidos urónicos insolubles se produce un aumento de los solubles.

El azúcar mayoritario en la fracción de polisacáridos no celulósicos en las primeras fases del almacenamiento es la galactosa. Durante el almacenamiento se produce un disminución importante de galactosa aunque el aumento en la fracción soluble no es paralelo a partir de las dos semanas de almacenamiento. Se produce también una disminución de arabinosa y ramnosa, no existen variaciones importantes en el contenido de xilosa y tampoco se encuentran pérdidas

significativas de celulosa.

La relación de azúcares que precipitan con etanol a los que no precipitan para todos los azúcares neutros, excepto para la glucosa, aumenta durante las 2-8 primeras semanas, coincidiendo con una disminución importante de la textura. A partir de las 8 semanas esta relación permanece prácticamente constante o tiende a disminuir.

Los autores interpretan que en una primera fase de la degradación de la pared celular se liberan polisacáridos de bajo peso molecular (precipitables con etanol), coincidiendo esto con las mayores pérdidas de textura. En una segunda fase comenzaría la degradación de estos polisacáridos de bajo peso molecular y se establecería un equilibrio dinámico en el cual la relación entre azúcares solubles e insolubles en etanol permanece constante. Este modelo de cambio es común para la galactosa, arabinosa y ramnosa, azúcares estos asociados a los polisacáridos pécticos.

Mc Feeters y Lovdal (1987) analizan la composición en azúcares de los polisacáridos de la pared celular del pepinillo durante su desarrollo e intentan correlacionarla con la textura. Consideran como pared celular el residuo que permanece insoluble al extraer la pulpa con etanol, el cual lo someten a hidrólisis de Saeman y en el hidrolizado determinan ácidos urónicos por métodos colorimétricos, azúcares neutros por cromatografía gaseosa y análisis del grado de metilación de las pectinas así como del calcio por el

método de Gindler y King.

Los principales azúcares neutros encontrados son glucosa, galactosa, xilosa y manosa. A lo largo del desarrollo la concentración de azúcares totales de la pared aumenta desde 6.6 a 11.1 mg/g.

El único azúcar que aumenta sustancialmente es el ácido galacturónico, mientras que hay una disminución sustancial de manosa, ramnosa y arabinosa. Durante el desarrollo del fruto se produce, por tanto, un aumento en la relación ácido galacturónico/arabinosa, ramnosa. También se da un importante aumento en la relación ácido galacturónico/galactosa desde 0.8 hasta 1.6.

Según los autores, esto podría indicar que la pectina en el fruto más maduro tiene menos o más cortas cadenas laterales de azúcares neutros, pero también puede indicar que la cantidad de estos azúcares en la fracción de hemicelulosas disminuya.

El pepinillo aparece como un fruto inusual en el hecho de que el grado de metilación en el mesocarpio aumenta durante el desarrollo desde el 35 al 64%.

Brinson et al (1988) estudian los cambios que se producen en los polisacáridos citoplasmáticos y de la pared del mango durante su maduración. Aíslan pared celular por homogeneización del tejido en tampón fosfato sódico (pH 6.9), centrifugación y lavado.

El porcentaje de pared celular decrece durante la maduración desde el 9.2 al 3.3%, referido a pulpa fresca. El contenido de ácidos urónicos totales de la pared disminuye desde el 25 al 29.1%. Las paredes del fruto inmaduro contienen un 7.3% de proteínas, mientras que las del fruto maduro contienen un 21.2%. En cuanto a azúcares neutros hay una importante disminución con la maduración.

El material de pared se somete a un fraccionamiento simple por extracción secuencial con agua (100°C) y NaOH 4M (25°C). Se encuentra que la maduración produce una disminución de la cantidad que se extrae con agua caliente y con álcali, así como del residuo celulósico final.

La fracción soluble en agua caliente del fruto maduro contiene aproximadamente un 90% de ácido galacturónico mientras que el material no maduro posee solamente un 7% y es particularmente rico en galactosa y arabinosa. En cuanto a la fracción soluble en álcali, se encuentran altos niveles de xilosa en ambos tipos de frutos. La glucosa disminuye en tanto que el ácido galacturónico aumenta y el resto de azúcares permanece prácticamente sin cambios.

Los polisacáridos solubles en agua fría se analizan por cromatografía de filtración en gel utilizando una columna de Biogel P-150. Para el mango inmaduro (contiene un 16.7% de ácidos urónicos) se obtiene un pico de carbohidratos P1 de peso molecular superior a 150000 se trata de un pico heterogéneo, pues cuando se analiza el

contenido en ácidos urónicos se encuentra un hombro P2 de peso molecular 45000.

Para el fruto maduro (contiene 53.2% de ácidos urónicos), los polisacáridos eluyen como un pico simple P3 de peso molecular 45000, de nuevo con indicaciones de heterogeneidad. Los picos P1 y P2 difieren marcadamente en su composición en monosacáridos. El azúcar mayoritario en P1 es el ácido galacturónico, el P2 es rico en arabinosa y xilosa y el pico P3 se ha dividido en tres fracciones a, b y c en orden decreciente de pesos moleculares. La fracción a está casi totalmente compuesta por galacturonano, la b y c contienen otros monosacáridos neutros en proporciones parecidas. La proporción de ácidos urónicos disminuye desde la fracción a a la c.

Cuando la fracción de polisacáridos solubles en agua fría se analizan en columnas de DEAE-Sephadex, para el fruto inmaduro eluyen como polisacáridos neutros el 20% del total, y para el maduro lo hacen el 50%.

Los polisacáridos ácidos se eluyen con un gradiente de cloruro sódico. Para el fruto inmaduro eluye un pico principal U1 junto con varios minoritarios. En el fruto maduro también se obtiene un pico mayoritario R1. Existe una marcada diferencia entre las fracciones de polisacáridos ácidos U1 y R1. La segunda contiene un 78% de ácidos urónicos mientras que la primera contiene mucho menos azúcar ácido (13%), junto con relativamente grandes cantidades de galactosa,

arabinosa y xilosa.

2.2.- GLICOSIDASAS Y SU RELACION CON EL ABLANDAMIENTO DE FRUTOS.

Los cambios en la textura y en la composición de la pared celular que ocurren en la maduración de algunos frutos son consecuencia de la acción de una serie de enzimas. Estos son fundamentalmente hidrolíticos y entre ellos se encuentran los celulolíticos (hidrolizan celulosa) y pectinolíticos (hidrolizan y desesterifican sustancias pécticas), así como los que hidrolizan polisacáridos no celulósicos (hemicelulasas y glicosidasas).

Es abundante la bibliografía en relación al papel que desempeñan los enzimas pectinolíticos y celulolíticos en el proceso de maduración, pero es muy poco conocida la posible acción de hemicelulasas y glicosidasas sobre las hemicelulosas de la pared celular.

En manzanas (Knee, 1973) aunque el contenido de galactosa de la pared disminuye durante la maduración al mismo tiempo que aumenta la proporción de poliuronidos solubles, no se detecta el enzima poligalacturonasa, teórico responsable de tales cambios. Sin embargo *Bartley (1974)* ha detectado la presencia de α y β -galactosidasas, sugiriendo que la función de estos enzimas puede ser la de romper cadenas de galactanos que actúan de nexo de unión entre los xiloglucanos y los ramnogalacturonanos. Esta sugerencia la apoya la

observación de que la hidrólisis del galactano se inicia antes de la liberación de poliuronidos solubles de alto peso molecular. Por otra parte encuentran que los poliuronidos solubles contienen muy pocos residuos de azúcares neutros, en contraste con el polímero de la pared celular. Como conclusión sugiere que las galactosidasas encontradas pueden actuar como reguladoras de la solubilización de poliuronidos.

Walner y Walker (1975) estudian el posible papel de algunas glicosidasas en el ablandamiento del tomate. Ensayan actividades de varios enzimas en tomates en diversos grados de madurez. Las mayores actividades corresponden a los enzimas poligalacturonasa, celulasa, β -galactosidasa y β -1-3-glucanasa. La actividad que más aumenta después del estado de color cambiante es la poligalacturonasa (PG). Observan una alta actividad de celulasa en el fruto verde que no aumenta sustancialmente con la maduración. Mientras que la actividad de poligalacturonasa está prácticamente ausente en el tomate verde, la de β -galactosidasa y β -1-3 glucanasa se encuentran presentes durante todo el proceso de maduración.

Por otra parte, observan que los mayores cambios estructurales en la pared se dan antes del estado de color cambiante, sugiriendo que β -galactosidasa y β -glucanasa actúan conjuntamente con PG en la hidrólisis de la pared celular.

Posteriormente Gross y Wallner (1979) demuestran que en la senescencia del tomate, las pérdidas de galactosa y arabinosa de la pared, ocurren de forma independiente a la solubilización de poliuronidos. Encuentran además que los PG actúan sobre una fracción de la pared que contiene relativamente pocos residuos de azúcares neutros y que, por tanto, para que estos enzimas puedan actuar, es necesaria la acción previa de otros enzimas que liberen las cadenas de ácido poligalacturónico de cadenas laterales de galactanos y arabinogalactanos.

Yamaki y Kakiuchi (1979) estudian los enzimas capaces de degradar la pared celular de la pera, encontrando tres grupos de enzimas: el primero lo constituyen PG, exocelulasa y mananasa, que presentan un pico de actividad máxima en el momento de plena madurez del fruto. El segundo grupo lo forman arabinanasas, β -glucosidasas y endocelulasa, con picos de actividad poco después de la madurez. Por último β -xilosidasa, xilanasa y β -galactosidasa continúan aumentando con la sobremaduración del fruto.

Pressey (1983) confirma que el tomate contiene un alto nivel de actividad β -galactosidasa. Sus estudios indican que la actividad es debida a tres formas enzimáticas que pueden separarse por una combinación de cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-100. Dos de los enzimas (β -galactosidasas I y III) tienen propiedades similares, excepto que la I tiene doble peso molecular que la III, lo que sugiere que es un dímero de este último. Sólo una de las formas

(II) es capaz de liberar galactosa de un polisacárido rico en galactosa aislado de tomates.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- MUESTRAS UTILIZADAS.

Se emplean muestras de la variedad Hojiblanca, recolectadas en la provincia de Sevilla.

Para la toma de muestra se utilizan tres árboles, recogiendo el fruto de la parte externa e interna, y de la superior e inferior, con objeto de disponer de una muestra lo suficientemente representativa de su estado de madurez medio.

La aceituna una vez recolectada se almacena a -30°C hasta su uso.

3.1.1.- Preparación de la muestra.

El fruto se descongela, se deshuesa en deshuesadora manual y se tritura con una batidora.

3.2.- HUMEDAD.

Material.-

Pesasustancias de 50mm de diámetro y de 35 mm de altura aproximadamente.

Estufa de vacío.

Metodología.-

Se deseca en la estufa un pesasustancias abierto, a 98-100 °C. Se tapa, se introduce en un desecador, se deja enfriar y se pesa. Se carga con 50 g de la muestra, aproximadamente, y se vuelve a pesar, se introduce en la estufa, se retira la tapa y se mantiene a 60-70 °C, con un vacío parcial inferior a 25 mm, hasta peso constante. Se deja entrar aire en la estufa hasta alcanzar la presión atmosférica, se tapa inmediatamente el pesasustancias y se introduce en un desecador. Una vez que haya alcanzado la temperatura ambiente, se pesa. El contenido de humedad se calcula según la fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100$$

siendo,

P_0 = peso del pesasustancias vacío.

P_1 = peso del pesasustancias con la muestra, antes de desecarlo.

P_2 = peso del pesasustancias con la muestra después de desecarlo.

3.3.- GRASA.

Material.-

Extractor tipo Soxhlet.

Estufa con circulación de aire.

Rotavapor.

Reactivos.-

Hexano (Merck R.A.).

Metodología.-

La muestra, exenta de agua, se pesa con exactitud de 0,1 mg. Se introduce en un cartucho de extracción y se coloca en el Soxhlet, llevando a cabo la extracción con hexano. El extracto se recoge en un matraz, previamente tarado, conteniendo unos trozos de plato poroso.

Se separa el hexano en rotavapor y el residuo que queda se elimina en estufa a 100 °C, hasta peso constante. El contenido de materia grasa, referido a materia seca, se calcula según:

$$\% \text{ materia grasa (ref. a mat. seca)} = \frac{P_1 - P_0}{P} \times 100$$

siendo,

P= peso de muestra.

P₀= peso del matraz tarado antes de la extracción.

P_1 = peso del matraz después de la extracción.

3.4.- NITROGENO PROTEICO.

Principio.-

Se utiliza una adaptación del método Kjeldalh para determinar pequeñas cantidades de nitrógeno, del orden de 1-2 mg por ml.

El método es particularmente adecuado para la determinación de proteínas, puesto que con él no se evalúa el nitrógeno nítrico, el cianhídrico, el de hidracina, el del grupo azo, ni el nitrógeno en núcleos cíclicos.

La materia orgánica se descompone por la acción del ácido sulfúrico, quedando en forma de sulfato de amonio. Cuando este se pone en medio básico, por adición de hidróxido sódico, se desprende amoniaco, el cual se puede arrastrar con vapor de agua y valorarlo por retroceso con ácido clorhídrico. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



Para calcular el contenido en proteínas, se utiliza la regla empírica de que el % de la misma es igual al de nitrógeno multiplicado por 6,25 (regla basada en la suposición de que la proteína tiene una

riqueza de nitrógeno del 16%).

Material.-

Matraz microkjeldahl

Aparato de destilación

Camisa calefactora

Reactivos.-

Acido sulfúrico (Panreac, R.A.)

Solución de sulfato de cobre al 4% (Probus, Q.P.)

Solución de ácido clorhídrico 0,1 N (Panreac, R.A.)

Solución de hidróxido sódico 0,1 N (Panreac, R.A.)

Solución de rojo de metilo (Merck) al 0,2 %, en alcohol del 95%.

Metodología.-

En un matraz de digestión microkjeldahl, se colocan entre 122-380 mg, 2 ml de ácido sulfúrico, 0,8 g de sulfato de potasio, con objeto de aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y 1 ml de solución al 4% de sulfato de cobre, que actúa como catalizador.

El ataque se practica manteniendo el matraz en posición inclinada, unos 45 grados respecto de la horizontal, con un pequeño embudo en su boca. Inicialmente se somete a un calentamiento suave hasta que llegue a ebullición (5 minutos). Posteriormente, se aumenta

el grado de calentamiento para que el contenido del matraz se mantenga a ebullición fuerte. La operación se realiza bajo campana de gases, debido al desprendimiento de anhídrido sulfuroso. La mineralización total suele durar de 20 a 30 minutos.

Se deja enfriar y se añaden 5 ml de agua destilada fría, disolviendo la torta que se forma y se introduce en el aparato de destilación. Rápidamente se añaden unos 7 ml de solución de hidróxido sódico al 30%, se comprueba que el medio está básico añadiendo unas gotas de fenolftaleína y se cierra el embudo con una varilla. Se mantiene la destilación 10 minutos y el amoniaco que se forma se recoge sobre 10 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, introduciendo el extremo del refrigerante en la solución de ácido. Se añade como indicador una gota de rojo de metilo y se valora el exceso de ácido con álcali 0,1 N, en caliente, para evitar que el anhídrido carbónico del aire actúe sobre el indicador.

Los miliequivalentes de nitrógeno que contiene la muestra vienen dados por:

$$\text{meq de nitrógeno} = (10 - V) \times 0,1$$

donde V es el volumen de álcali gastado.

El % de nitrógeno de la muestra se calcula según:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(10 - V) \times 0,1 \times 14}{P} \times 100$$

siendo:

P la cantidad de muestra, expresada en miligramos, y 14 el peso atómico del nitrógeno.

3.5.- AZUCARES LIBRES.

Material.-

Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer Series 4, provisto de inyector manual Rheodyme 7125.

Detector de índice de refracción Perkin-Elmer LC-25.

Integrador Hewlett-Packard.

Columna Aminex HPX-87 Ca.

Reactivos.-

Etol 96% (Panreac, R.A.)

Tolueno (Quimón, R.A.)

Amberlita IR 45 OH (Merck)

Amberlita IR 120 H (Merck)

Minicolumna Sep-pak C 18 (Waters Associates)

Metodología.-

A 50 g de pulpa se le añaden 250 ml de etanol del 96%. Se mantiene a reflujo durante 2 horas, se deja enfriar y se filtra a vacío, en Büchner. El filtrado se concentra en rotavapor hasta sequedad, se añade agua destilada para disolver los azúcares y se filtra. Se vuelve a filtrar y se lleva a 500 ml en matraz aforado.

La disolución se cubre con una fina capa de tolueno para evitar desarrollo microbiano y se conserva en cámara frigorífica. La determinación de los azúcares libres se lleva a cabo por HPLC, siendo previamente necesario pasar la muestra por resinas de intercambio iónico para eliminar aniones y cationes, que interfieren luego en la determinación cromatográfica.

A 2 ml de la disolución de azúcares se añade 1 ml de disolución de 2-deoxiglucosa al 1%, y se pasan por las resinas de intercambio iónico. Cada columna se lava con agua (30 ml de agua por cada columna) y los eluyentes se recogen y evaporan en rotavapor a sequedad. Se añaden 2 ml de agua destilada, se filtra por milipore y se pasa por una columna de C 18 para eliminar pigmentos y polifenoles.

La separación cromatográfica se realiza utilizando agua como fase móvil, a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min, en condiciones isotérmicas de 84°C.

3.6.- TEXTURA DEL FRUTO.

La determinación de la textura se realiza por compresión-cizallamiento, que es la forma en que se actúa durante la masticación, utilizando un texturómetro especialmente diseñado para este fruto (*Fernández Díez et al., 1985*).

Tamaño de la muestra y número de replicados.-

Se toman muestras de 10, 15 ó 20 g de frutos deshuesados, según la madurez del mismo, procurando que la presión oscile entre 1-3 Kg/cm² para obtener resultados comparables. En el caso de aceitunas negras, se utilizan 15 g. El número de replicados necesarios para obtener una media representativa es de 10.

Expresión de los resultados.-

Los valores se dan en Kg/cm² x 100g de fruto deshuesado.

3.7.- ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Conversión en polvo de acetona.

Dado que la aceituna es un fruto con alto contenido en aceite, su eliminación constituye una parte fundamental en la preparación de la materia prima. Esta operación, basada en la trituration con acetona fría, ayuda a romper la pared celular y facilita la salida tanto de la grasa como de los enzimas, a la vez que estos son precipitados.

Material.-

Batidora (Braun)

Homogeneizador Ultraturrax T25 (Janke Kunkel)

Embudo Büchner

Cámara frigorífica (-20 °C)

Reactivos.-

Acetona (Panreac, R.A.)

Metodología.-

Se deshuesa el fruto, previamente descongelado, con deshuesadora manual y se tritura con una batidora.

Se pesan 100 g de pulpa triturada, se le añaden 1000 ml de acetona a -20 °C y se homogeneiza durante 2 minutos en Ultraturrax a velocidad máxima. Se filtra por embudo Büchner sobre papel de filtro y se lava tres veces con acetona fría (3 x 500 ml), repitiéndose en cada lavado la homogeneización en Ultraturrax.

El polvo que se obtiene, denominado polvo de acetona, se deja secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se almacena a -30 °C.

3.7.1.- Extracción de glicosidasas.

El extracto enzimático se prepara a partir del polvo de acetona.

Material.-

Agitador magnético AGIMATIC 243 (Selecta)

Reactivos.-

Solución tampón citrato (ácido cítrico, citrato sódico 500 mM, pH 4,6) (Fluka).

Metodología.-

3 g de polvo de acetona se tratan con 25 ml de tampón citrato 500 mM, pH 4,6, durante 1 hora, con agitación constante, a 4°C. El homogeneizado se filtra y en el filtrado se analizan los enzimas presentes.

3.7.2.- Medidas de actividades enzimáticas.

Material.-

Espectrofotómetro 550E, UV/VIS (Perkin-Elmer)

Baño termostático con agitación

pHmetro Digilab 518 (Crison)

Reactivos.-

Tampón citrato (ácido cítrico, citrato sódico 500 mM, pH 4,6)

Solución de carbonato sódico 500 mM

Como substratos se utilizan soluciones 500 mM de los siguientes reactivos:

- 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (Fluka)
- 4-nitrofenil- α -D-manopiranosido (Sigma)
- 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (Bohringer)
- 2-nitrofenil- α -D-arabinopiranosido (Sigma)
- 2-nitrofeil- α -D-xilopiranosido (Sigma)

Metodología.-

Las actividades α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa, α -arabinosidasa y α -xilosidasa se determinan midiendo el incremento de absorbancia que tiene lugar al liberarse p-nitrofenol del respectivo substrato p-nitrofenilderivado, por acción de cada enzima.

La mezcla de reacción contiene 0,1 ml de disolución de substrato, en tampón citrato 500 mM, 0,8 ml de tampón citrato 500 mM y 0,2 ml de extracto enzimático. Se incuba durante 15 minutos a 40°C y se detiene la reacción por adición de 5 ml de solución de carbonato sódico 500 mM. Se mide la absorbancia a 420 nm.

Se realiza el blanco correspondiente, que consiste en una mezcla idéntica a la anterior, en la que el tiempo de incubación es 0 minutos.

Expresión de la actividad enzimática.-

Se expresa en Katal (Unidad del Sistema Internacional). Se define un katal como la cantidad de enzima que convierte un mol de sustrato en producto en un segundo.

3.7.3.- Extracción de enzimas celulolíticas.

El polvo de acetona correspondiente a 25 g de pulpa se suspende en 50 ml de una disolución tampón fosfato 0,02 M, pH 6,6, durante 2 horas, en cámara frigorífica a 2,5 °C. Se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos, a baja temperatura. Se separa el sobrenadante y se filtra a través de filtro milipore de 5 µ. Al filtrado se le añade mertiolato al 1% para que resulte una concentración final del 0,01%, con objeto de evitar toda contaminación microbiana.

Este extracto, denominado crudo, se utiliza en los correspondientes ensayos enzimáticos. Posee una fuerte coloración, de marrón a violeta oscuro, dependiendo del estado de madurez del fruto.

3.7.4.- Medida de la actividad celulolítica.

Materiales.-

Baño viscosimétrico Viscobath-134, con termómetro Thermostat-634, de Crison

Viscosímetro Cannon Fenske viscosimeter (serie 150)

Reactivos.-

Solución tampón acético/acetato sódico 0,04 M, pH 5,5

Solución de carboximetilcelulosa (CMC), Solucel N-50 (Sigma, al 0,5% (p/v). Se disuelve en tampón acético/acetato de pH 5,5, empleando un agitador magnético para homogeneizar la solución. Para su conservación se añaden unas gotas de mertiolato (solución el 0,01%).

Metodología.-

La actividad celulolítica se determina midiendo la disminución de la viscosidad de la CMC, utilizada como sustrato.

Reacción enzima sustrato

En un matraz erlenmeyer de 50 ml se mezclan 5 ml de solución del extracto enzimático con 10 ml de solución del extracto enzimático y se incuba a 30 °C en baño de agua durante 24 horas, siendo el pH de la mezcla resultante 5,9.

Paralelamente, se prepara un blanco, adicionando a 10 ml de solución del sustrato, 5 ml del extracto, previamente inactivado por calentamiento a ebullición, a reflujo, durante 45 minutos.

Medida de viscosidad

Se utiliza un viscosímetro capilar de vidrio de tipo Cannon-Fenske, introducido en un baño cilíndrico de pared transparente, realizando las medidas a 30 °C y se usa como medida de viscosidad el

tiempo de descenso de la solución entre dos marcas del mismo. La estandarización se lleva a cabo midiendo el tiempo de flujo del agua.

Expresión de la actividad enzimática

Se calcula como porcentaje de descenso relativo de la viscosidad del extracto activo (A) respecto al blanco (B):

$$\% \text{ descenso de viscosidad} = \frac{\text{Viscosidad (B)} - \text{Viscosidad (A)}}{\text{Viscosidad (B)}} \times 100$$

Dichos porcentajes se convierten en unidades relativas de actividad enzimática usando la transformación de Almin et al (19).

3.7.5.- Extracción de poligalacturonasa.

Se prensan 50 g de fruto deshuesado para eliminar alpechín y aceite, se añaden 100 ml de agua y se tritura en Ultraturrax, velocidad máxima, se filtra y lava varias veces con agua destilada.

Se añaden 100 ml de solución al 2% de NaCl , se extrae durante 72 horas y se filtra.

3.7.6.- Medida de la actividad de poligalacturonasa.

La actividad se realiza de forma análoga a la indicada en 3.7.4., expresandola como porcentajes de descenso de viscosidad.

3.8.- ANALISIS DE LA PARED CELULAR.

La analítica completa en torno a la pared celular comprende la obtención del residuo insoluble en alcohol etílico, el aislamiento de pared propiamente dicha y su posterior fraccionamiento.

3.8.1.- Residuo insoluble en alcohol etílico.

Material.-

Batidora (Braun)

Ultraturrax T25 (Janke Kunke)

Embudo büchner

Reactivos.-

Alcohol etílico 96% (Merck, R.A.)

Acetona (Panreac, R.A.)

La aceituna deshuesada y triturada se trata con un volumen de etanol del 96% tal que, teniendo en cuenta la humedad del fruto, se obtenga una concentración final del 80%. Se homogeneiza durante 1 min en Ultraturrax, a velocidad máxima, se filtra a vacío por embudo büchner y el residuo se trata con un volumen igual de alcohol etílico del 80%, se vuelve a homogeneizar con Ultraturrax, en las mismas condiciones, se filtra y se lava dos veces con acetona. Se deja secar a temperatura ambiente y se pesa.

3.8.2.- Aislamiento de pared.

Para la obtención de la pared se ha seguido esencialmente el método de Selvendran, con las adaptaciones necesarias al fruto en estudio.

Material.-

Ultraturrax T25 (Janke Kunke)

Ultracentrífuga refrigerada (Sorvall)

Embudo Büchner

Reactivos.-

Deoxicolato sódico (Merck, R.A.)

Alcohol n-octílico (Merck, R.A.)

Fenol (Panreac, R.A.)

Acetona (Panreac)

Alcohol etílico (Panreac)

Metodología.-

A 50 g de pulpa triturada se añaden 200 ml de una solución al 1% de deoxicolato sódico y 2 ml de octanol, homogeneizando en Ultraturrax y se mantiene en agitación durante 2 horas, a 4 °C.

Se centrifuga a 13000 rpm durante 40 minutos, se filtra a través de embudo büchner, conservando el filtrado a 4°C.

Al residuo se le añaden 250 ml de agua destilada, se vuelve a homogeneizar en Ultraturrax, se centrifuga y filtra de nuevo. Esta operación se realiza dos veces. Las aguas de lavado se unen a la anterior y en ellas se determina la fracción de polisacáridos solubles en agua fría.

Al residuo se le añaden 100 ml de fenol-ácido acético-agua (2:1:1) se homogeneiza en Ultraturrax, se centrifuga en análogas condiciones, repitiendo otra vez la misma operación y se lava repetidas veces con acetona hasta filtrado incoloro. Este sólido constituye el material de pared.

3.8.3.- Fraccionamiento de pared.

Se lleva a cabo a partir del material de pared, que se obtiene según el procedimiento anteriormente indicado.

Material.-

Ultracentrífuga refrigerada (Sorval)

Rotavapor (Buchi)

Embudos büchner

Ultraturrax

Baño termostático

Sacos de diálisis (Sigma Pm 12000)

Reactivos.-

Alcohol etílico 96%

Alcohol etílico 80%

Oxalato amónico (Merck)

Clorito sódico (Merck)

Acido acético glacial (Fluka)

Hidróxido sódico (Merck)

Acetona (Panreac)

3.8.3.1.- Fracción soluble en agua fría.

La fracción de polisacáridos solubles en agua (PSA) se concentra en rotavapor se precipita con 5 volúmenes de alcohol etílico 96%, se centrifuga a 13000 rpm durante 40 minutos, se filtra por büchner y se seca con acetona.

3.8.3.2.- Fracción soluble en agua caliente.

El material de pared correspondiente a 100 g de pulpa original se extrae con 200 ml de agua a 75 °C, durante 30 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm, se filtra por büchner y se repite la extracción en las mismas condiciones, uniéndose los filtrados. Se concentra en rotavapor y se precipita con 5 volúmenes de alcohol etílico del 96%, se centrifuga a 13000 rpm durante 40 minutos, se filtra por büchner y se seca con acetona. Esta fracción contiene los polisacáridos solubles en agua caliente (PSAC).

3.8.3.3.- Fracción soluble en oxalato amónico.

El material correspondiente a 50 g de pulpa fresca se trata con 100 ml de solución al 1% de oxalato amónico, calentando en baño de agua a 80 °C, durante dos horas. Se centrifuga a 13000 rpm durante 40 minutos, se filtra por büchner, se lava con agua, se vuelve a centrifugar y se seca con acetona.

3.8.3.4.- Delignificación.

El material correspondiente a 100 g de pulpa original, se suspende en 200 ml de agua, en matraz de tres bocas. En una de ellas se coloca un tubo de desprendimiento de gases. Se coloca en baño termostático, en el interior de una campana extractora, adicionando octanol como antiespumante.

Se añaden 0,8 ml de ácido acético glacial y tras dos o tres minutos, se adicionan 2,3 g de clorito sódico. Se mantiene 1 hora a 75 °C, agitando ocasionalmente. La misma operación se repite cuatro veces. Al cabo de cuatro horas, se deja enfriar, se centrifuga a 13000 rpm y se filtra por crisol de porosidad 2. Se lava y centrifuga dos veces con agua destilada caliente para eliminar los restos de clorito y se seca con acetona. El residuo obtenido constituye la holocelulosa.

3.8.3.5.- Extracción de hemicelulosas.

1 gramo de holocelulosa se trata con una solución de NaOH al 10%, a la que previamente se le hace pasar una corriente de nitrógeno durante al menos dos horas, en proporción tal que resulte 1:1 respecto a pulpa original. Después de estar en contacto 24 horas, a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno con agitación constante, se centrifuga y se filtra. Se lava con la misma disolución de NaOH y se vuelve a centrifugar y filtrar. Se guarda el sobrenadante y el residuo se seca con acetona, constituyendo la α -celulosa.

Del sobrenadante se aíslan las hemicelulosas A y B de acuerdo con la metodología siguiente:

Hemicelulosas A:

El sobrenadante se acidula con ácido acético hasta pH 5-6. El precipitado, que constituye la Hemicelulosa A, se centrifuga a 12000 rpm durante 30 minutos, se filtra por büchner y se seca con acetona. En el filtrado queda disuelta la hemicelulosa B.

Hemicelulosa B:

El filtrado de la hemicelulosa A se dializa frente a agua destilada durante 24 horas. La solución dializada se concentra en rotavapor, hasta un volumen aproximado de 50 ml y se añaden cuatro

veces este volumen de alcohol etílico del 96%, con lo que precipita la hemicelulosa B. Se centrifuga, se filtra por embudo büchner y se seca con acetona.

3.9.- CUANTIFICACION DE AZUCARES NEUTROS.

Los azúcares liberados en la hidrólisis del residuo insoluble en alcohol y de las distintas fracciones de pared se determinan por cromatografía gaseosa.

3.9.1.- Hidrólisis.

Reactivos.-

Acido sulfúrico (Merck, R.A.)

Hidróxido amónico (Merck, R.A.)

Inositol (Sigma, R.A.)

Metodología.-

a) 250 mg de residuo insoluble en alcohol se tratan con 1 ml de ácido sulfúrico durante 2 horas a 40°C, se añaden 11 ml de agua y se continua la hidrólisis durante 2 horas más a 100°C. Se neutraliza con hidróxido amónico, se añade 1 ml de disolución de inositol (2 mg/ml) y se filtra.

b) 250 mg de las distintas fracciones de pared se hidrolizan en condiciones análogas a las anteriores, excepto el tiempo inicial de

hidrólisis, que se reduce de dos a una hora.

3.9.2.- Determinación por cromatografía gaseosa.

El análisis por cromatografía gaseosa de los azúcares resultantes de la hidrólisis, se lleva a cabo preparando sus correspondientes acetatos de alditol, de acuerdo con el método de *Englyst et al.* (1984).

Para calcular los porcentajes de cada azúcar se ha utilizado el método del patrón interno, utilizando inositol como patrón.

Material.-

Cromatógrafo Perkin-Elmer modelo 3920 B, equipado con detector de ionización de llama.

Integrador Hewlett Packard 3394 A

Reactivos.-

Disolución de amoníaco al 20,27% (Probus)

Borohidruro de sodio (Merck, R.A.)

Acido acético glacial (Panreac, R.A.)

1-metil-imidazol (Fluka, R.A.)

Diclorometano (Merck, R.A.)

Cloroformo (Panreac, R.A.)

Metodología.-

A 1 ml de la disolución procedente de la hidrólisis se añaden 20 μ l de hidróxido amónico, comprobándose que la disolución está básica, se adiciona una punta de espátula de borohidruro de sodio y se deja durante 1 hora a 40 °C. Se destruye el exceso de reactivo con ácido acético glacial, hasta que cese el desprendimiento de burbujas. A 100 μ l de esta disolución se añaden 0,3 ml de imidazol, que actúa como catalizador, y 2 ml de anhídrido acético, dejándolo actuar 5 minutos. Posteriormente, se añaden 5 ml de agua y 1 ml de diclorometano. La fase acuosa se desecha y la orgánica se evapora a sequedad en rotavapor. Los acetatos de alditol se disuelven en 0,1 ml de cloroformo y se inyectan en el cromatógrafo.

Condiciones cromatográficas.-

La separación de los acetatos de alditol se realiza en una columna capilar de sílice fundida, de 30 m de largo y 0,53 mm de diámetro interno. La fase líquida es la SPTM 2380 de la firma Supelco. Se ha utilizado un kit de la misma firma para la instalación de columnas capilares. Como gas portador se ha empleado helio, con un flujo de 3 ml/min. La corriente de gas auxiliar ha sido también de helio, con un flujo de 60 ml/min. La temperatura del bloque de inyección ha sido de 250 °C, la del detector 330 y la de la columna 250. Se ha inyectado 0,2 μ l de cada muestra.

3.10.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION SOBRE GEL.

La técnica se basa en la permeabilidad decreciente de las moléculas de soluto a través de una red tridimensional de gel hinchado, en función de sus pesos moleculares crecientes. Las moléculas con un tamaño mayor que los poros del gel no podrán penetrar en ellos, por lo que atravesarán el lecho arrastradas por el eluyente. Las más pequeñas se introducen en el gel, dependiendo la penetración de su tamaño y de su forma, de tal manera que tardarán más tiempo que las anteriores en salir por el final de la columna.

Características de los geles empleados.-

Son geles de dextrano (polímero lineal de glucosa) del tipo Sephadex, de la firma Pharmacia Fine Chemicals:

Sephadex G-100, con un rango de fraccionamiento de 4000-10000 para proteínas globulares y de 1000-100000 para dextranos y un tamaño de partícula de 40-120 μ . Se suministra en forma de gel seco.

Sephadex G-200, con un rango de fraccionamiento de 5000-600000 para proteínas globulares y de 1000-200000 para dextranos y de tamaño de partícula de 40 -120 μ . Se suministra en forma de polvo seco.

Eluyentes:

a) Tampón cítrico-citrato sódico 50 mM, pH 4,6

b) Tampón fosfato monosódico-fosfato disódico 20 mM, pH 7,0

A ambos tampones se añade azida sódica al 0,02% como conservante. Antes de su uso se pasan por un filtro Millipore con 0,45 μ de luz de malla y se desairean durante 1 hora.

Hinchado del gel.-

En el caso de geles Sephadex se procede al hinchado, bien a temperatura ambiente, desaireando posteriormente con ayuda de vacío, o calentando a baño maría de un modo más rápido y sin necesidad de desairear.

Para el Sephadex G-100, por cada gramo de gel se añaden 15-20 ml de tampón y para el G-200 se añaden 30-40 ml, manteniéndose durante 24 horas a temperatura ambiente, o calentando 2 horas en baño maría.

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Se emplean dos tipos de columna de la firma Pharmacia Fine Chemicals, modelos K 26/70 y K 26/100.

El flujo de eluyente se controla con una bomba peristáltica modelo P-3 de la misma firma.

Se utiliza un colector de fracciones automático, modelo

Fracc-100 y una Unidad Optica de la misma firma.

a) Fraccionamiento enzimático.

Se utiliza una columna (2,6 x 68 cm) empaquetada con Sephadex G-100.

Se aplican 4,5 ml de extracto enzimático, eluyéndose con tampón citrato 50 mM, con un flujo de 21 ml/h y se recogen fracciones de 4,8 ml. El curso de la separación se sigue mediante medidas de absorción a 280 nm y por determinación de las actividades enzimáticas.

b) Fraccionamiento de polisacáridos.

Se utiliza una columna (2,6 x 70 cm) empaquetada con Sephadex G-200.

Se aplican 3,5 ml de solución de polisacáridos, eluyéndose con tampón fosfato 20 mM, pH 7,0, con un flujo de 20 ml/h y se recogen fracciones de 4,5 ml. El curso de la separación se sigue mediante la determinación de azúcares totales (método del fenol-sulfúrico) y de ácidos urónicos (método de Blumenkrantz).

Calibrado de las columnas.

Se construyen las curvas de calibrado, obtenidas a partir de los volúmenes de elución de varias sustancias de referencia, de peso molecular conocido. La representación gráfica del coeficiente de reparto K_{av} para estas sustancias, en función de los logaritmos de sus

pesos moleculares, da la correspondiente curva de calibrado, que es lineal en el intervalo donde los pesos moleculares están incluidos en el rango de fraccionamiento del gel.

Para determinar V_0 , se usa azul dextrano 2000 de $P_m 2 \times 10^6$.

3.11.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Principio.-

El estudio en el microscopio electrónico se hace por bombardeo de un corte ultrafino de la muestra ya incluida. Existen estructuras transparentes a los electrones y otras que son más o menos densas a su paso; los electrones que logran atravesar la muestra dan una imagen en una pantalla fluorescente, con lo que las estructuras por las que pasan los electrones sin dificultad aparecen como blancas y las que ofrecen una cierta resistencia se ven como más o menos oscuras.

En una célula parenquimática se observa una vacuola central que, si la muestra no ha sido tratada con ninguna tinción específica - y dependiendo de su contenido-, es transparente a los electrones. El resto de los orgánulos celulares se encuentran entre esta vacuola y el plasmalema (membrana citoplasmática).

La pared celular se observa como una capa bien diferenciada, contigua al plasmalema. Está compuesta por fibrillas densamente empaquetadas, incluidas en una matriz granular translúcida a los

electrones. La lámina media es visible, como una región densa a los electrones, entre las paredes de dos células contiguas. En la zona fibrilar de paredes inalteradas, es posible, incluso, observar capas con distinta orientación en sus fibrillas.

Las técnicas de preparación de tejidos para su observación al microscopio electrónico se basan en una fijación (por métodos físicos o químicos) de los mismos, para evitar su alteración por movilización de sus componentes, seguida de una inclusión en resinas adecuadas a cada tipo de muestra y tratamiento.

Durante el proceso se tiñe el tejido, en distintos momentos, con acetato de uranilo y citrato de plomo, para dar mayor contraste a las distintas estructuras.

Material.-

Microscopio electrónico de transmisión (Philips CM-10)

Microtomo Reiger-Junt (Ultracult-3)

Sistema de revelado

Reactivos.-

Cacodilato sódico (Fluka)

Glutaraldehído (Fluka)

Acido clorhídrico (Panreac)

Cloruro cálcico (Panreac)

Agua

Tetróxido de osmio (Fluka)

Metodología.-

a) Fijación

Se corta el tejido en bloques pequeños en una solución de glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato 100 mM, pH 7,4 y se mantiene durante 3 horas, a 4 °C. Seguidamente se lava repetidas veces con el mismo tampón (que contenga sacarosa 160 mM), durante 2 a 12 horas.

b) Postfijación

Se tratan los bloques con tetróxido de osmio al 2%, a continuación se lavan con tampón al que se ha adicionado un 7,5 % de sacarosa para evitar que se alteren las estructuras por ósmosis.

c) Deshidratación

Se realiza con soluciones de acetona de concentración creciente (50 a 100%).

d) Inclusión en resina

Los componentes de la resina SPURR son:

ERL-4206

DER-736

Anhídrido 2-none-1-succinílico

Dimetilaminoetanol

Antes de la inclusión en resina pura, se hacen tres inclusiones sucesivas en mezclas acetona-resina, que se realizan con vacío:

- 10.- Acetona:resina 2:1; algo más de 1 hora
- 20.- Acetona:resina 1:1; algo más de 1 hora
- 30.- Acetona:resina 1:2; algo más de una hora
- 40.- Resina pura, 12 horas.

Formación de los bloques.

Las cápsulas (1 ml) se llenan hasta su mitad con la resina. Con la ayuda de un palillo, se sacan los trozos de tejido de la resina pura, se depositan en la cápsula y se llena esta completamente de resina. Se deja polimerizar 8 horas a 70 °C, ó 12 horas a 60°C.

Tinción.

Los bloque se cortan en el ultramicrotomo, utilizando una

cuchilla de vidrio y obteniéndose secciones de alrededor de 80 nm. Se colocan sobre rejilla de cobre y se flotan con acetato de uranilo, durante 30 minutos, se lavan con agua y se flota en una gota de disolución de citrato de plomo, en placa petri que contenga algunas lentejas de NaOH con objeto de retirar el anhídrido carbónico del ambiente. Se mantiene durante 30 minutos, al cabo de los cuales se lava con NaOH 0,02 N, seguido de agua destilada y se seca con papel de filtro.

4. - RESULTADOS

4.1.- ASPECTO DE LA PARED CELULAR AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Se han hecho preparaciones de pared celular, según las técnicas indicadas en el apartado de materiales y métodos de frutos verdes y maduros, para su visualización al microscopio electrónico (figuras 11 y 12). Puede observarse cómo el fruto verde presenta estructuras altamente ordenadas, en tanto que en el maduro se aprecia una notable desintegración. En los sucesivos apartados de esta tesis se estudia químicamente qué componentes han sufrido dicha degradación.

**Figura 11.- Fotografía al microscopio electrónico de un
corte de pared celular de aceituna verde.**

Figura 12.- Fotografía al microscopio electrónico de un corte de pared celular de aceituna madura.

4.2.- GLICOSIDASAS.

En esta primera parte, se da cuenta del estudio realizado sobre las glicosidasas presentes en la pulpa de aceitunas, sus características más acusadas, factores que influyen en la actividad, evolución a lo largo de la maduración, así como la determinación de sus pesos moleculares.

4.2.1.- Condiciones óptimas para la medida de actividad de glicosidasas.

4.2.1.1.- Extracción de los enzimas.

Dadas las características peculiares de la aceituna (alto contenido en materia grasa y en polifenoles), la clarificación de un extracto directo de la pulpa es prácticamente inviable debido a los graves problemas de filtración y centrifugación que se han encontrado. Debido a esto, como paso previo a la extracción, se ha optado por tratar la pulpa con acetona a baja temperatura para eliminar lípidos, humedad y algunos pigmentos, obteniéndose el denominado *polvo de acetona*.

La conversión en polvo de acetona es un método muy utilizado para la purificación de proteínas y se basa en la no solubilidad de estas en disolventes orgánicos, siendo esencial mantener durante toda la operación la temperatura muy baja (-20°C), pues de lo contrario los

enzimas se desnaturalizan.

Teniendo en cuenta que el fruto posee una humedad media máxima del 70% es suficiente un volumen de 1000 ml de acetona por cada 100 gramos de pulpa, en el primer lavado, para asegurar una concentración final de acetona por encima del 90 %, evitándose así la posible solubilización de los enzimas. Se ha comprobado que el empleo de acetona a temperatura ambiente llega a inactivar casi completamente los enzimas y que volúmenes inferiores a los indicados en el primer lavado, solubilizan parte de los mismos. Los lavados posteriores se continúan hasta que la acetona aparezca sin color, lo que se consigue con dos o tres lavados, con 500 ml cada uno.

Para la extracción se han utilizado 50 ml de tampón citrato 0,5M para 3 g de polvo de acetona ya que cantidades superiores de tampón no aumentan la concentración de enzima extraído, mientras que cantidades inferiores producen problemas de filtración y centrifugación.

Para fijar el tiempo de extracción se han estudiado tiempos de: 0; 0,5; 1; 2 y 4 horas, no habiéndose encontrado diferencias significativas por encima de una hora de extracción por lo que ha sido el fijado como óptimo.

4.2.1.2.- Tiempo de incubación.

La determinación de actividades se ha realizado mediante un análisis a tiempo fijo, es decir, el extracto enzimático se incuba con el sustrato (un nitrofenil-piranósido) durante un tiempo determinado, se para la reacción por adición de carbonato sódico y se determina la concentración de nitrofenol liberada mediante medidas colorimétricas.

Para determinar el tiempo de incubación se ha medido la velocidad de liberación de p-nitrofenol en función del tiempo. encontrándose que para todos los enzimas estudiados la cantidad de nitrofenol liberado es lineal con el tiempo aún por encima de 60 minutos de incubación.

Se ha elegido un tiempo de 15 minutos, para el cual se obtienen aumentos de absorbancia apreciables para los enzimas de menos actividad.

4.2.1.3.- Concentración del enzima.

Una vez elegido el tiempo de incubación, se ha estudiado el rango de análisis para cada enzima; es decir, entre qué valores de UA/min se mantiene lineal la relación velocidad de reacción-concentración de enzima.

Se han realizado ensayos de actividad con cantidades crecientes de extracto enzimático, entre 0.02 y 1 ml, completándose el volumen a 1 ml con tampón citrato 0,5M, se le añade 0,1 ml de disolución de substrato y se incuba durante 15 minutos.

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se representan los aumentos de absorbancia por minuto frente a los ml de extracto utilizados.

Para α -galactosidasa se obtiene linealidad hasta 0,136 UA/min, perdiéndose esta para valores superiores lo que se debe, probablemente, a que la concentración de substrato deja de ser saturante.

Para β -galactosidasa la linealidad se pierde por encima de un valor de 0,043 UA/min, lo que corresponde a 0,5 ml de extracto enzimático en el ensayo. En la α -manosidasa esta pérdida tiene lugar por encima de 0,08 UA/min que también corresponde a 0,5 ml de extracto y en la α -arabinosidasa para 0,017 UA/min que de nuevo corresponde a 0,5 ml de extracto.

Puesto que las concentraciones de substrato son idénticas en los cuatro casos, las desviaciones obtenidas para β -galactosidasa, α -manosidasa y α -arabinosidasa no se pueden explicar por el hecho de que la concentración de substrato deje de ser saturante.

La explicación más razonable es que, puesto que los extractos presentan una fuerte coloración, esta interfiera las medidas a partir de un determinado valor de absorbancia del blanco, lo que viene apoyado por el hecho de que las desviaciones aparecen en los tres por encima de 0,5 ml de extracto, que corresponde a una absorbancia del blanco de 0,8 UA.

Por tanto se puede concluir que los aumentos de absorbancia por minuto son proporcionales a la concentración de enzima hasta unos valores de 0,136 UA/min y para valores del blanco inferiores a 0,8 UA.

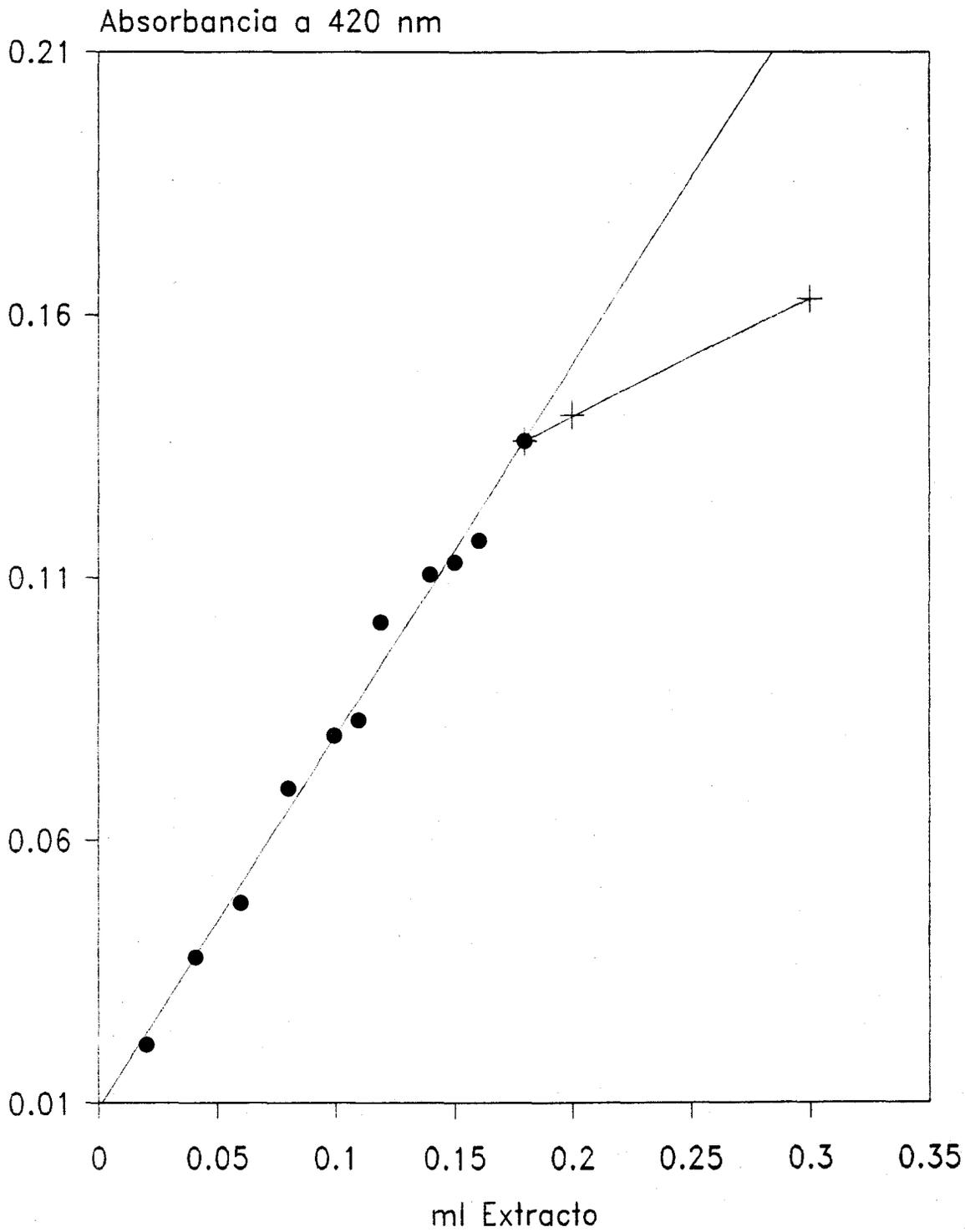


Figura 13.- Rango de análisis de α -Galactosidasa.

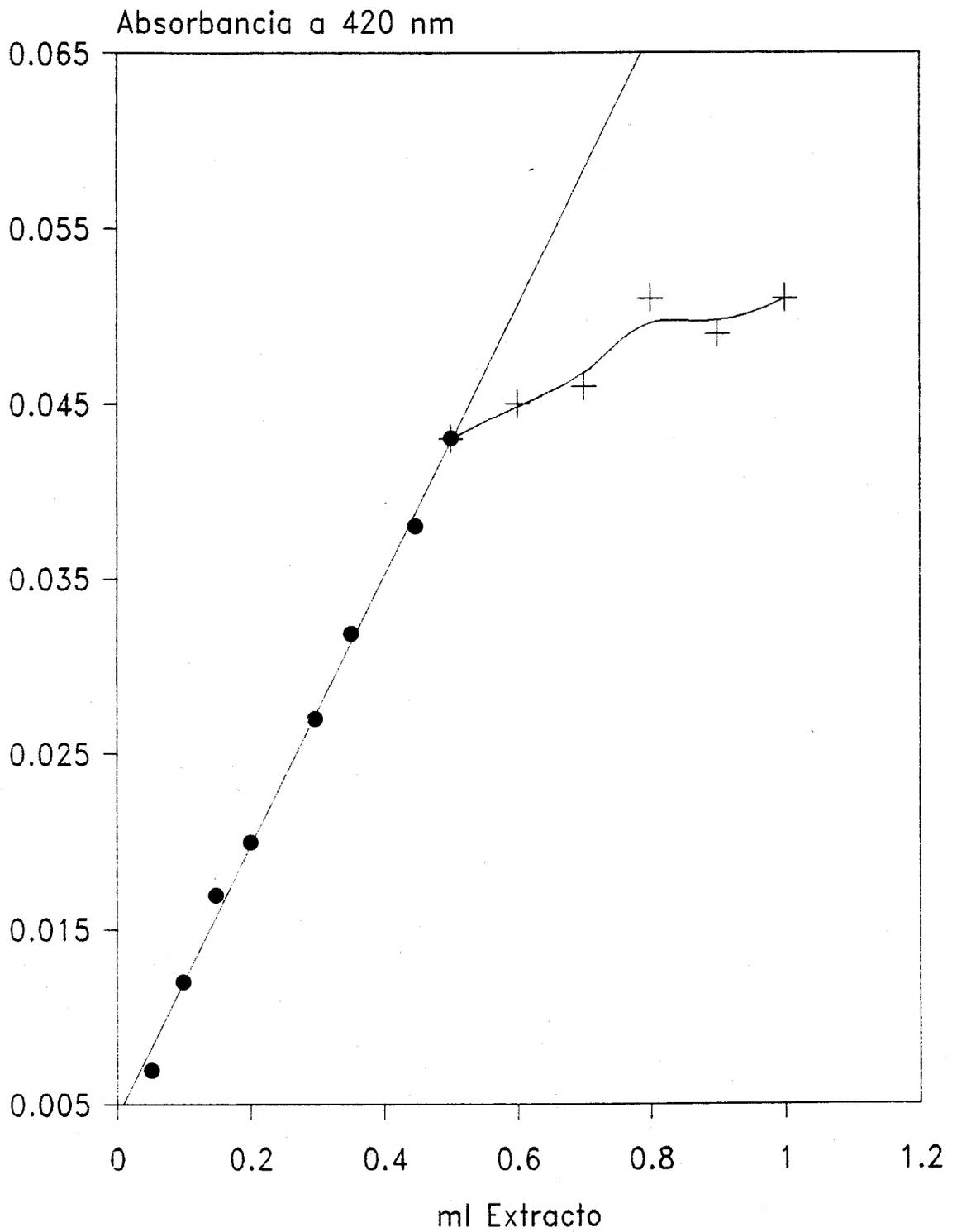


Figura 14.- Rango de análisis de β -Galactosidasa.

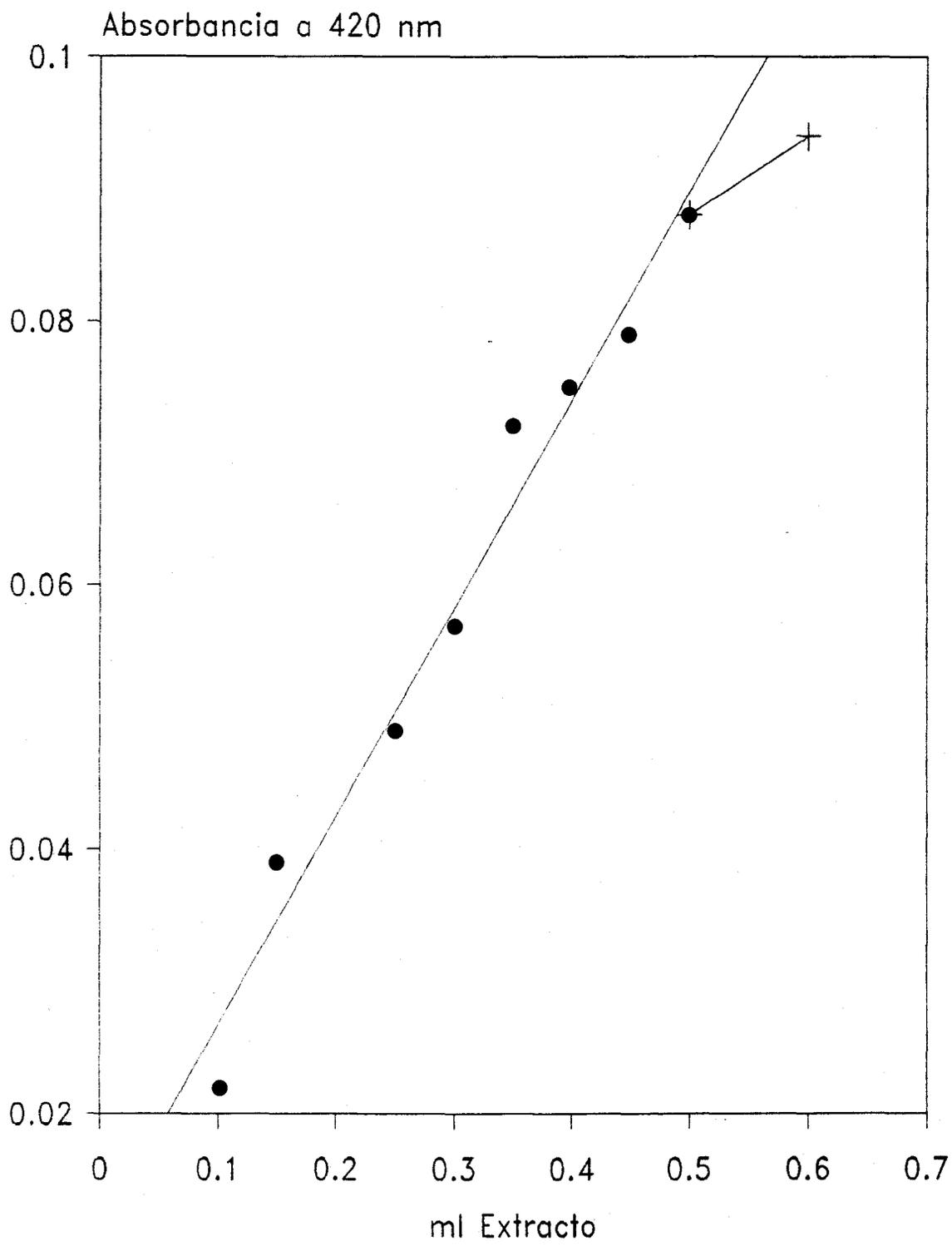


Figura 15.- Rango de análisis de α -Manosidasa.

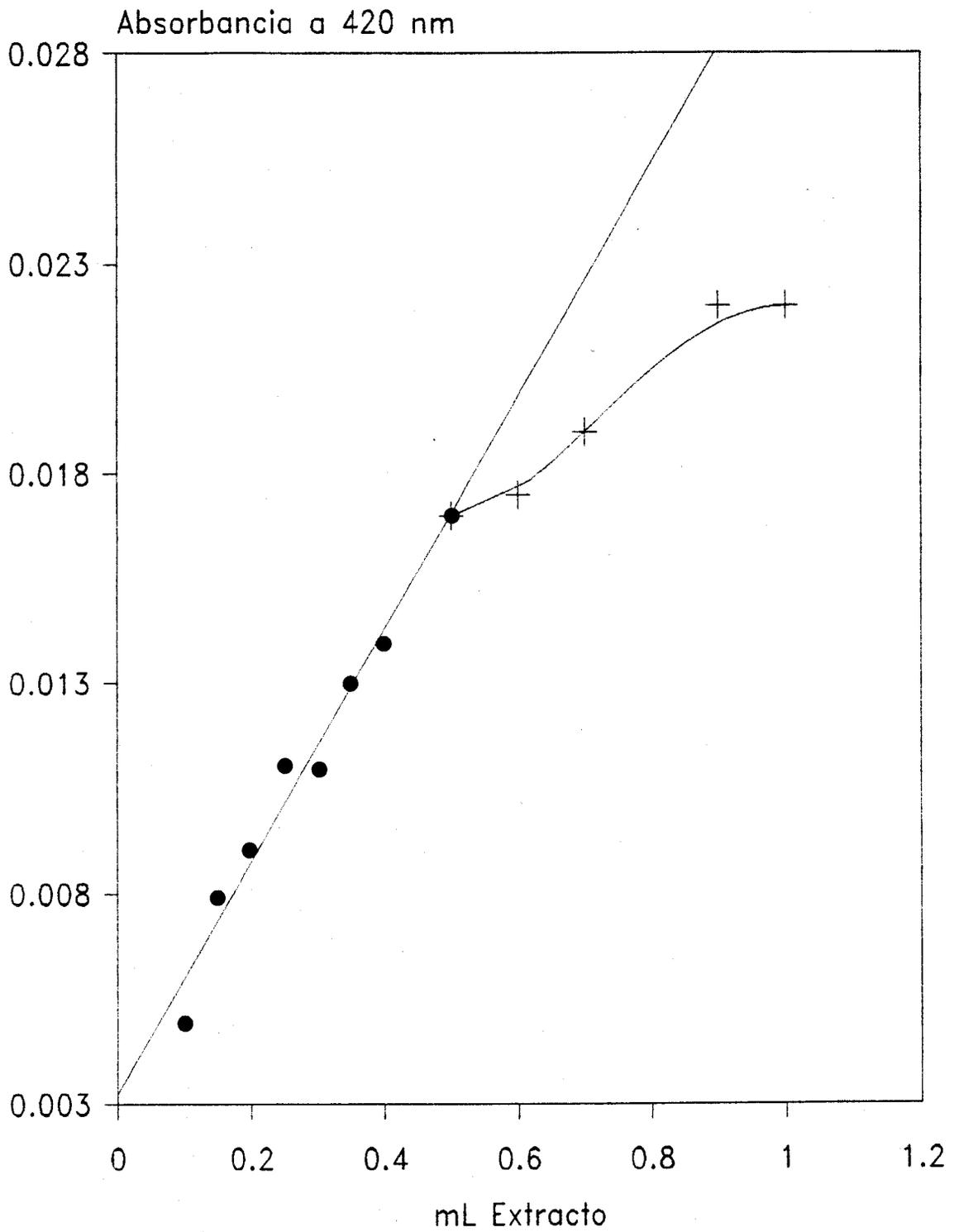


Figura 16.- Rango de análisis de α -Arabinosidasa.

4.2.1.4.- Concentración de iones H^+

Cada enzima actúa sólo en un intervalo restringido de pH. Por regla general, posee un pH óptimo característico comprendido entre 5,5 y 7,5, que está influenciado, además, por el tipo y la fuerza iónica de la solución tampón utilizada para la medida.

Se ha estudiado la actividad en un rango de pH desde 1,70 hasta 10,30. En todos los casos, los pH corresponden al del final de la mezcla de reacción.

Para valores desde 1,70 hasta 5,76 se utiliza tampón citrato-cítrico 0,5M; desde 5,76 hasta 7,03, tampón fosfato dibásico-ácido cítrico y para valores superiores a 7,03, tampón fosfato dibásico-amoniaco.

En las figuras 17, 18, 19 y 20 se recogen los porcentajes de actividad respecto del máximo, obtenidos en cada caso. Para los cuatro enzimas se obtienen pH óptimos muy similares comprendidos entre 4,3 y 5,3. En los ensayos enzimáticos se ha elegido un pH aproximado de 4,6.

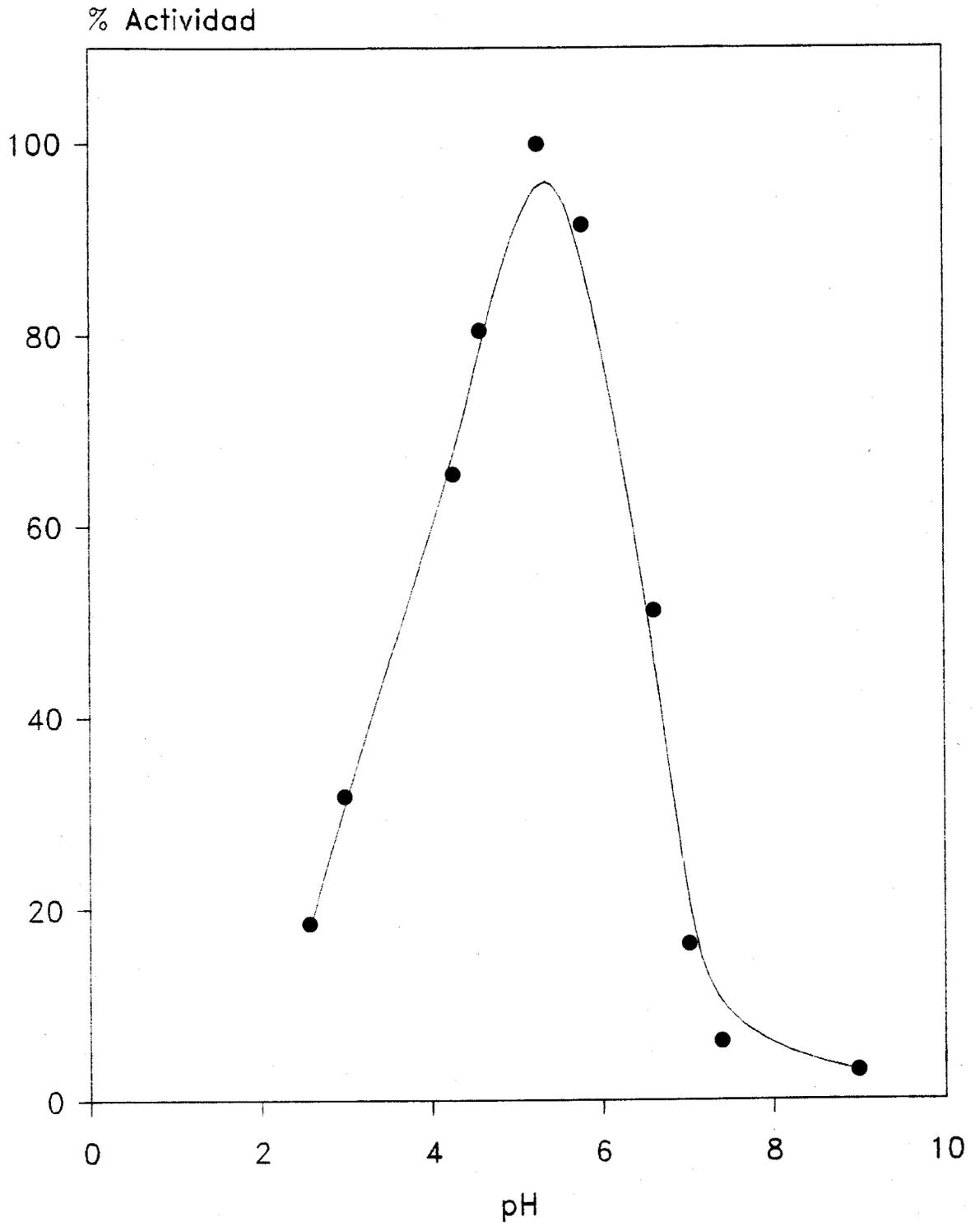


Figura 17.- Actividad de α -Galactosidasa (%) en función del pH.

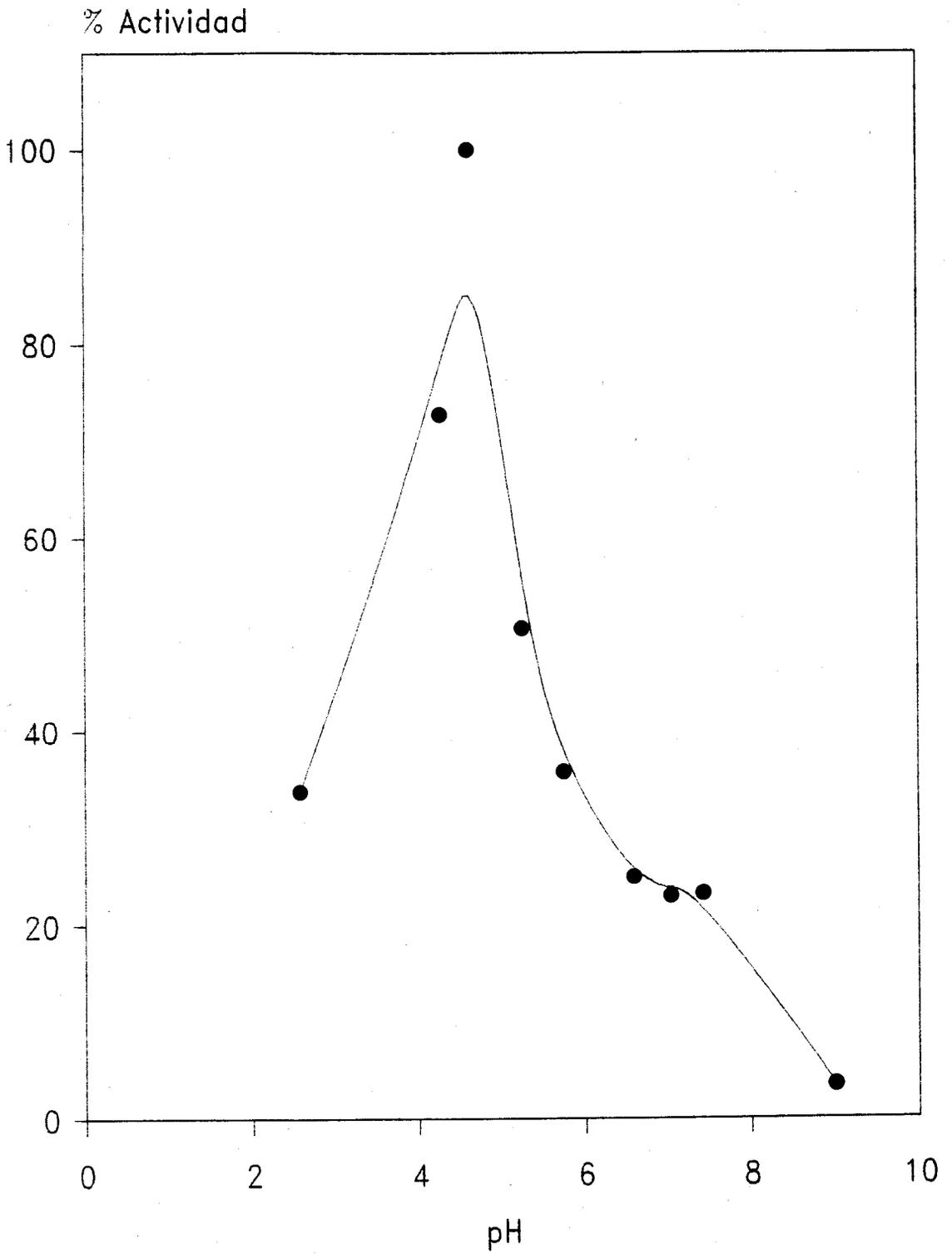


Figura 18.- Actividad de β -Galactosidasa (%) en función del pH.

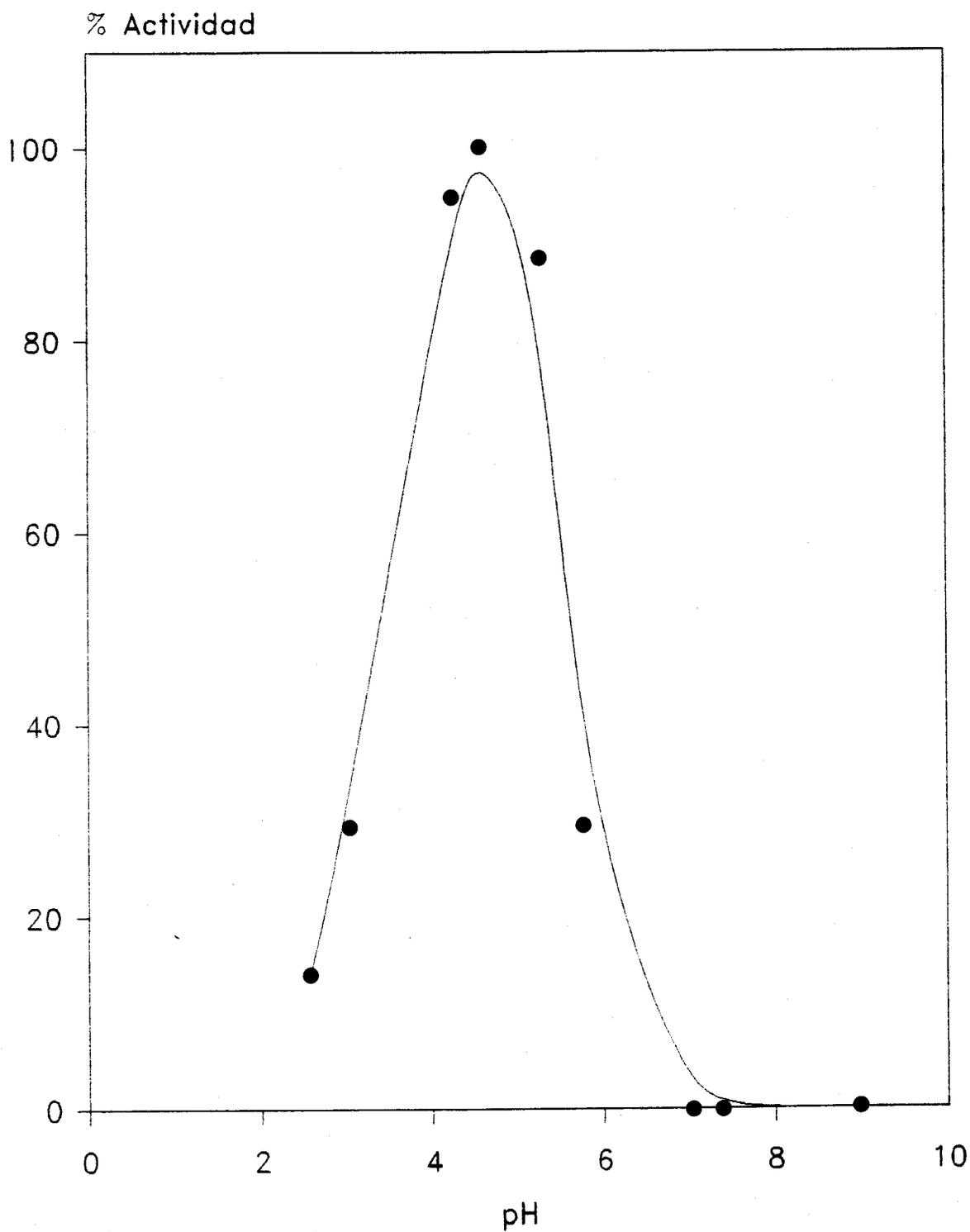


Figura 19.- Actividad de α -Manosidasa (%) en función del pH.

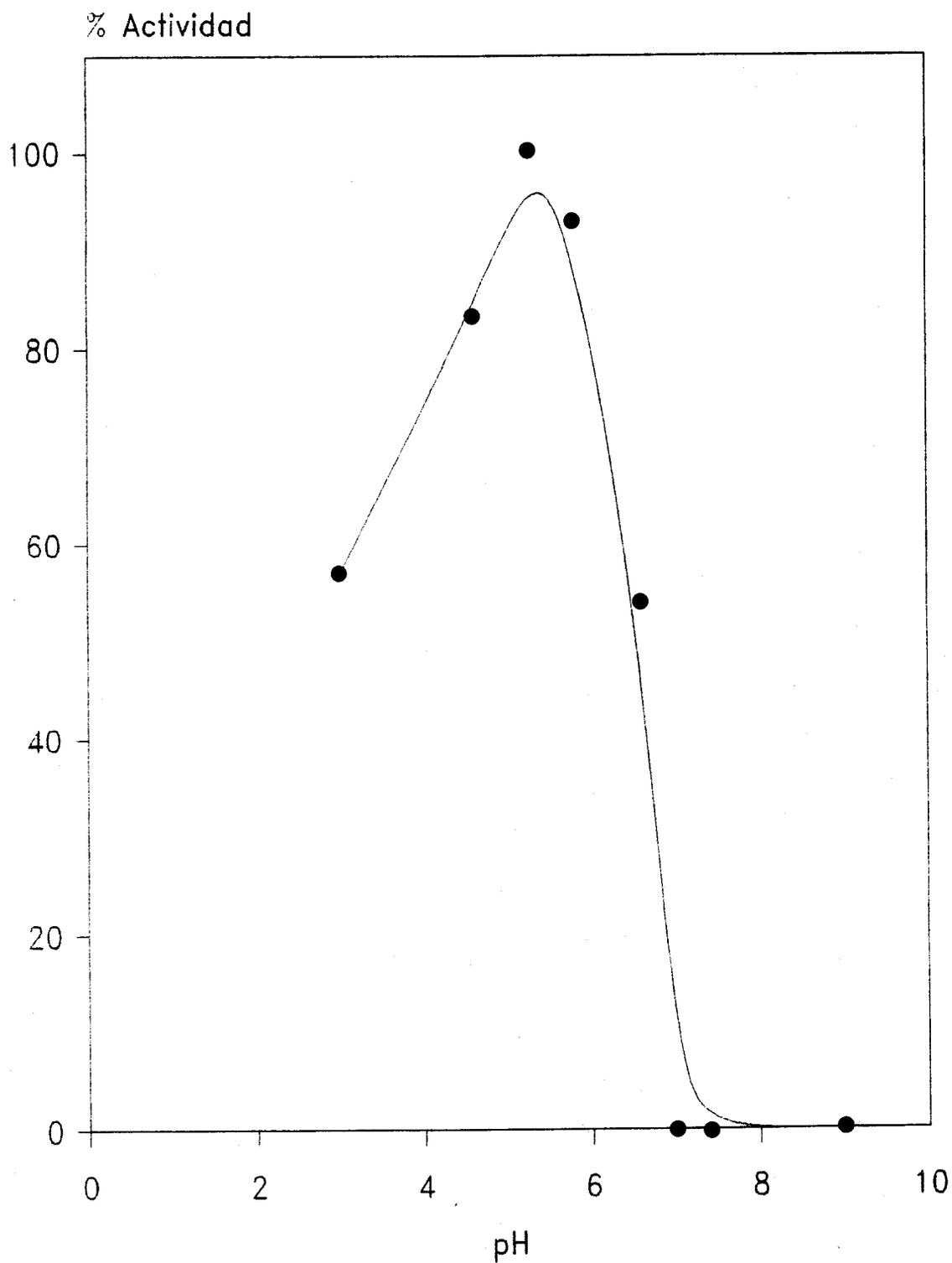


Figura 20.- Actividad de α -Arabinosidasa (%) en función del pH.

4.2.1.5.- Temperatura.

a.- Relación entre velocidad y temperatura.

Como todas las reacciones químicas endotérmicas, las enzimáticas aumentan su velocidad al hacerle la temperatura. Sin embargo, presentan la peculiaridad de que a medida que se incrementa la temperatura también se va produciendo la inactivación térmica del enzima. Por esto, existe una temperatura óptima en la cual la velocidad de reacción es máxima.

Para encontrar esta velocidad de reacción se ha medido en un rango de temperaturas entre 25 y 60 °C. Los resultados obtenidos, tras 15 minutos de incubación, se representan en las figuras 21, 22, 23 y 24.

En el caso de α -galactosidasa, β -galactosidasa y α -arabinosidasa se puede observar que la velocidad de reacción aumenta linealmente con la temperatura hasta los 50 °C, mientras que para la α -manosidasa esta relación se da sólo hasta los 40 °C.

En base a estos datos se puede estimar la energía de activación para cada enzima. La velocidad y temperatura están relacionados mediante la ecuación de Arrhenius, según:

$$\log v = \log A - (E_a / 2.3 RT)$$

donde:

v: velocidad de reacción

A: factor de Arrhenius

E_a : Energía de activación

R: constante de los gases ($8.3143 \cdot 10^{-3}$ KJ/mol)

T: temperatura expresada en grados Kelvin

Los valores encontrados para la energía de activación de los enzimas en estudio han sido:

α -galactosidasa: 69.34 KJ/mol

β -galactosidasa: 47.72 KJ/mol

α -manosidasa: 78.96 KJ/mol

α -arabinosidasa: 39.53 KJ/mol



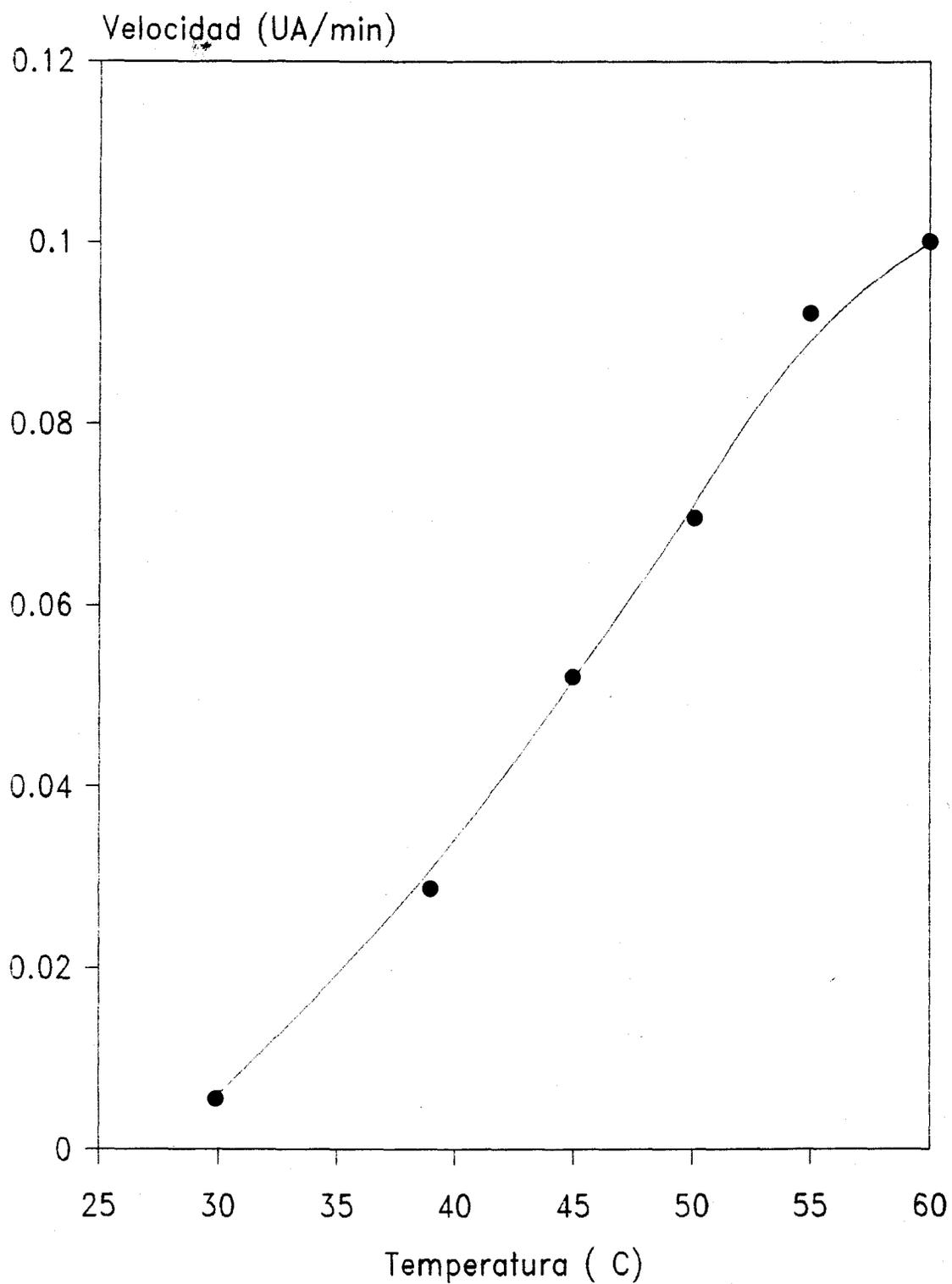


Figura 21.- Velocidad de reacción (UA/min) frente a la temperatura de incubación (°C) para α -Galactosidasa.

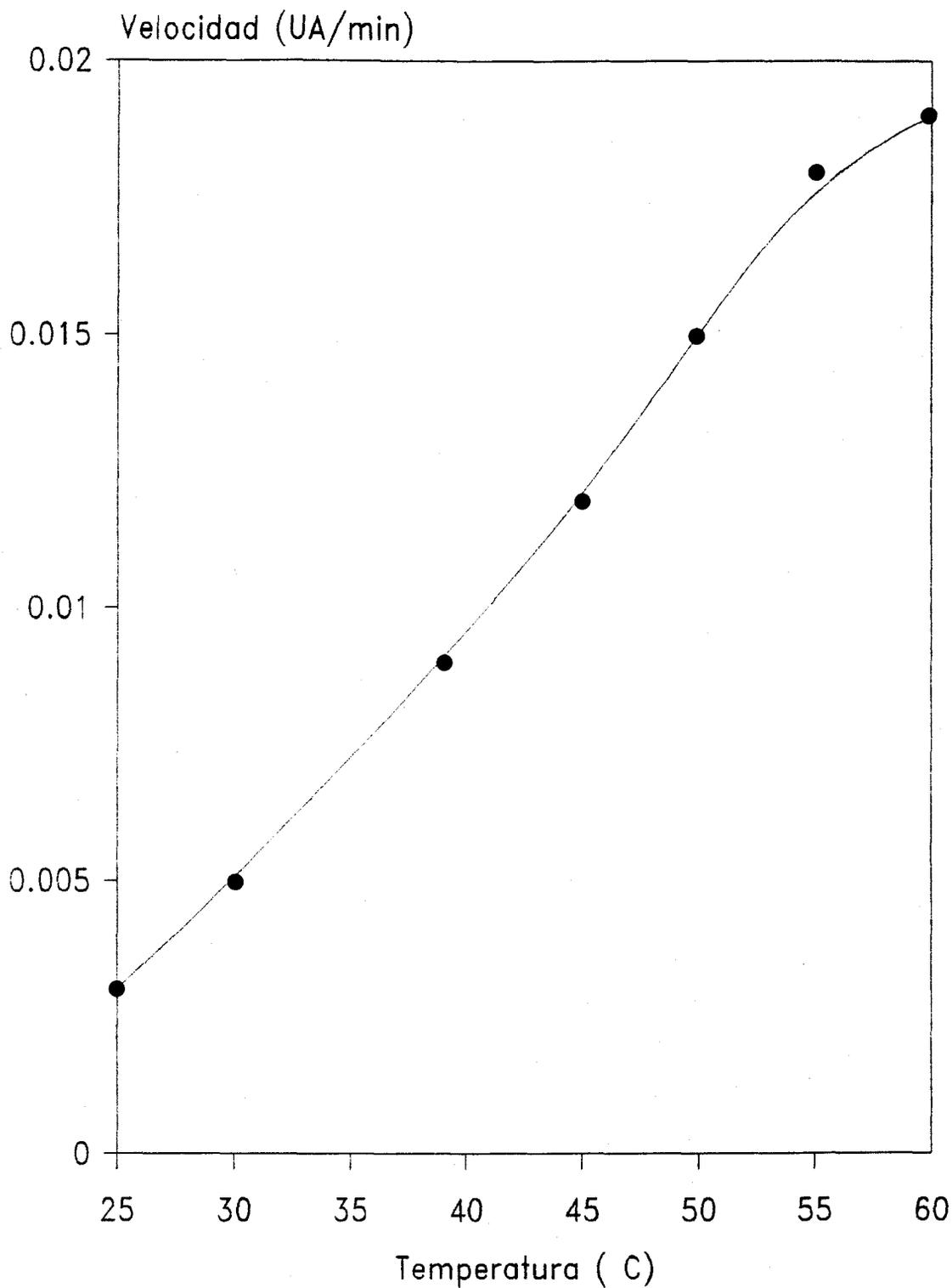


Figura 22.- Velocidad de reacción (UA/min) frente a la temperatura de incubación (°C) para β -Galactosidasa.

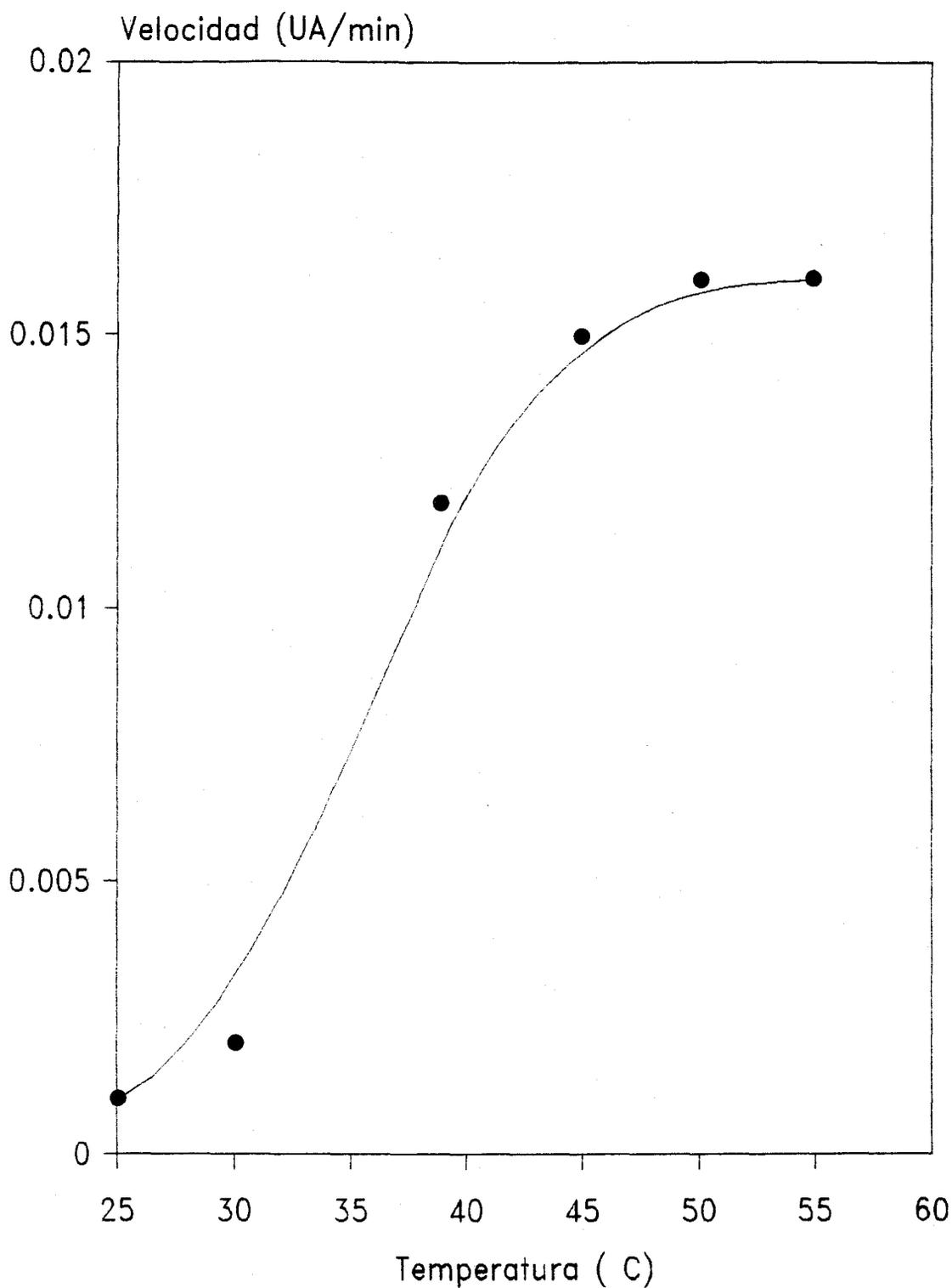


Figura 23.- Velocidad de reacción (UA/min) frente a la temperatura de incubación (°C) para α -Manosidasa.

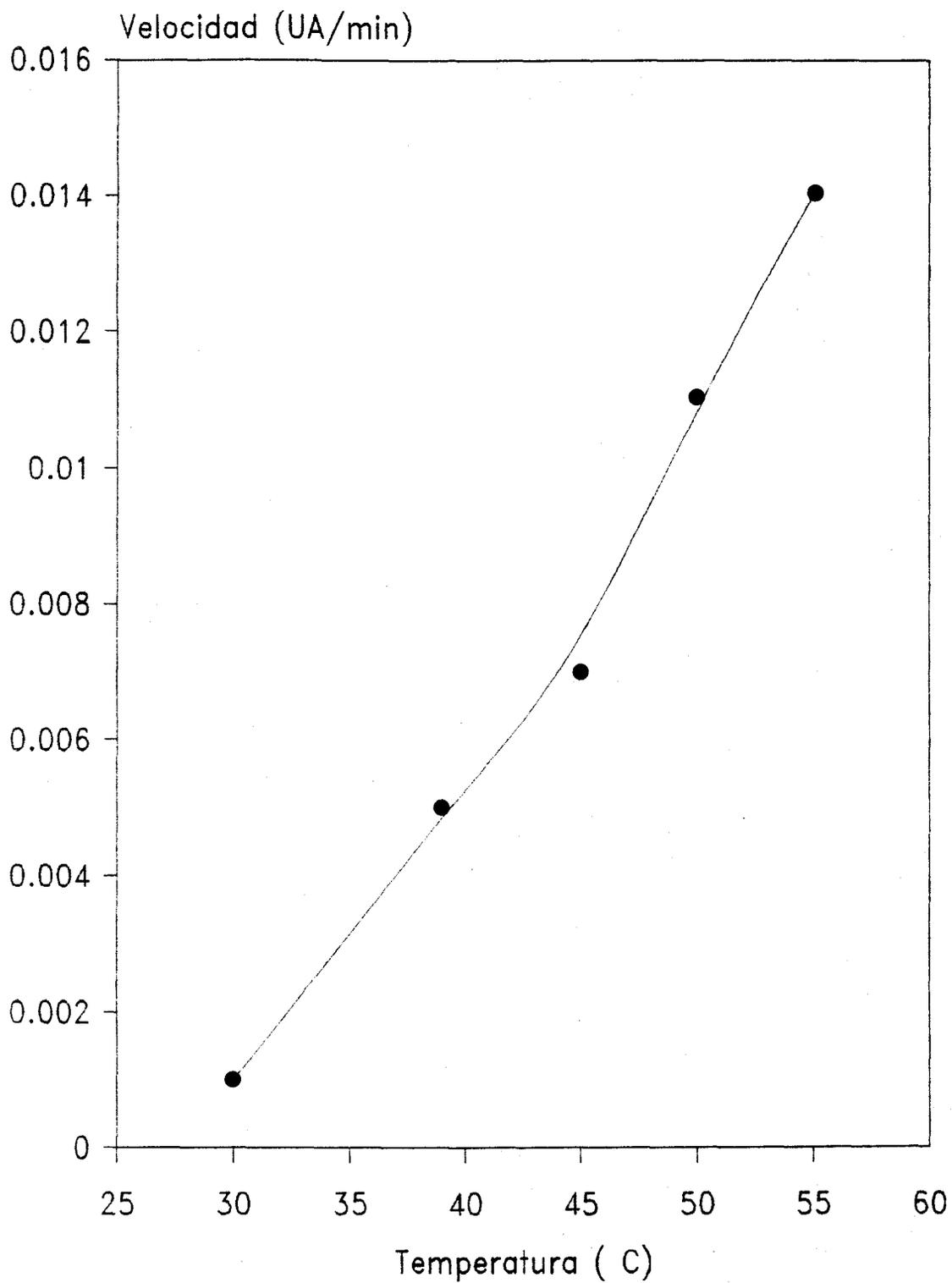


Figura 24.- Velocidad de reacción (UA/min) frente a la temperatura de incubación (°C) para α -Arabinosidasa.

b.- Estabilidad térmica.

Se ha estudiado la estabilidad de los distintos enzimas sometiéndolos a calentamiento entre 30 y 80 °C, durante 3 y 5 minutos. En las figuras 25, 26, 27 y 28 se reflejan los resultados obtenidos, observándose un comportamiento muy similar para los cuatro enzimas.

Todos son bastante estables hasta los 50 °C, aún cuando α -galactosidasa y α -arabinosidasa son ligeramente menos estables que los otros dos, ya que en los dos primeros el 40% de la actividad inicial se pierde a 55 y 60 grados mientras que para los últimos esto no sucede hasta 62 y 64 grados para β -galactosidasa y 65 y 69 para α -manosidasa.

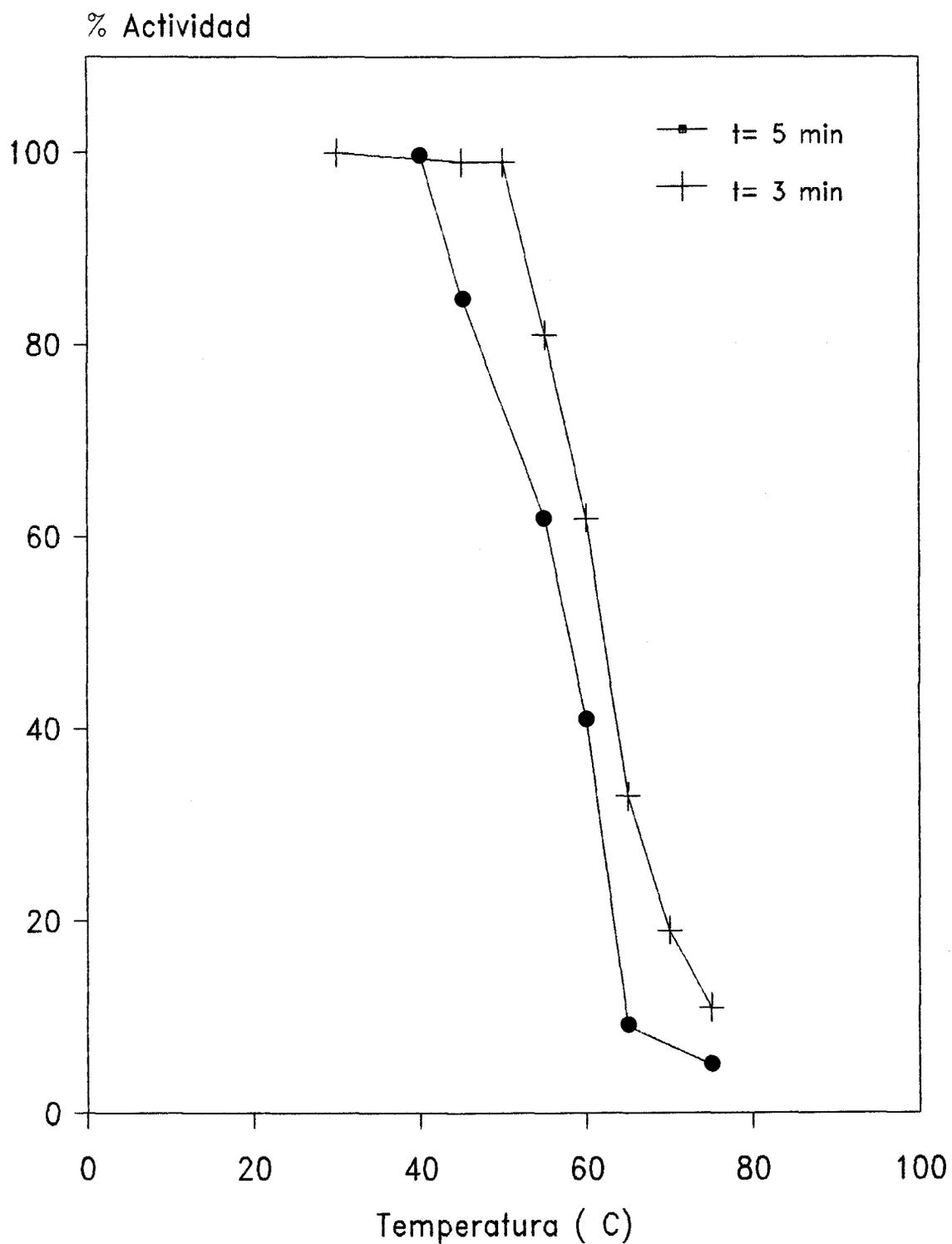


Figura 25.- Actividad de α -Galactosidasa (%) en función de la temperatura.

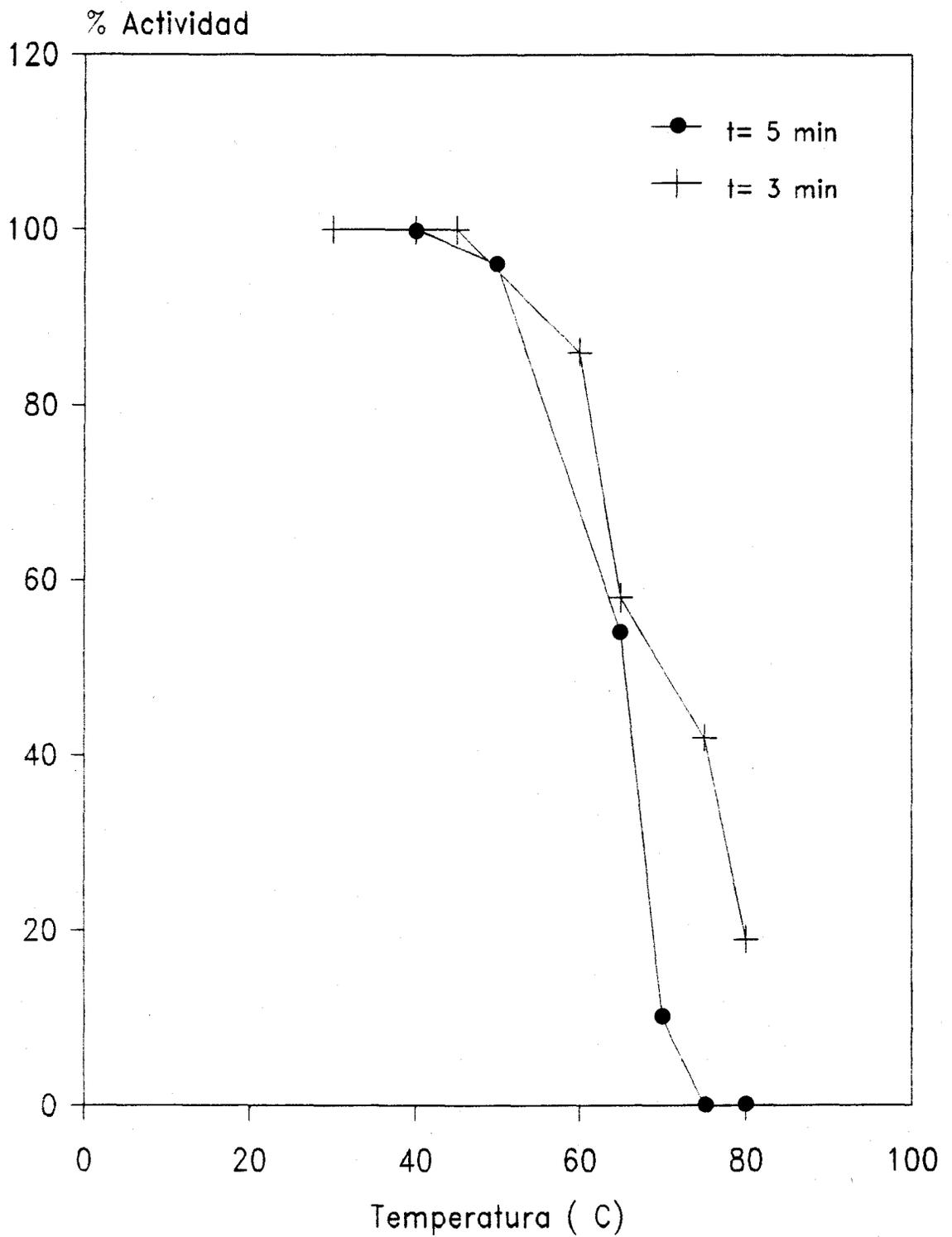


Figura 26.- Actividad de β -Galactosidasa (%) en funci3n de la temperatura.

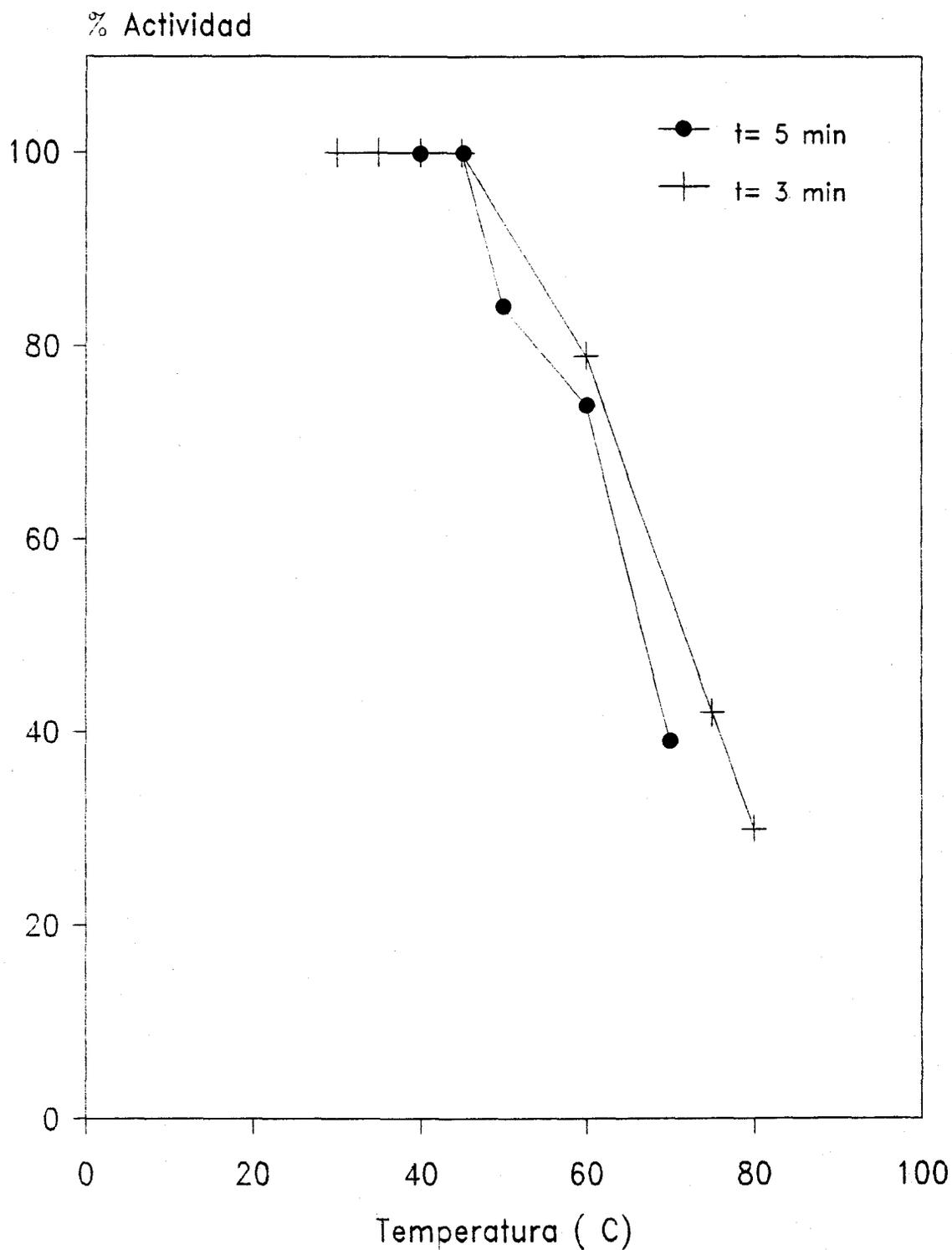


Figura 27.- Actividad de α -Manosidasa (%) en función de la temperatura.

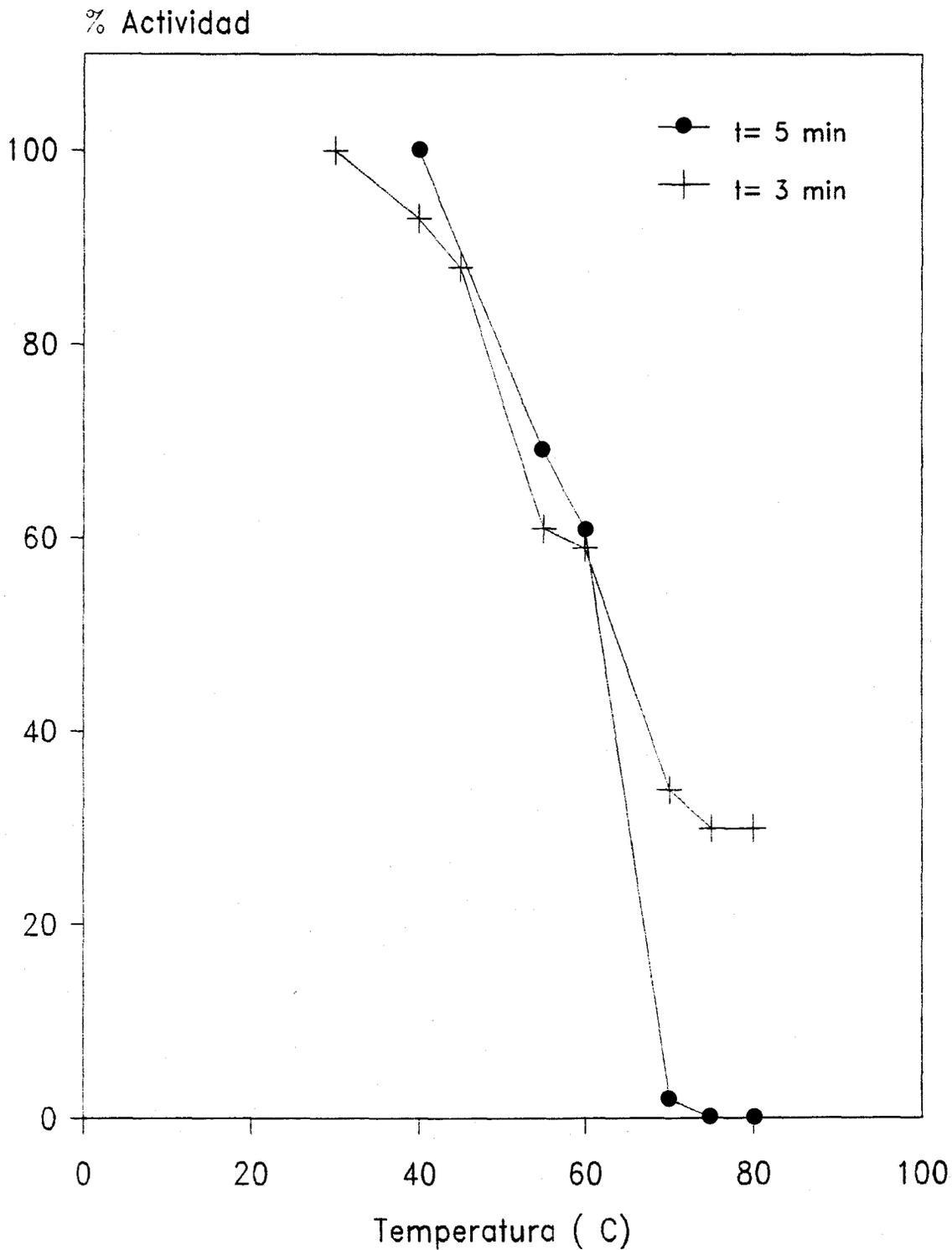


Figura 28.- Actividad de α -Arabinosidasa (%) en función de la temperatura.

4.2.1.6.- Fuerza iónica del medio.

Como último factor que puede incidir sobre la expresión de actividad enzimática, se ha estudiado la fuerza iónica del medio, para ello se ha determinado la actividad en distintas disoluciones de fuerza iónica creciente. La composición de las distintas disoluciones y su correspondiente fuerza iónica se recoge en la Tabla I.

La determinación de la fuerza iónica de las diversas disoluciones se ha llevado a cabo calculando en primer lugar la concentración de las distintas especies ácido-base presentes en el tampón: CitrH_3 , CitrH_2^{1-} , CitrH^{2-} y Citr^{3-} . Estas concentraciones vienen dadas en función del pH por las siguientes expresiones:

$$[\text{CitrH}_3] = \text{Ct} [\text{H}^+]^3 / \text{D}$$

$$[\text{CitrH}_2^{1-}] = \text{Ct} K_1 [\text{H}^+]^2 / \text{D}$$

$$[\text{CitrH}^{2-}] = \text{Ct} K_1 K_2 [\text{H}^+] / \text{D}$$

$$[\text{Citr}^{3-}] = \text{Ct} K_1 K_2 K_3 / \text{D}$$

siendo:

$$\text{D} = [\text{H}^+]^3 + K_1 [\text{H}^+]^2 + K_1 K_2 [\text{H}^+] + K_1 K_2 K_3$$

Ct = Concentración total del tampón.

La fuerza iónica de la disolución vendrá dada por:

$$F_{\text{Io}} = [\text{CitrH}_2^{1-}] + 2[\text{CitrH}^{2-}] + 3[\text{Citr}^{3-}] + [\text{Na}^+].$$

Al añadir Cloruro sódico a la disolución, la fuerza iónica del medio será:

$$F_I = F_{I_0} + [Cl^-] + [Na^+]$$

En las figuras 29, 30, 31 y 32 se recogen los datos obtenidos en cada caso, observándose que para todos los enzimas se produce una drástica disminución de actividad a medida que aumenta la fuerza iónica por encima de 1,4 mol/l.

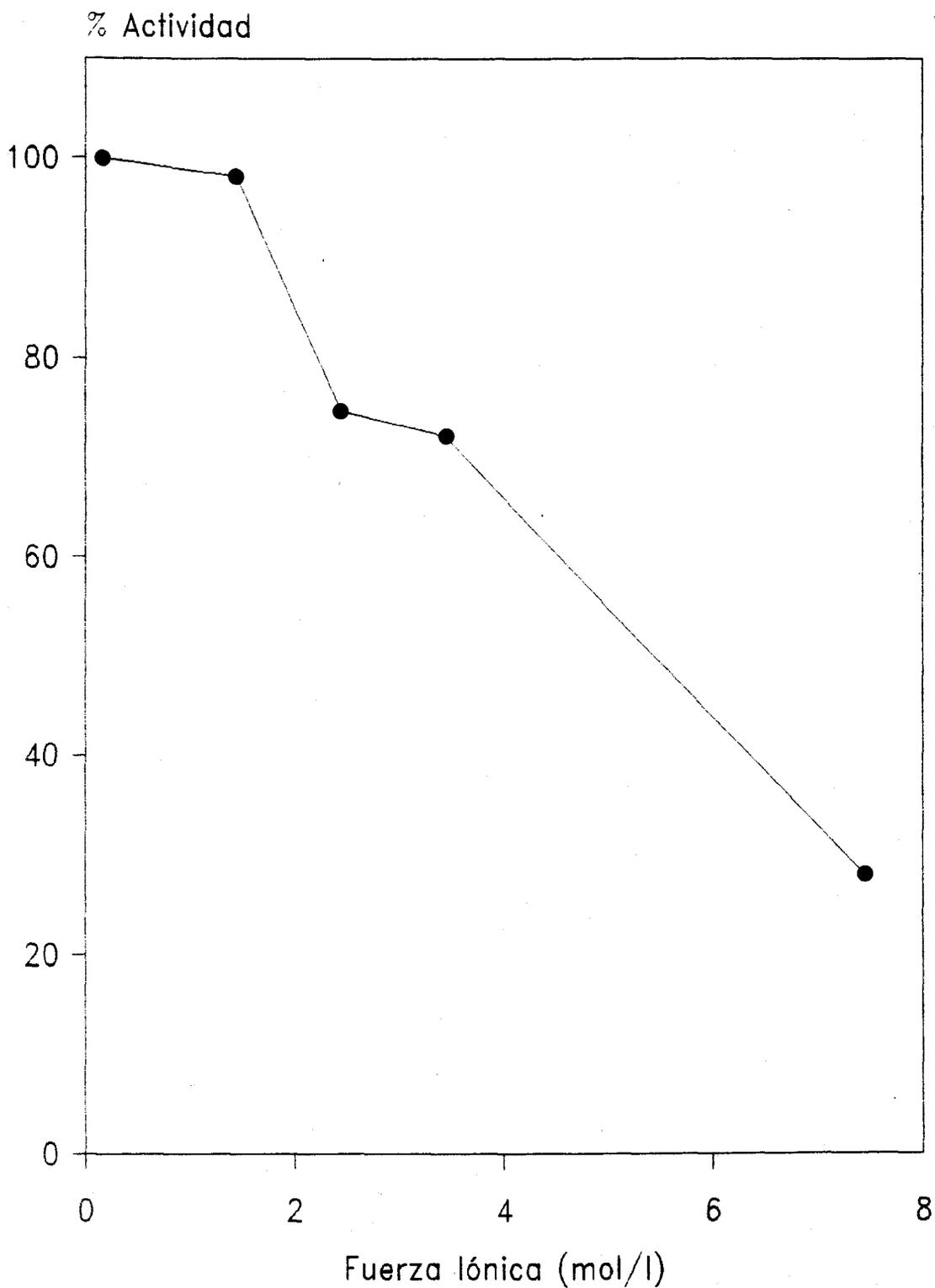


Figura 29.- Actividad de α -Galactosidasa (%) en función de la fuerza iónica de la disolución.

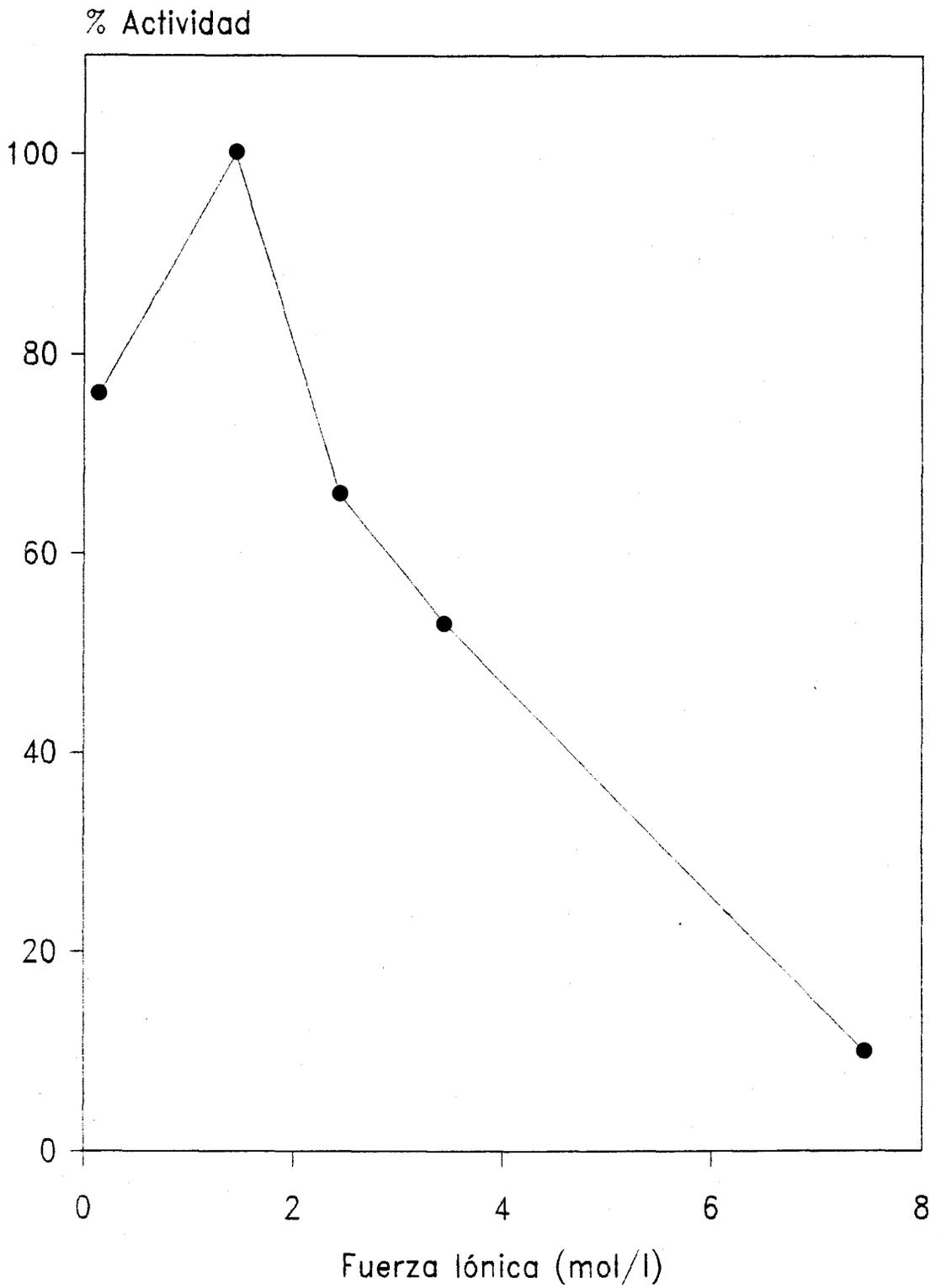


Figura 30.- Actividad de β -Galactosidasa (%) en función de la fuerza iónica de la disolución.

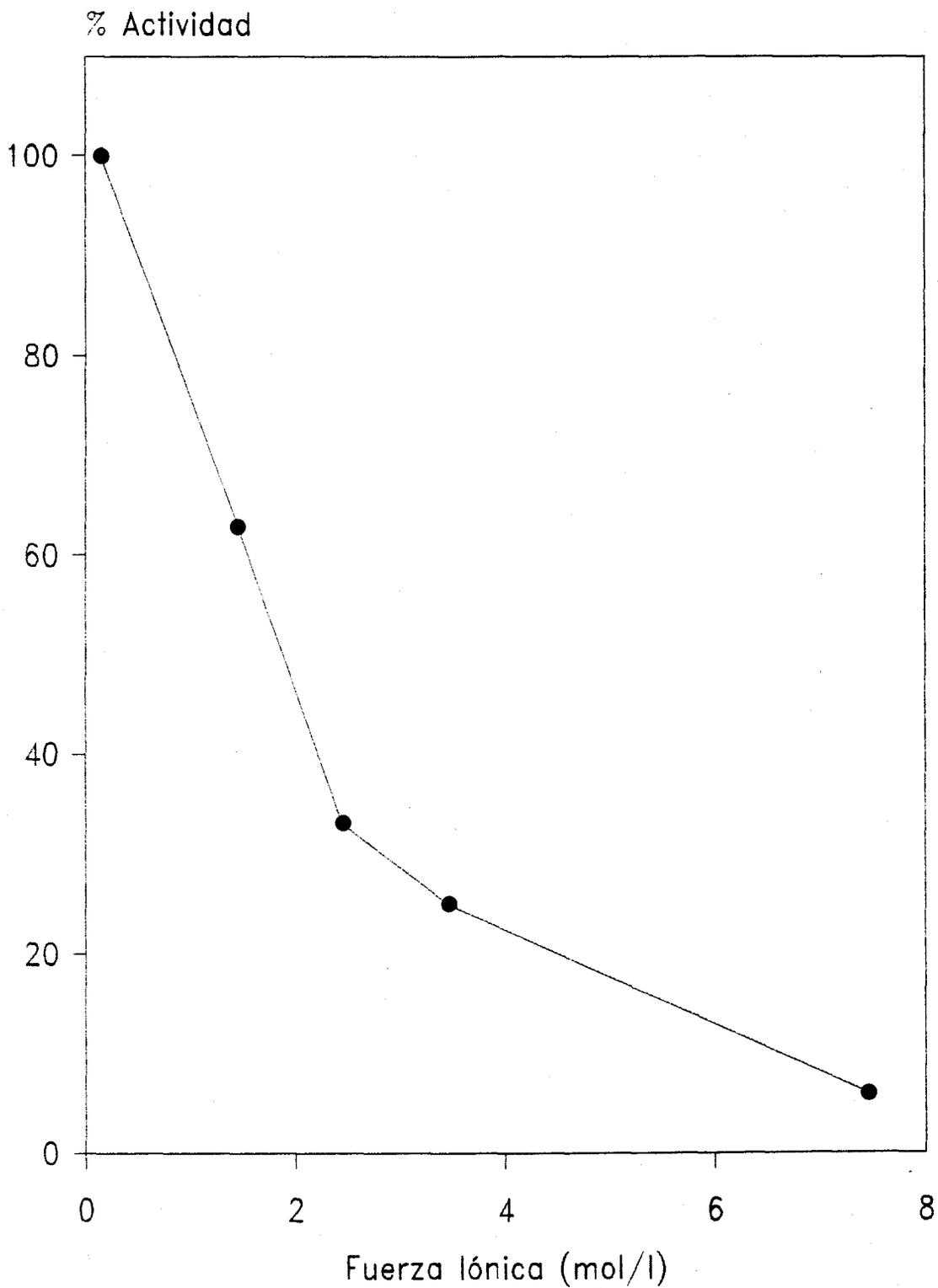


Figura 31.- Actividad de α -Manosidasa (%) en función de la fuerza iónica de la disolución.

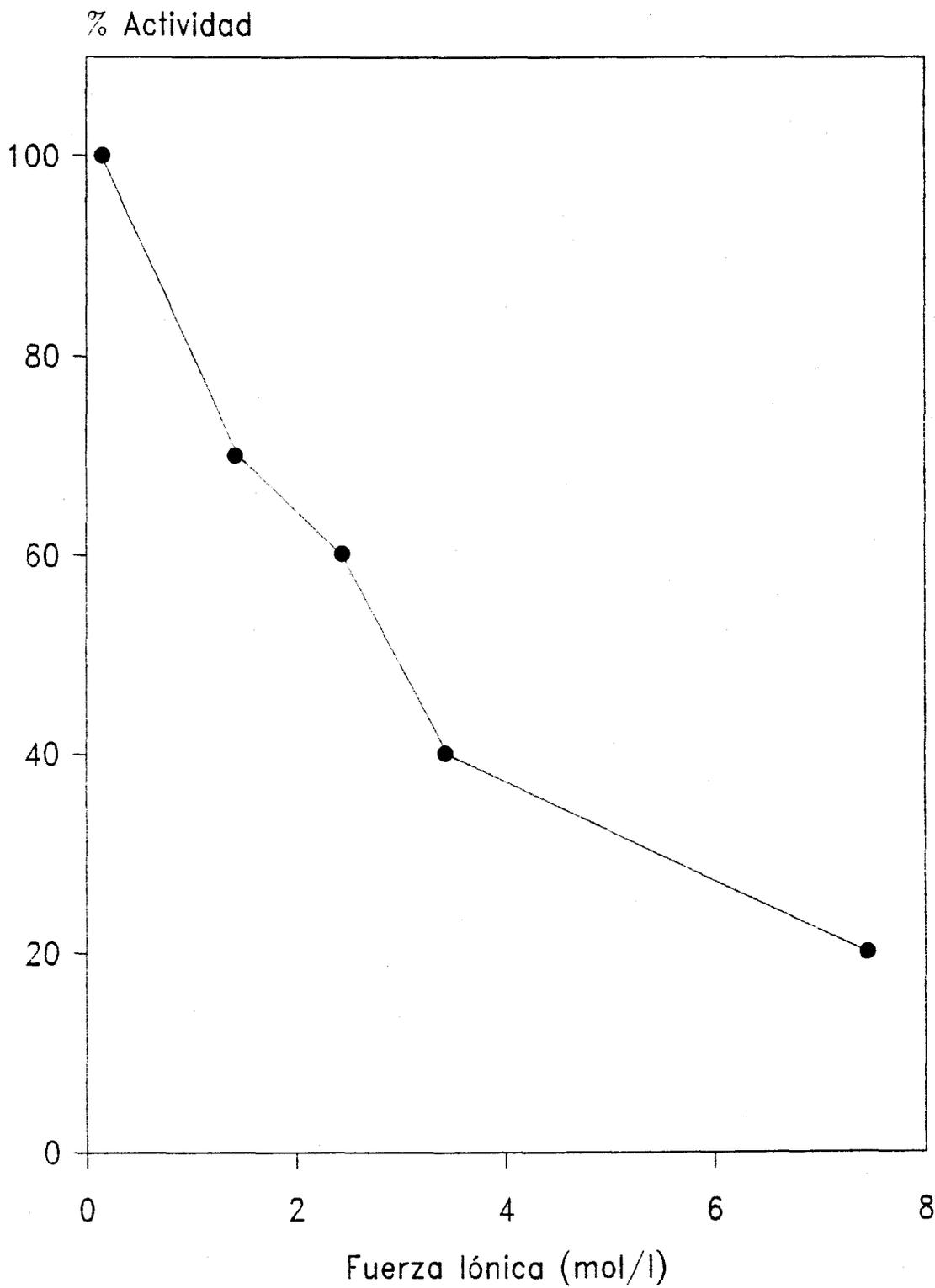


Figura 32.- Actividad de α -Arabinosidasa (%) en función de la fuerza iónica de la disolución.

4.2.2.- Evolución de las actividades enzimáticas durante la maduración

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la medida de actividad enzimática, se ha estudiado cómo evoluciona esta a lo largo del ciclo de maduración de la aceituna.

Tras realizar la reacción de incubación enzima-sustrato, la actividad se determina a partir de los datos de absorbancia a 420 nm, obtenidos por la intensidad de la coloración debida a la liberación de p-nitrofenol en la correspondiente mezcla de reacción.

La unidad de actividad enzimática es el Katal, definido como la cantidad de enzima que convierte 1 mol de sustrato por segundo en producto.

A partir de los datos de absorbancia y utilizando disoluciones de nitrofenol con concentraciones crecientes de este compuesto como patrones, se calcula la concentración en cada mezcla de reacción y el número de moles obtenidos en el tiempo de incubación, en el volumen utilizado en el ensayo. Dividiendo estos por el tiempo de incubación, expresado en segundos, se calculan los Katal de actividad que hay en el volumen de extracto utilizado en el ensayo, los cuales se refieren al volumen de extracto total.

Los resultados se refieren a 1 g de polvo de acetona y de ahí

a 100 g de pulpa inicial.

Se ha estudiado la evolución de actividades durante tres campañas consecutivas: 1987-1988, 1988-1989 y 1989-1990, cuyos resultados se recogen en las figuras 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

El enzima mayoritario encontrado en las tres campañas ha sido la α -Galactosidasa, seguido de α -Manosidasa, β -Galactosidasa y α -Arabinosidasa. La α -Xilosidasa sólo se ha detectado en la campaña 1989-90 y en cantidades muy inferiores al del resto de enzimas.

Todos los enzimas siguen un modelo de cambio muy similar, caracterizándose por una ausencia total en la aceituna en las primeras fases de la maduración, aparición de actividad en el fruto ya completamente desarrollado y en vías de ennegrecer, estado denominado usualmente de color cambiante, aumento pronunciado desde este estado hasta maduro, seguido de una estabilización y posterior disminución.

En la campaña 1987-88, los valores de actividad obtenidos son inferiores a los de las otras dos campañas, probablemente como consecuencia de haber sido recogida en una zona de climatología distinta, lo que pone de manifiesto la influencia de suelo y clima en el desarrollo enzimático.

La aparición de actividades de α y β -galactosidasas tiene lugar en todas los casos en torno a mediados de noviembre, mientras que los restantes enzimas aparecen entre quince y cuarenta días antes.

La actividad de xilosidasa, en la única campaña en la que se ha detectado, aparece a mediados de diciembre fecha muy posterior a la del resto de enzimas de esa campaña.

En las dos últimas campañas las actividades alcanzan un máximo entre los 30 y 50 días de su aparición y después disminuyen. En la campaña 87-88 las actividades aumentan continuamente para estabilizarse sobre los 60 después de su aparición, no encontrándose disminución salvo en el caso de la α -manosidasa.

También se han estudiado las actividades de poligalacturonasa y celulasa, presentandose los resultados en las tablas II y III. A la vista de estos datos y en base a las actividades enzimáticas encontradas de estos enzimas en posteriores estados de madurez del fruto (*Fernández Bolaños et al. 1989*) (*Fernández Bolaños y Heredia, 1987*) (*Heredia et al. 1990*) (*Minguez, 1982*) (*Castillo et al 1978 a, b*), se puede concluir que no existe actividad apreciable de estos enzimas en el período de maduración estudiado.

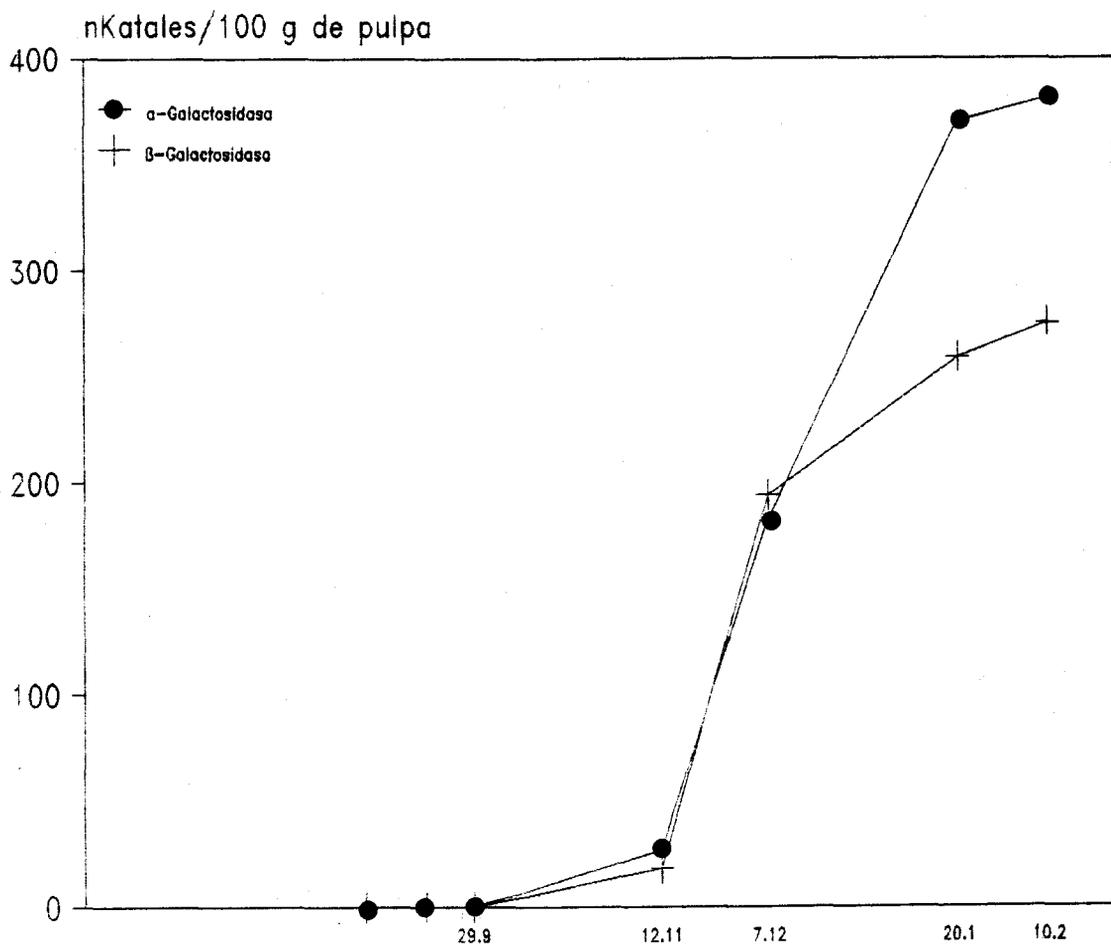


Figura 33.- Actividad de α y β -Galactosidasa durante la maduración (campaña 1987-88).

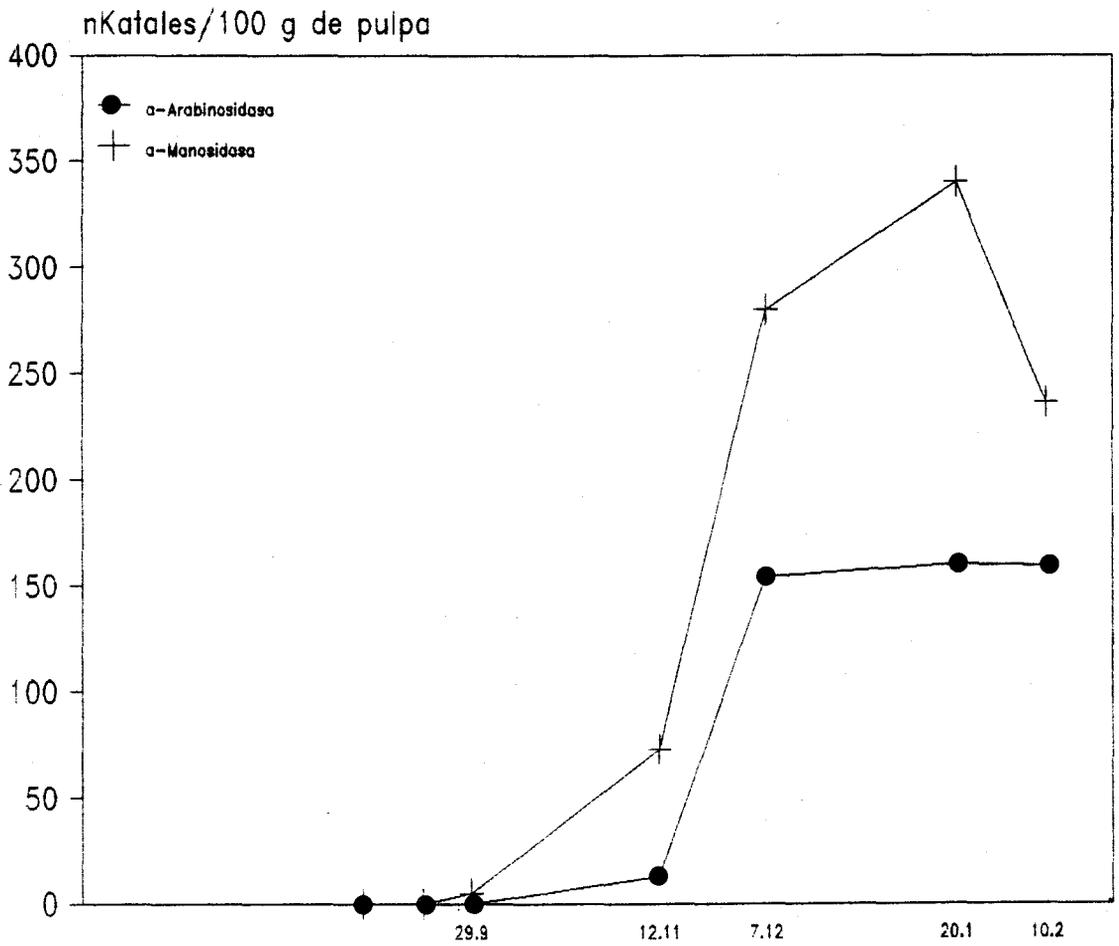


Figura 34.- Actividad de α -Arabinosidasa y α -Manosidasa durante la maduración (campaña 1987-88)

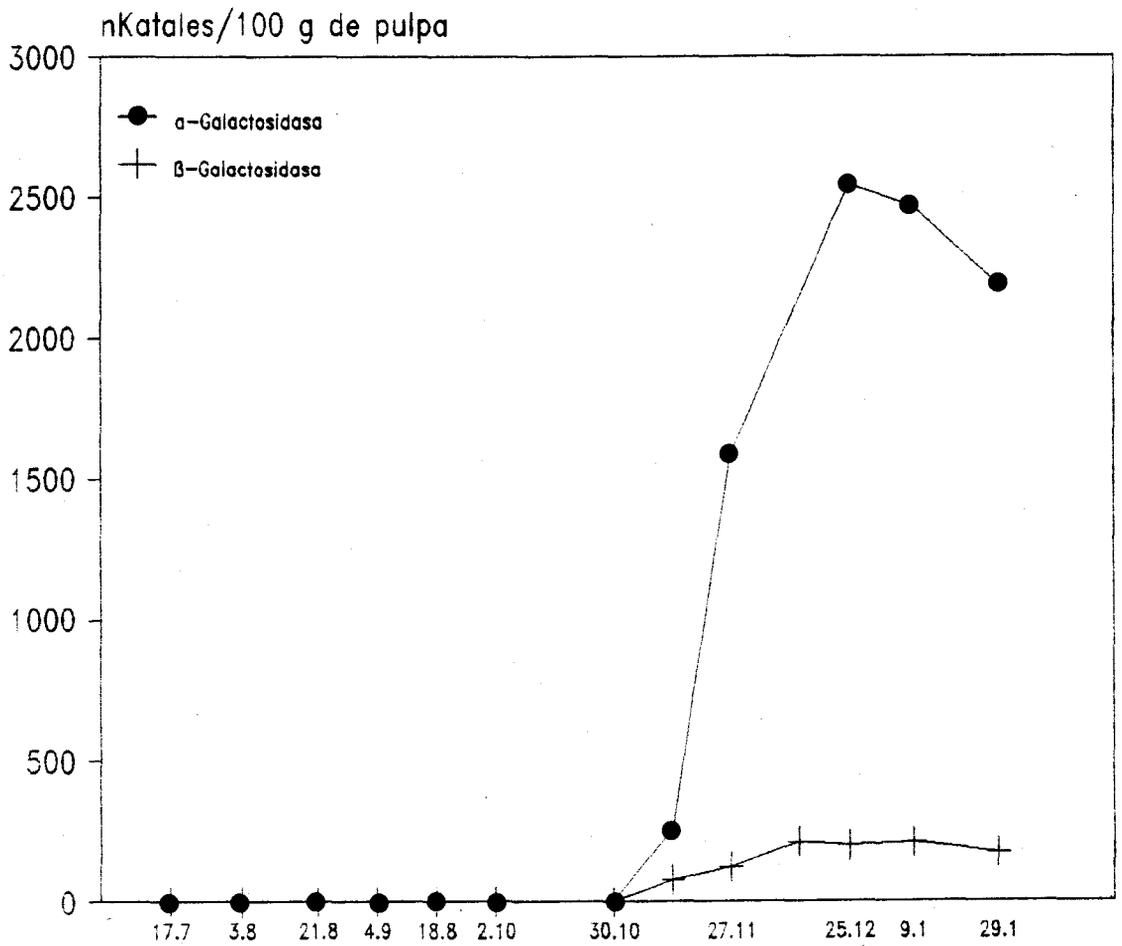


Figura 35.- Actividad de α y β -Galactosidasa durante la maduración (campana 1988-89).

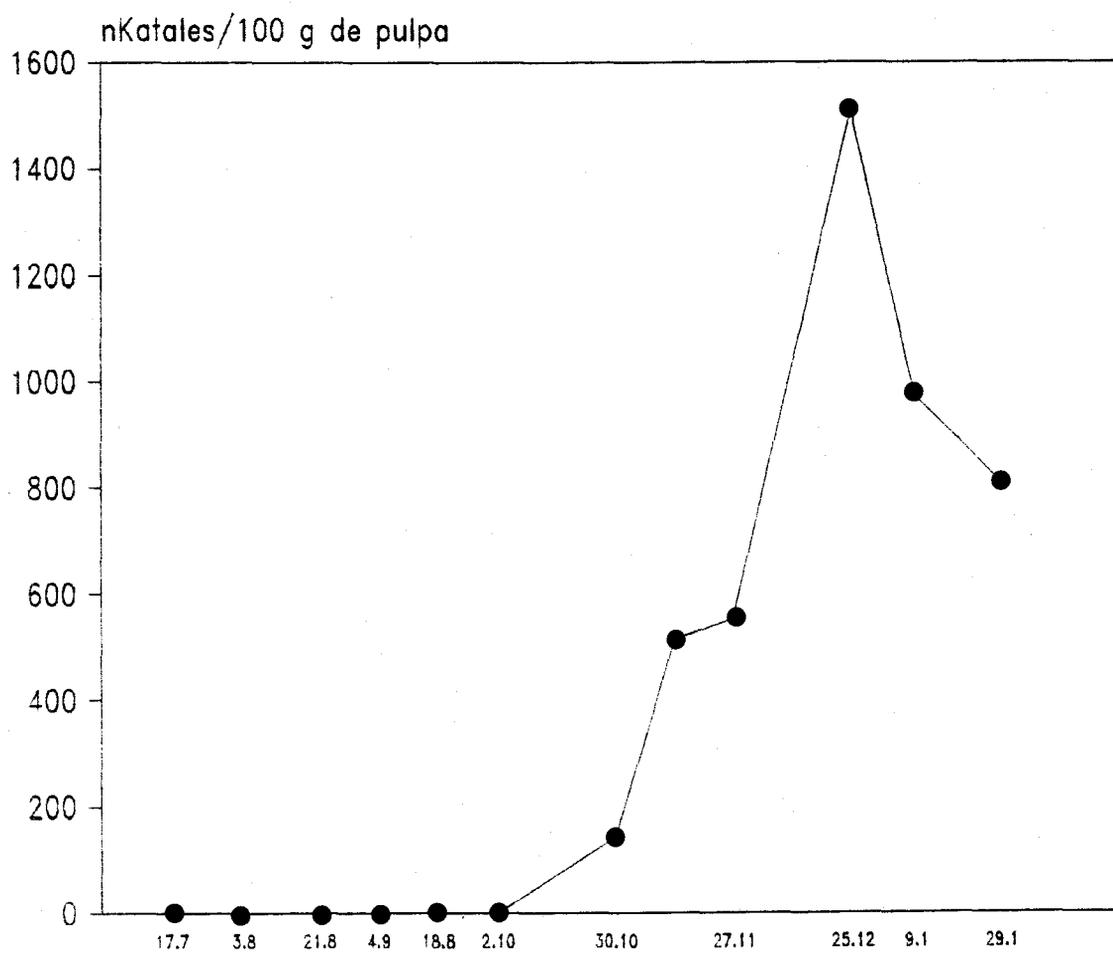


Figura 36.- Actividad de α -Manosidasa durante la maduración (campaña 1988-89).

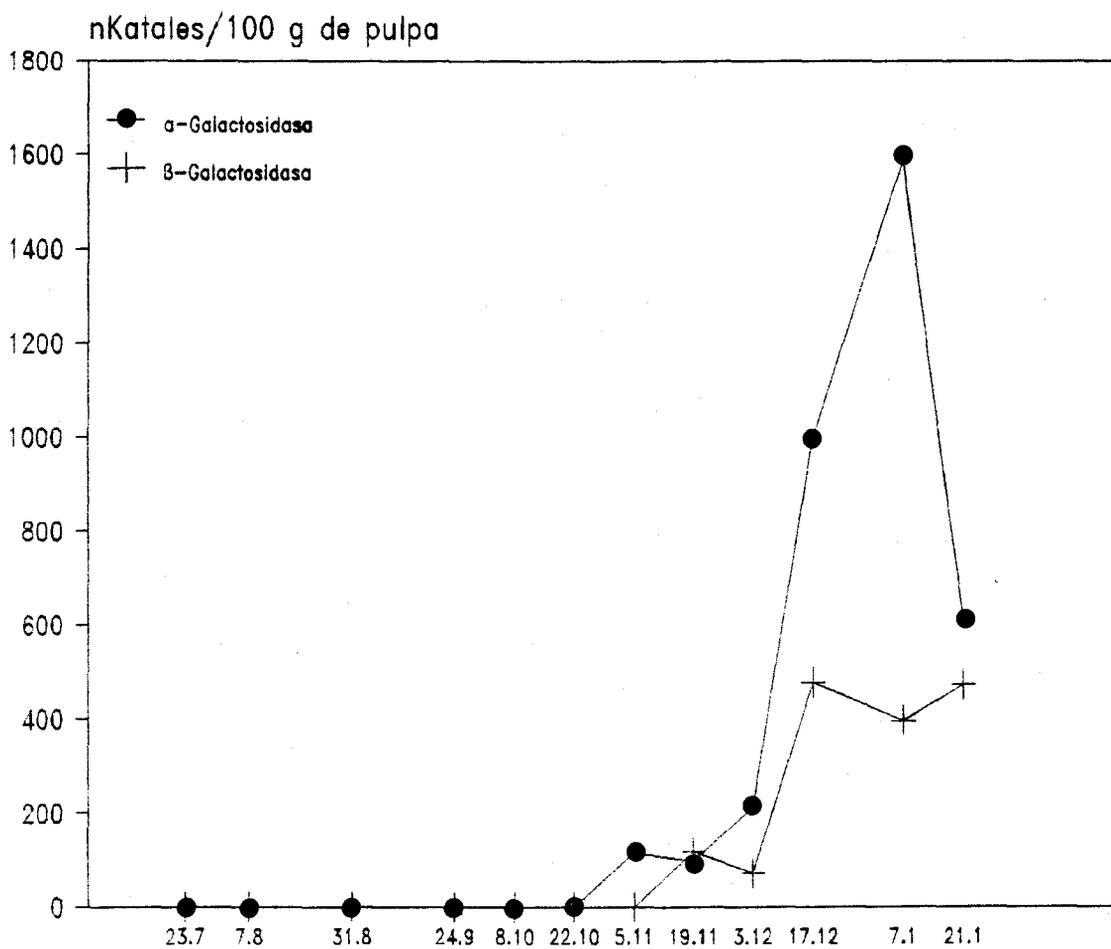


Figura 37.- Actividad de α y β -Galactosidasa durante la maduración (campaña 1989-90).

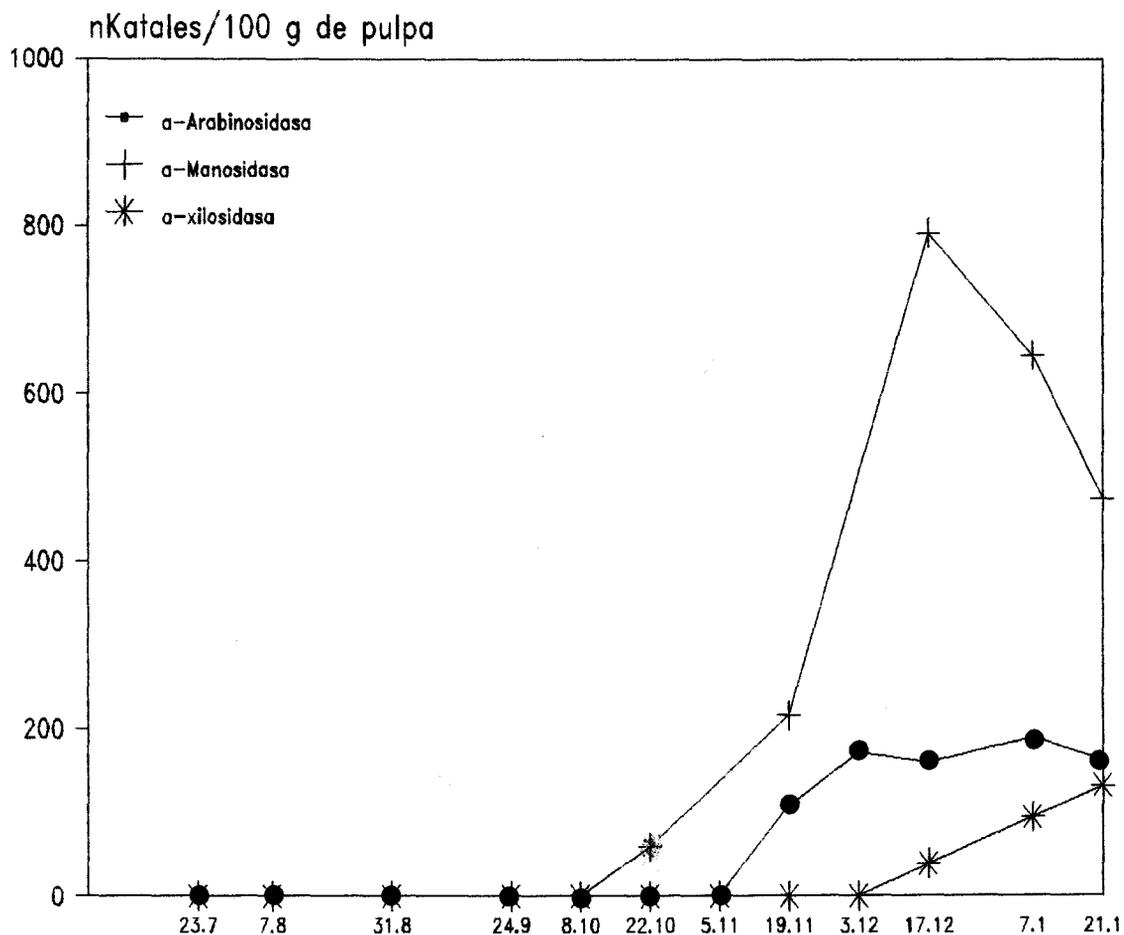


Figura 38.- Actividad de α -Arabinosidasa, α -Manosidasa y α -xilosidasa durante la maduración (campaña 1989-90).

TABLA II.- Actividad de poligalacturonasa campaña 1989-90 (% de descenso de viscosidad)

<u>FECHA</u>	<u>ACTIVIDAD</u>
22-OCT	5,0
3-DIC	4,7
9-ENE	4,2
21-ENE	8.1

TABLA III.- Actividad celulolítica durante la campaña 1988-89
(Unidades relativas B/h g).

<u>FECHA</u>	<u>ACTIVIDAD</u>
30-OCT	5,2
13-NOV	3,7
27-NOV	4,0
13-DIC	13,8
8-ENE	4,3

4.2.3.- Determinación de pesos moleculares de α -galactosidasa, α -manosidasa, β -galactosidasa y α -arabinosidasa.

Una vez establecida la presencia de enzimas y su evolución en el ciclo vegetativo del fruto, se ha procedido a la determinación de sus pesos moleculares, lo que se ha llevado a cabo por cromatografía de filtración en gel. Para ello, se ha calibrado una columna de Sephadex G-100, con un volumen total de 447,5 ml (2,6X84,3 cm). Se ha utilizado un flujo de 20 ml/h y se han recogido fracciones de 5 ml. El volumen vacío, determinado como el volumen al que eluye el azul dextrano resultó ser de 165 ml.

En las figuras 39, 40, 41 y 42 se recogen los perfiles de elución obtenidos para cada enzima.

En cada caso se encuentran dos picos mayoritarios siendo en todos el segundo debido al color de la disolución de enzima, por lo que se ha encontrado que la filtración en gel puede ser un paso previo muy bueno para eliminar la interferencia del color.

Los volúmenes de elución encontrados para cada enzima han sido:

α -Manosidasa.- 180 ml

β -Galactosidasa .- 210 ml

α -Arabinosidasa.- 210 ml

α -Galactosidasa.- 265 ml

Los patrones utilizados han sido albúmina, ovalbúmina, quimiotripsinógeno y ribonucleasa A, de pesos moleculares entre 13700 y 67000.

En la tabla IV se recogen los valores del peso molecular (Pm), volumen de elución, Kav y log Pm para cada patrón, y en la figura 43 la correspondiente recta de calibrado, cuya ecuación ha resultado ser:

$$K_{av} = -0,663 \log Pm + 3,35$$

con un coeficiente de correlación de 0,999.

Los pesos moleculares estimados son:

α -Manosidasa.- 93000

β -Galactosidasa.- 64000

α -Arabinosidasa.- 64000

α -Galactosidasa.- 33000

TABLA II.- Patrones utilizados en la determinación de pesos moleculares de glicosidasas.

	<u>Peso molecular</u>	<u>V. elución (ml)</u>	<u>Kav</u>	<u>log Pm</u>
Albúmina	67000	179	0.048	4.82
Ovalbúmina	43000	210	0.160	4.63
Quimiotrip- sinógeno	25000	263	0.350	4.40
Ribonucleasa A	13700	311	0.520	4.14

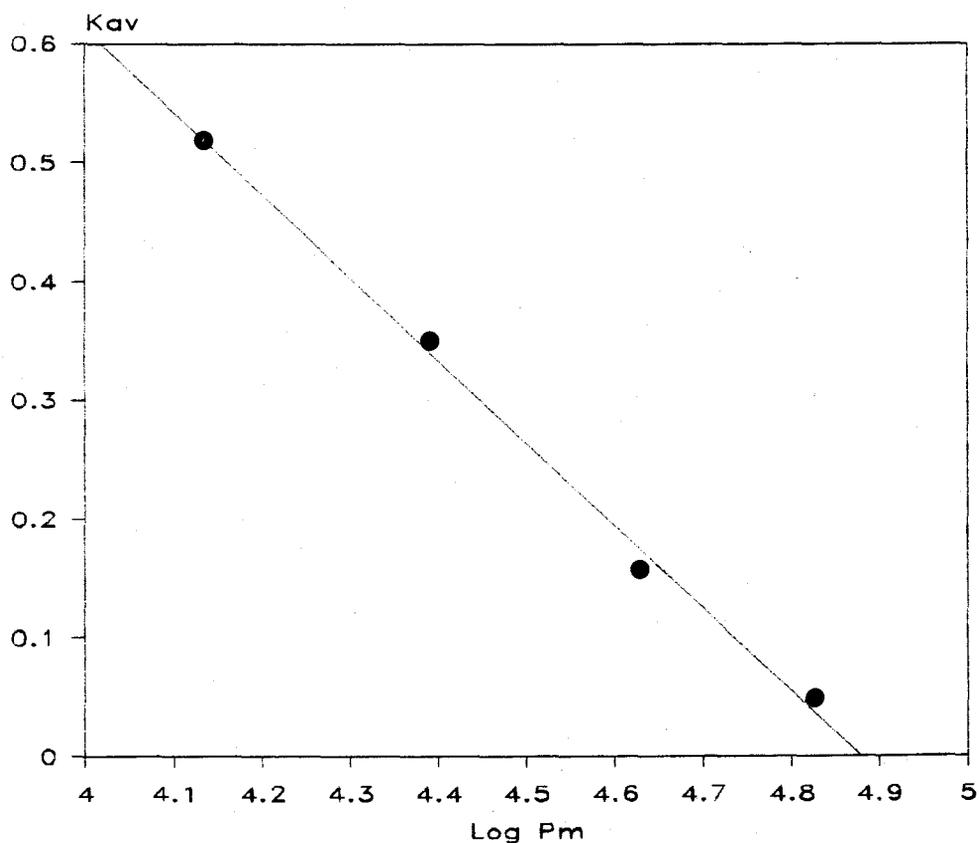


Figura 43.- Representación de log Pm frente a Kav para proteínas patrones.

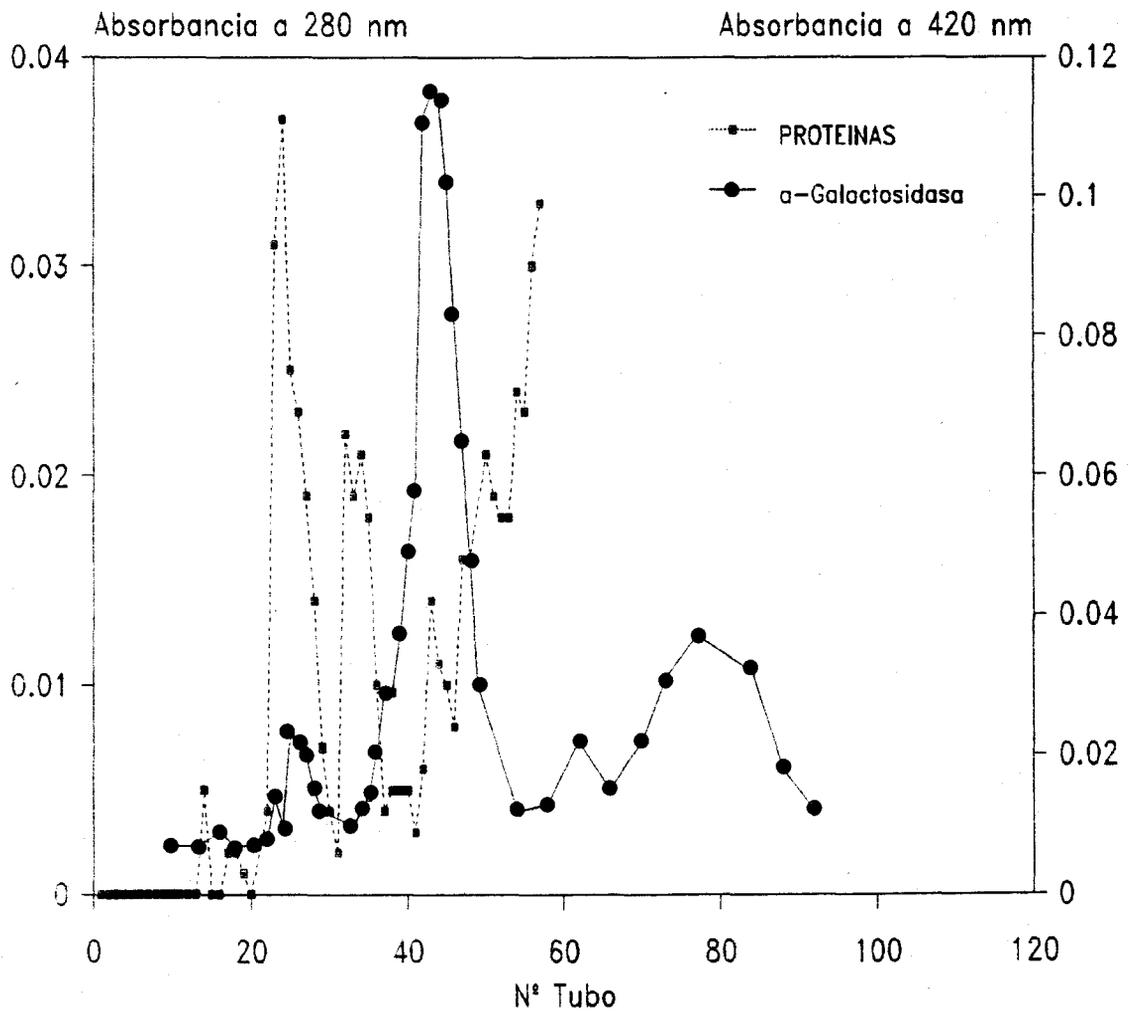


Figura 39.- Cromatografía de filtración en gel Sephadex G 100. Perfil de elución para α -Galactosidasa.

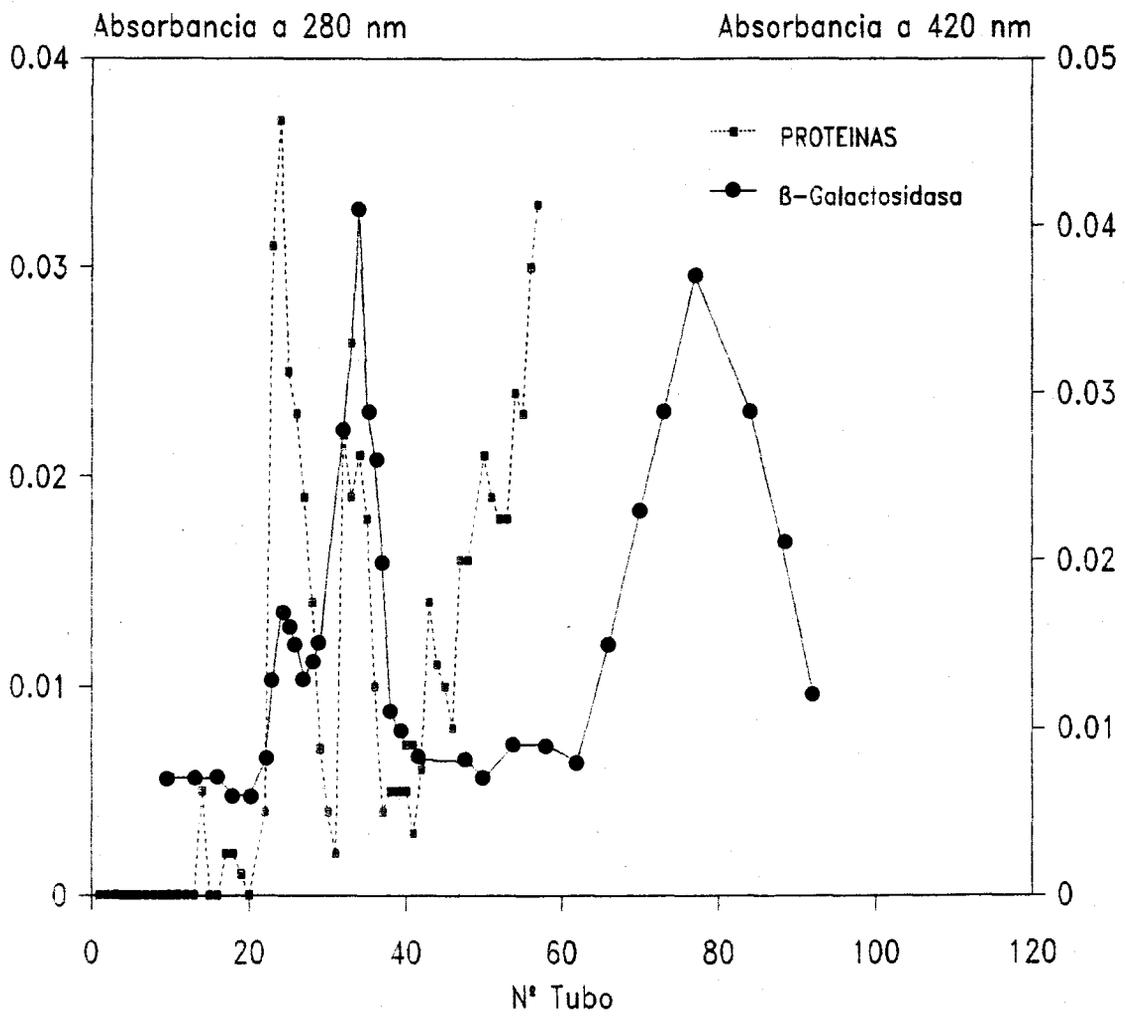


Figura 40.- Cromatografía de filtración en gel Sephadex G 100. Perfil de elución para B-Galactosidasa.

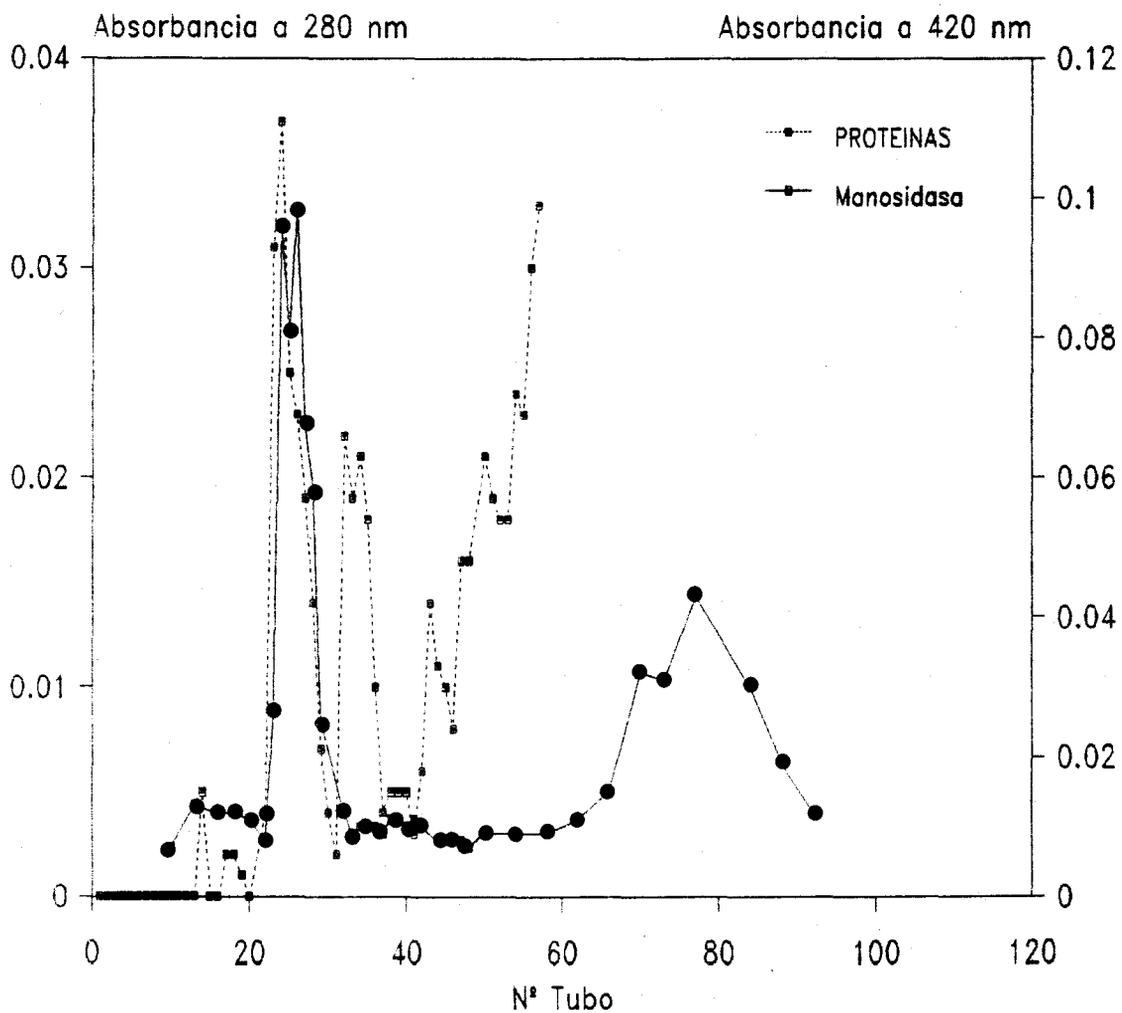


Figura 41.- Cromatografía de filtración en gel Sephadex G 100. Perfil de elución para α -Manosidasa.

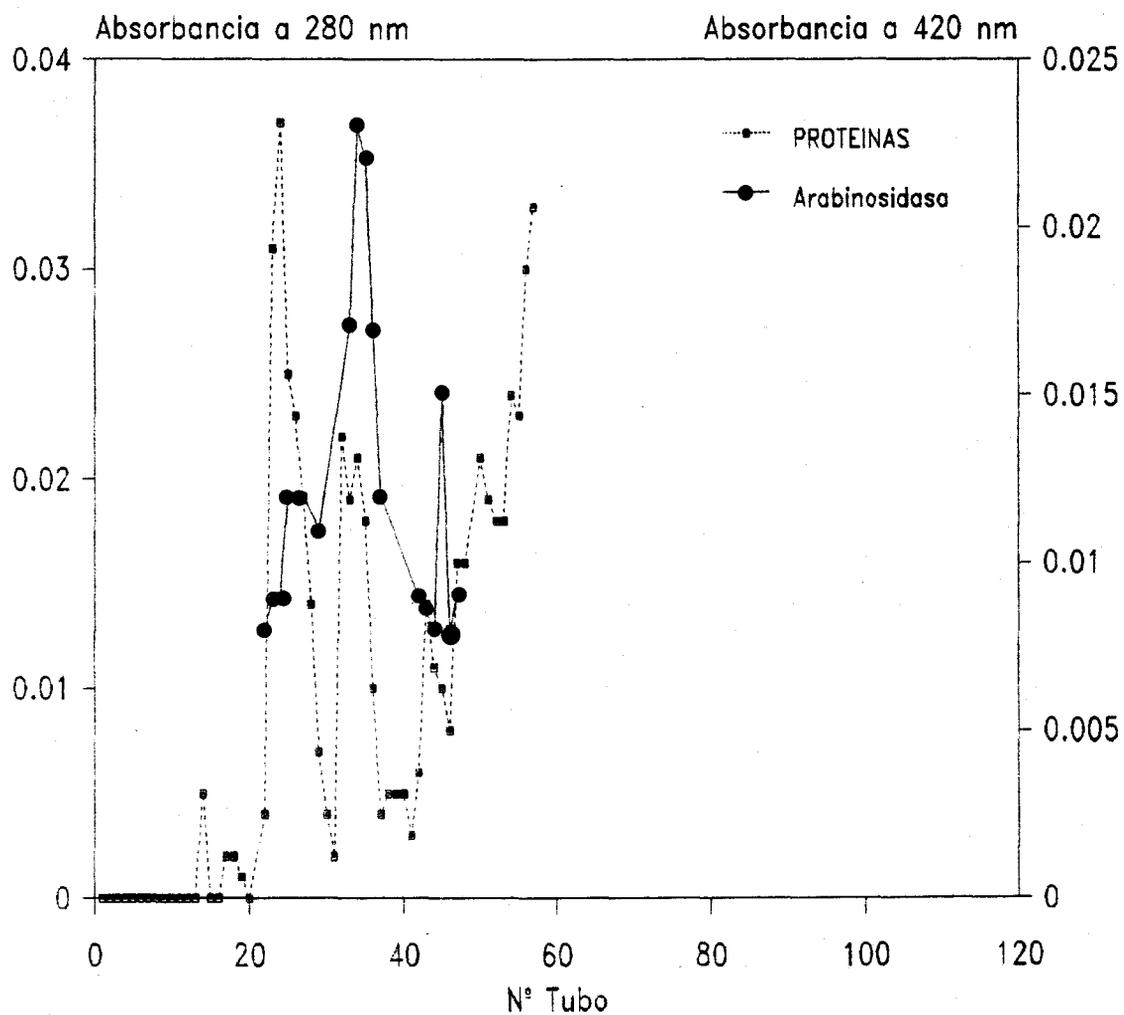


Figura 42.- Cromatografía de filtración en gel Sephadex G 100. Perfil de elución de α -Arabinosidasa.

4.3.-EVOLUCION DE LOS COMPONENTES DEL FRUTO DURANTE LA MADURACION

Aunque el objetivo fundamental del trabajo ha sido estudiar la evolución de los polisacáridos y de los enzimas implicados en su degradación y su relación con la textura, también se ha considerado conveniente realizar determinaciones de otros componentes y características del fruto tales como humedad, relación pulpa/hueso, proteínas, materia grasa y azúcares libres, puesto que al tratarse de un organismo vivo los componentes no evolucionan de un modo aislado sino que se establecen interrelaciones entre ellos, siendo así importante tener una visión lo más completa posible de los cambios que tienen lugar en el fruto durante su maduración.

Por otra parte, aunque existen estudios sobre los cambios de estos otros componentes de la aceituna durante su desarrollo (*Borbolla et al., 1955*) (*Fernandez Díez y González Pellissó, 1956*) estos se centran en otras variedades de aceitunas distintas a la hojiblanca, al ser esta de una relativamente reciente implantación en la industria de aderezo.

4.3.1.- Humedad.

En la figura 44 y en la tabla V se recogen los valores de humedad obtenidos en las diferentes campañas se observa que existe una disminución continua de la misma aunque con lógicas fluctuaciones

debidas fundamentalmente a las condiciones climatológicas de cada momento. No se encuentran diferencias apreciables entre las distintas campañas.

4.3.2.-Relación pulpa hueso.

En la figura 45 se puede observar que una vez que el hueso está totalmente diferenciado (finales de Julio, principios de agosto) la relación pulpa hueso aumenta rápidamente para estabilizarse hacia finales de Septiembre, pudiéndose considerar este como el momento en el que el fruto alcanza su máximo desarrollo y a partir del cual comienza a ennegrecer. Posteriormente (finales de Diciembre) se observa una tendencia a la disminución, probablemente debida a la pérdida de humedad de la pulpa.

4.3.3.- Materia grasa.

En las tres campañas estudiadas se ha encontrado un aumento casi lineal del contenido en materia grasa siendo este el componente que más aumenta cuantitativamente a lo largo de la maduración, pasando de valores muy inferiores al 10% en las primeras fases hasta valores superiores al 30% en las últimas fases (figura 46 y tabla VII).

4.3.4.- Proteínas.

El contenido proteico del fruto se mantiene en unos niveles

relativamente bajos en torno al 1% referido a pulpa, figura 47, encontrándose un brusco descenso al final de la maduración.

**TABLA V.- Humedad del fruto (g/100 g de pulpa original)
durante el desarrollo y maduración.**

<u>CAMPAÑA 1987-88</u>		<u>CAMPAÑA 1988-89</u>		<u>CAMPAÑA 1989-90</u>	
<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>
29-SEP	71.37±1.06	17-JUL	69.93±0.03	7-AGO	78.93±0.13
12-NOV	69.65±0.11	3-AGO	73.84±0.05	31-AGO	67.84±0.10
7-DIC	59.03±0.25	21-AGO	71.89±0.01	24-SEP	63.50±0.09
22-DIC	61.59±0.04	4-SEP	70.61±0.03	8-OCT	59.41±0.08
20-ENE	55.66±0.18	18-SEP	69.13±0.05	22-OCT	57.57±0.18
10-FEB	56.91±0.03	2-OCT	64.27±0.13	19-NOV	54.28±0.08
		24-OCT	65.32±1.16	3-DIC	55.76±0.06
		30-OCT	62.39±0.05	17-DIC	54.07±0.07
		13-NOV	61.66±0.15	28-DIC	52.47±.42
		27-NOV	58.91±0.04	7-ENE	47.61±0.47
		13-DIC	52.25±0.23	21-ENE	43.28±0.14
		25-DIC	48.15±0.07		
		9-ENE	46.37±0.11		
		29-ENE	46.59±0.73		

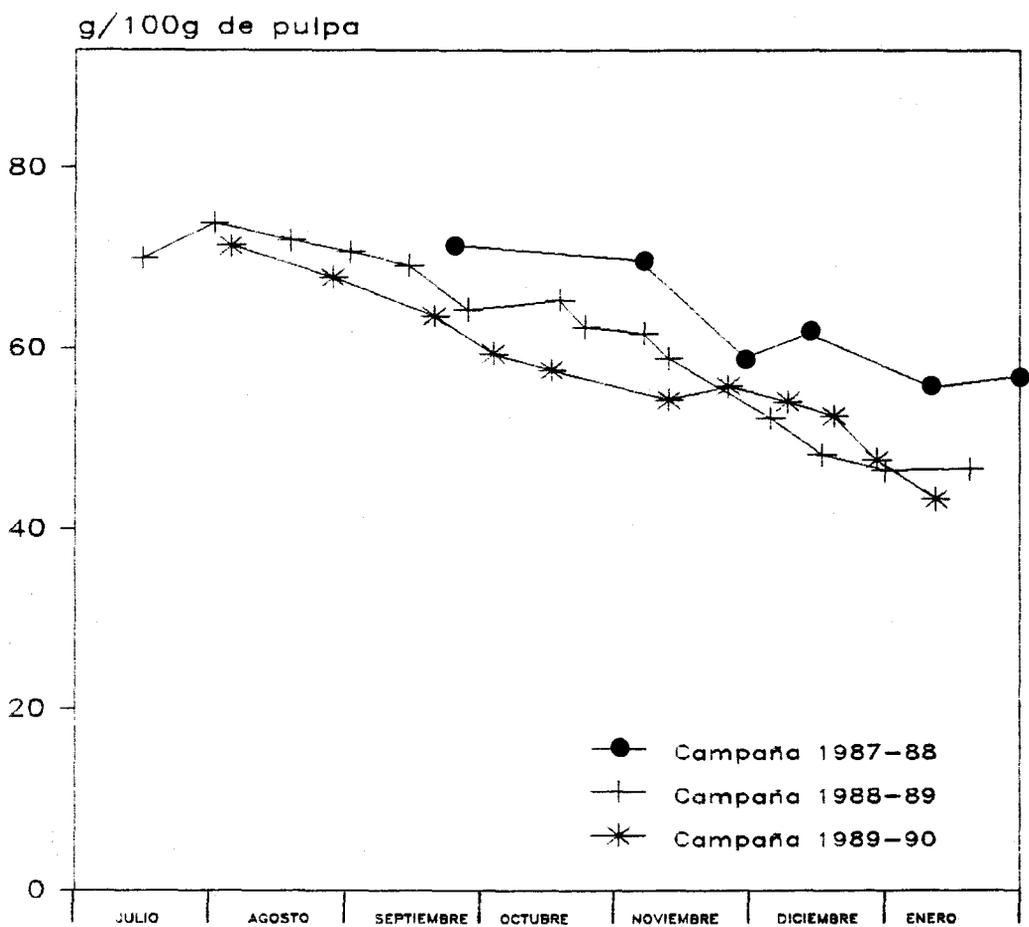


Figura 44.- Humedad del fruto durante el desarrollo y maduración.

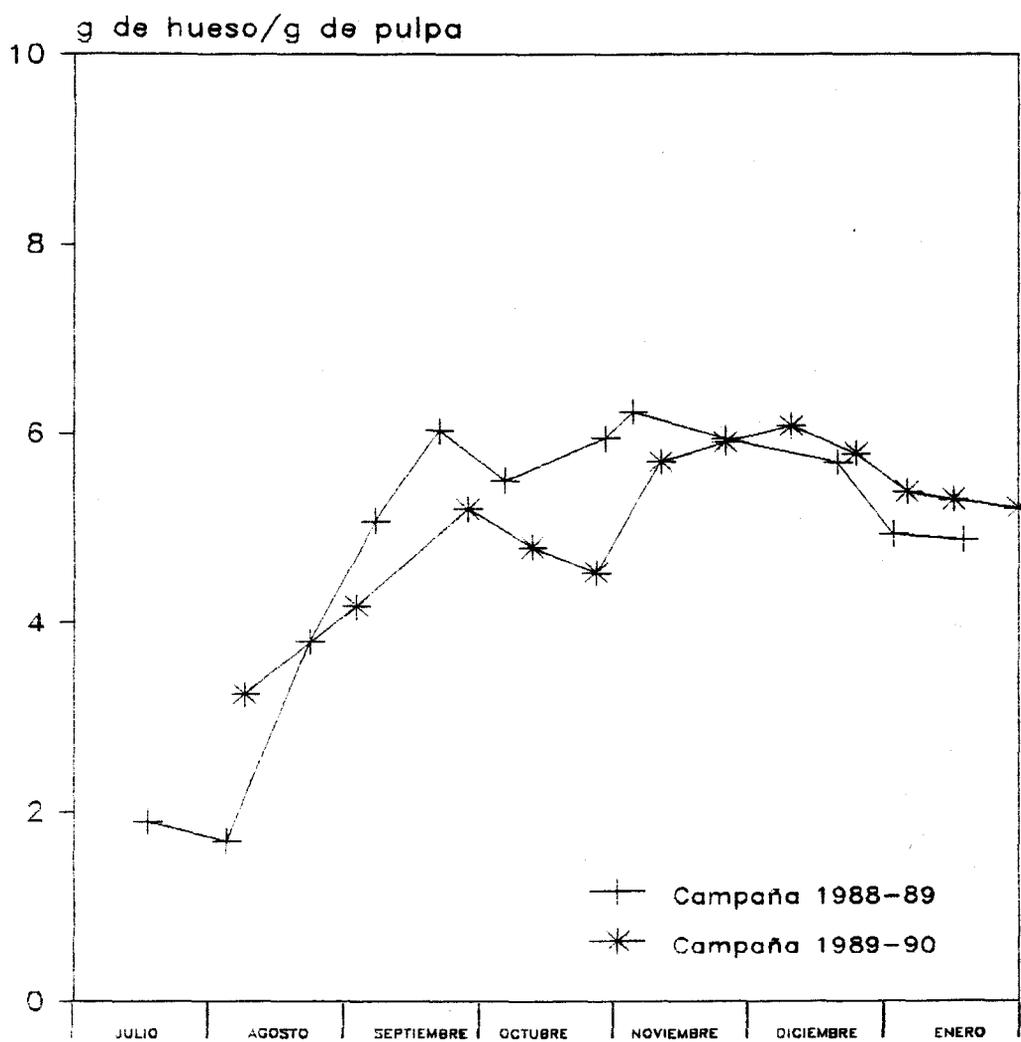


Figura 45.- Relación pulpa/hueso del fruto durante el desarrollo y maduración.

TABLA VII .- Materia grasa del fruto (g/100 g de pulpa) durante el desarrollo y maduración.

<u>CAMPAÑA 1987-88</u>		<u>CAMPAÑA 1988-89</u>		<u>CAMPAÑA 1989-90</u>	
<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>
29-SEP	10.41±0.60	17-JUL	0.33±	7-AGO	3.77±
12-NOV	15.55±0.11	3-AGO	2.63±	31-AGO	8.45±
7-DIC	18.65±0.22	21-AGO	5.79±	24-SEP	12.97±
22-DIC	17.29±0.09	18-SEP	10.88±	8-OCT	16.59±
20-ENE	20.77±0.60	2-OCT	12.90±	19-NOV	25.37±
10-FEB	24.04±0.03	24-OCT	18.26±	3-DIC	25.21±
		30-OCT	19.46±	17-DIC	26.98±
		13-NOV	20.94±	28-DIC	26.21±
		25-DIC	26.27±	7-ENE	27.47±
				21-ENE	32.72±

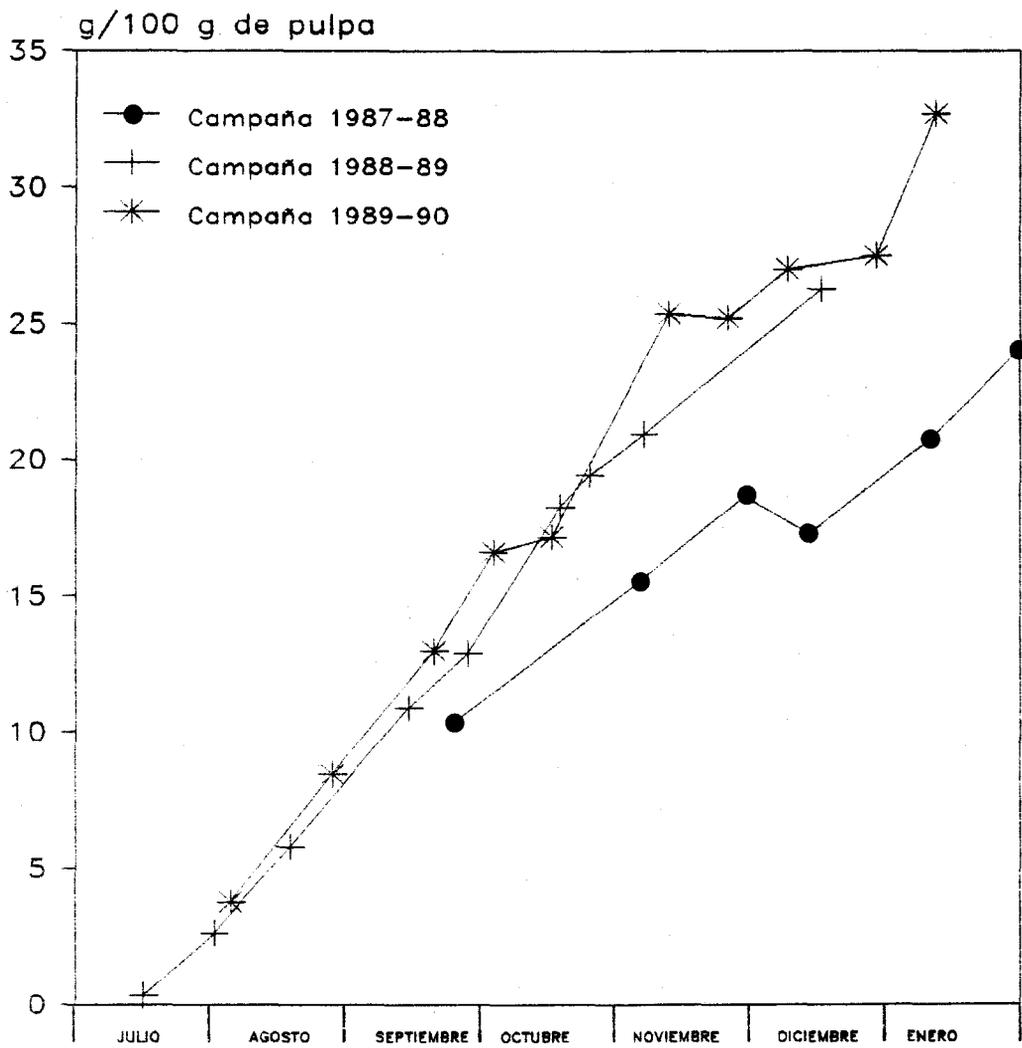


Figura 46.- Materia grasa del fruto durante el desarrollo y maduración.

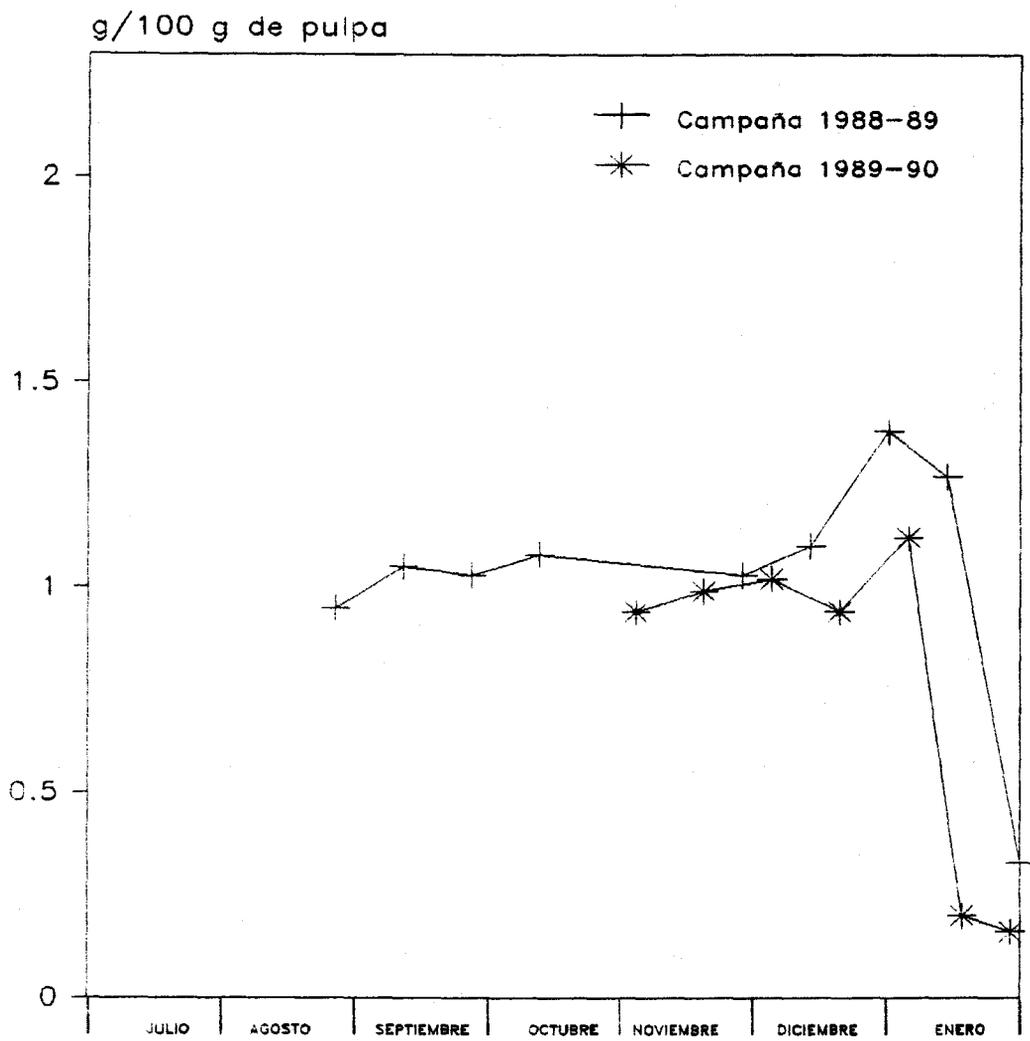


Figura 47.- Proteínas del fruto durante el desarrollo y maduración.

4.3.5.- Textura.

Se ha encontrado una disminución progresiva de la textura del fruto desde principios de Julio hasta la primera quincena de Noviembre, a partir de este momento tiende a estabilizarse e incluso a aumentar, aunque muy ligeramente, debido a la pérdida de humedad del fruto.

En el desarrollo general de frutos con hueso se pueden distinguir tres fases:

Una fase inicial de rápido crecimiento de pericarpio y semilla, que alcanzan su tamaño definitivo.

Una segunda fase caracterizada por una diferenciación del endocarpio, debido fundamentalmente a su lignificación.

Una tercera fase en la que se desarrolla el mesocarpio, al incrementarse el tamaño celular y los espacios intercelulares. Normalmente se considera que a partir de este momento termina el desarrollo y comienza la maduración del fruto (*Hulme, 1970*).

En el caso de la aceituna, se ha comenzado la toma de muestra cuando el hueso está totalmente diferenciado (final de la segunda fase). El fruto se encuentra en pleno desarrollo y la relación pulpa/hueso es muy baja (tabla VI). A partir de ahí se observa un aumento progresivo de la relación pulpa/hueso, pudiéndose considerar que el fruto se halla totalmente desarrollado en la 2ª quincena de Septiembre (final de la tercera fase), fecha a partir de la cual se

estabiliza la relación indicada.

Durante este proceso se aprecian tres etapas claramente diferenciadas en lo que respecta a la disminución de la textura (figura 48 y tabla VIII):

- 1a.- Desde principio de la toma de muestra hasta la 2a quincena de Septiembre.
- 2a.- Hasta mediados de Noviembre.
- 3a.- Hasta final de la maduración.

En la primera etapa el fruto pierde aproximadamente un 30% de su textura, durante la segunda un 70% y en la última la textura permanece constante e incluso tiende a aumentar como se ha indicado anteriormente.

La disminución de textura durante la primera etapa se puede explicar en base a que, debido a la elongación celular, la pared se hace elástica debiéndose romper puentes de hidrógeno entre las fibrillas de celulosa, para permitir el crecimiento de la célula en tamaño.

La segunda etapa, disminución más acentuada de textura como se ha indicado anteriormente, es coincidente con la aparición de glicosidasas, inicialmente manosidasa y arabinosidasa, seguidas de α y β -galactosidasas. Por tanto, se considera que estos enzimas son los responsables principales de la pérdida de textura en esta fase puesto que no se detecta actividad de celulasa ni poligalacturonasa hasta un estado más avanzado de la maduración (tablas II y III).

TABLA VIII.- Textura del fruto (Kg/cm² 100 g de pulpa) durante el desarrollo y maduración.

<u>CAMPAÑA 1987-88</u>		<u>CAMPAÑA 1988-89</u>		<u>CAMPAÑA 1989-90</u>	
<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>	<u>FECHA</u>	<u>X±SD</u>
29-SEP	33.40±2.68	3-AGO	55.26±9.87	23-JUL	78.93±8.91
12-NOV	27.92±2.52	21-AGO	45.43±6.15	7-AGO	66.63±9.14
7-DIC	12.04±1.41	4-SEP	42.82±6.01	31-AGO	53.39±9.92
22-DIC	13.58±2.27	18-SEP	39.47±4.04	24-SEP	45.46±3.54
10-FEB	14.02±2.65	2-OCT	35.76±2.19	8-OCT	40.14±7.32
		24-OCT	24.90±3.35	22-OCT	30.78±3.82
		30-OCT	22.02±4.43	5-NOV	17.87±3.35
		13-NOV	13.99±1.70	19-NOV	16.11±1.65
		27-NOV	12.60±1.12	3-DIC	19.95±2.20
		13-DIC	14.08±1.50	17-DIC	12.27±1.03
		25-DIC	14.76±1.35	7-ENE	17.02±3.39
		9-ENE	14.01±1.31	21-ENE	12.95±1.82
		19-ENE	15.52±1.93		

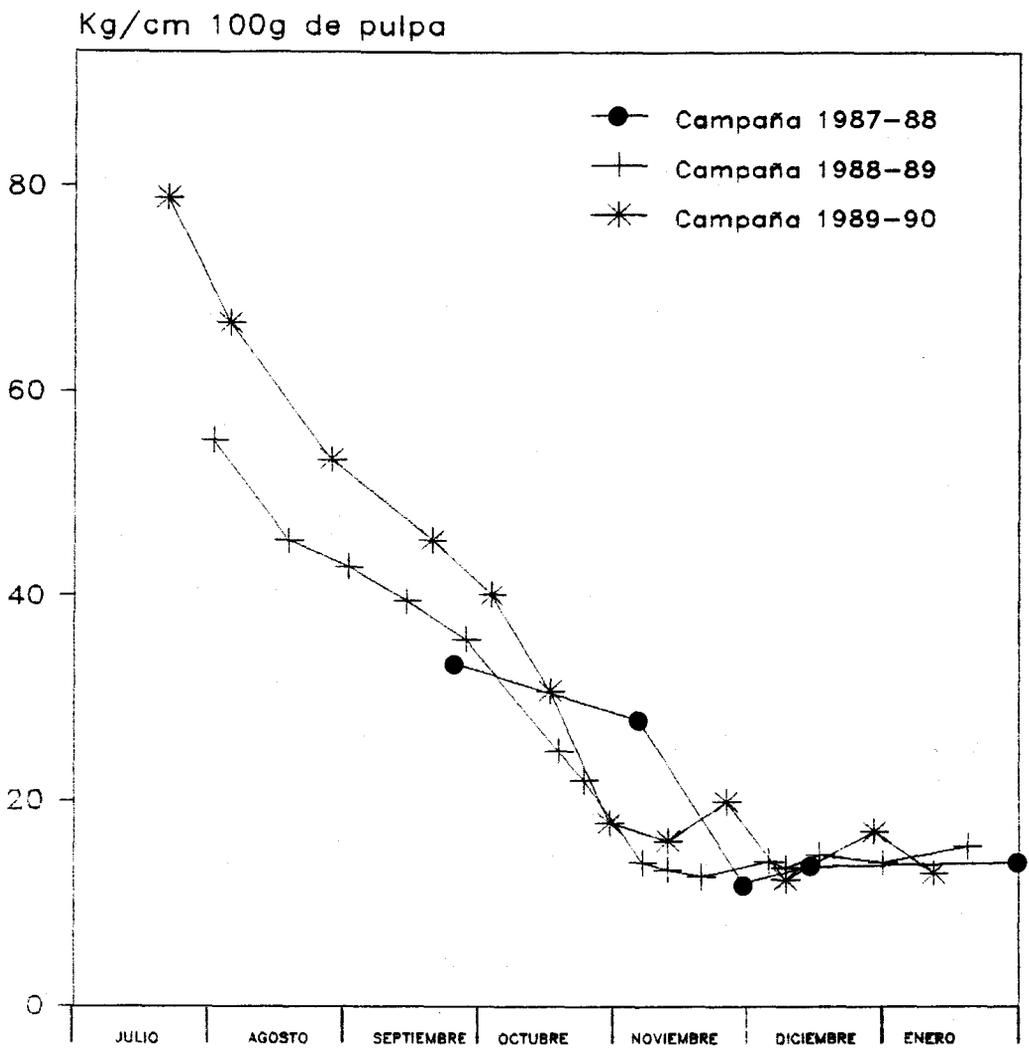


Figura 48.- Textura del fruto durante el desarrollo y la maduración.

4.3.6.- Azúcares neutros de pared.

En la tabla IX y figuras 52 a 57 se recogen los datos de evolución de azúcares de pared a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. Se puede observar que salvo en el caso de la glucosa y de la ramnosa el resto de azúcares componentes de la pared celular disminuyen apreciablemente.

La glucosa sigue un comportamiento algo irregular aunque con una cierta tendencia a la disminución. Durante la campaña 1988-89 disminuye en un 24% mientras que en la 89-90 prácticamente no disminuye y presenta algunas fluctuaciones.

La ramnosa es el único azúcar que aumenta, encontrándose niveles muy superiores al final de la maduración.

Manosa y xilosa disminuyen en aproximadamente un 40% (39 y 45% para manosa y 41 y 32% para xilosa). Durante la primera etapa de desarrollo la disminución es muy pequeña, en el caso de la xilosa se pierde un 4,5% en la primera campaña y un 6% en la segunda, mientras que la manosa aumenta ligeramente en la primera y disminuye un 20% en la segunda.

Los azúcares que mayor disminución experimentan son la galactosa, con valores de 63 y 60%, y la arabinosa, valores de 61 y 53%. De nuevo, salvo para el caso de la galactosa en la campaña 1989-

90, la mayor parte de la disminución tiene lugar durante la fase de maduración, momento este en el que como se ha visto anteriormente se dan las pérdidas más importantes de textura y aparecen las actividades de glicosidasas.

TABLA IX.-Azúcares neutros de pared (g/100g de residuo insoluble en alcohol) durante la maduración.

CAMPAÑA 1988-89						
FECHA	GLUCOSA	GALACTOSA	MANOSA	XILOSA	ARABINOSA	RAMNOSA
21AGO	16.29±0.09	2.62±0.01	1.25±0.10	5.17±0.32	6.87±0.28	0.40±0.05
18SEP	16.77±1.20	2.17±0.12	1.40±0.09	4.94±0.35	7.70±0.61	0.62±0.03
24OCT	10.51±1.12	1.38±0.13	0.69±0.05	4.42±1.63	5.22±0.50	0.34±0.03
27NOV	14.90±0.06	1.47±0.04	0.88±0.03	4.27±0.03	4.67±0.12	0.80±0.06
26DIC	10.58±0.09	0.98±0.05	0.61±0.06	3.20±0.05	4.05±0.27	0.89±0.06
9ENE	12.41±0.49	0.98±0.24	0.89±0.14	3.06±0.06	2.70±0.09	2.00±0.03
CAMPAÑA 1989-90						
7AGO	15.72±1.20	3.45±0.18	1.40±0.03	4.78±0.24	7.71±0.83	0.37±0.11
24SEP	15.00±0.72	2.06±0.18	1.12±0.12	4.48±0.36	6.86±1.06	0.45±0.03
22OCT	22.73±2.05	1.65±0.44	0.90±0.16	3.60±0.35	5.71±0.20	0.26±0.03
19NOV	13.24±0.77	1.61±0.12	0.97±0.14	3.72±0.20	4.91±0.07	1.05±0.03
17DIC	13.46±2.67	1.37±0.35	0.77±0.24	4.13±0.31	5.02±0.08	1.08±0.08
21ENE	15.14±0.55	1.38±0.07	1.21±0.04	3.26±0.23	3.66±0.15	2.00±0.45

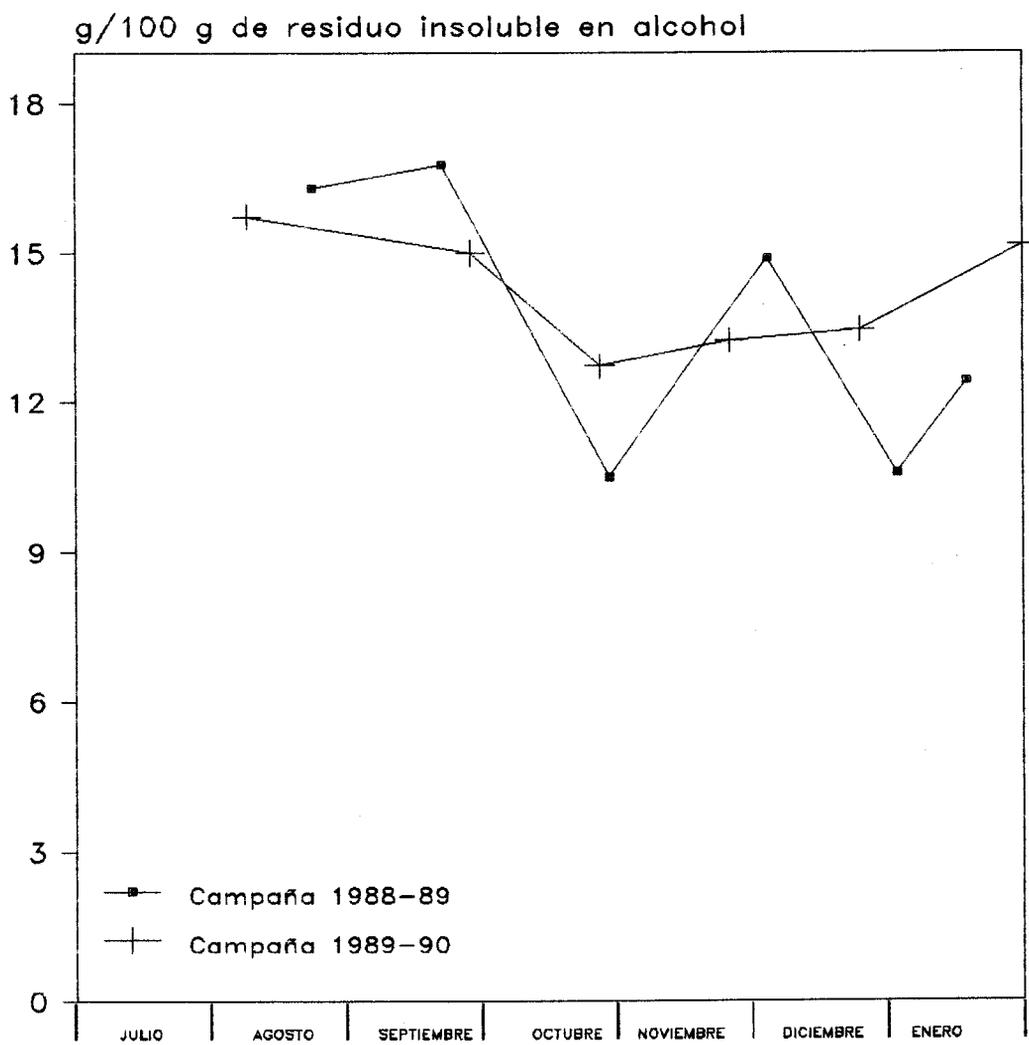


Figura 52.- Glucosa de pared durante el desarrollo y maduración del fruto.

g/100 g de residuo insoluble en alcohol

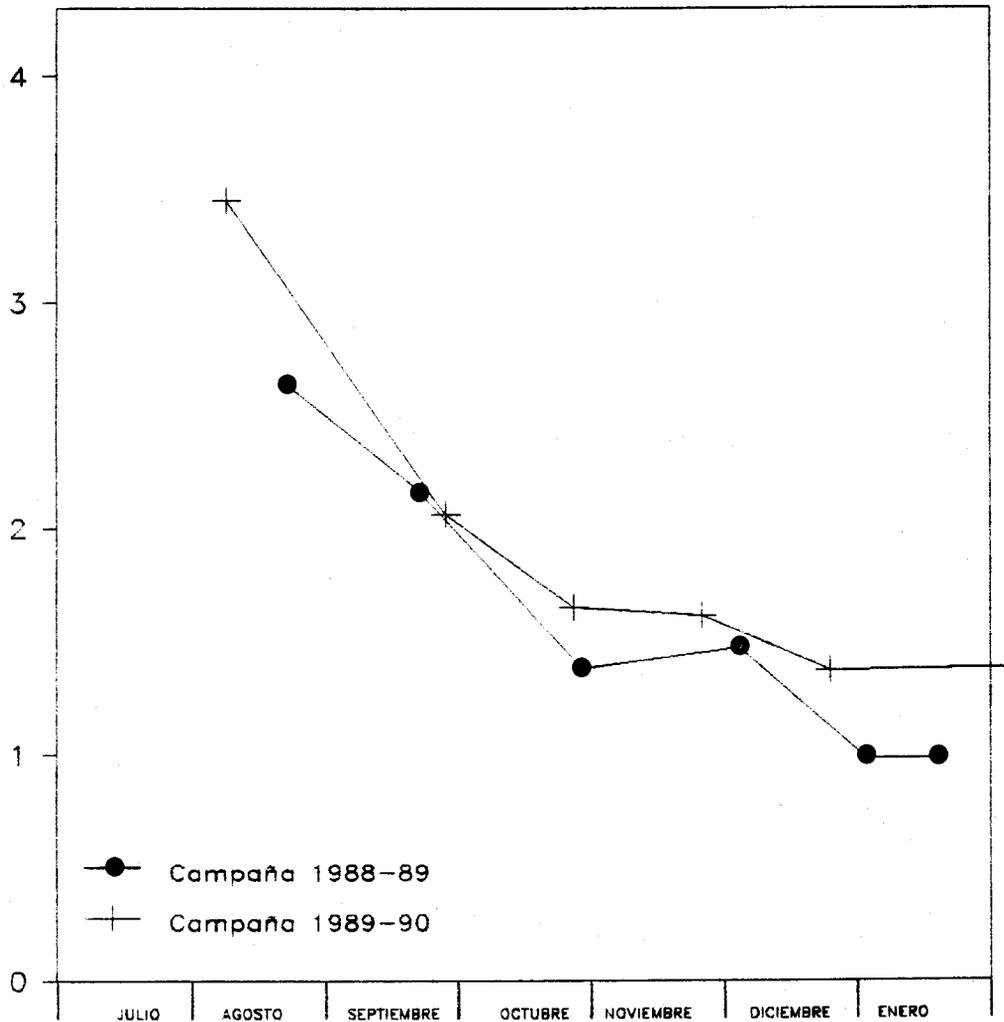


Figura 53.- Galactosa de pared durante el desarrollo y la maduración del fruto.

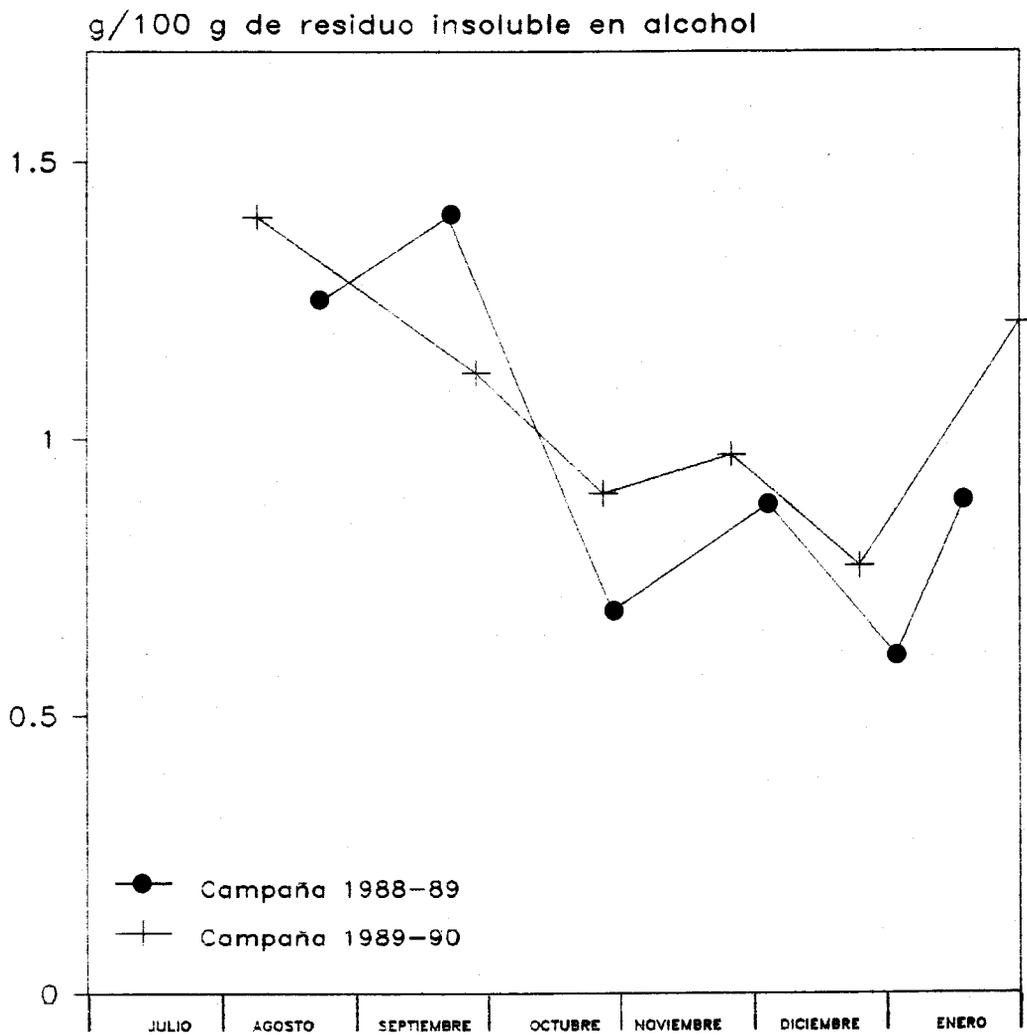


Figura 54.- Manosa de pared durante el desarrollo y la maduración del fruto.

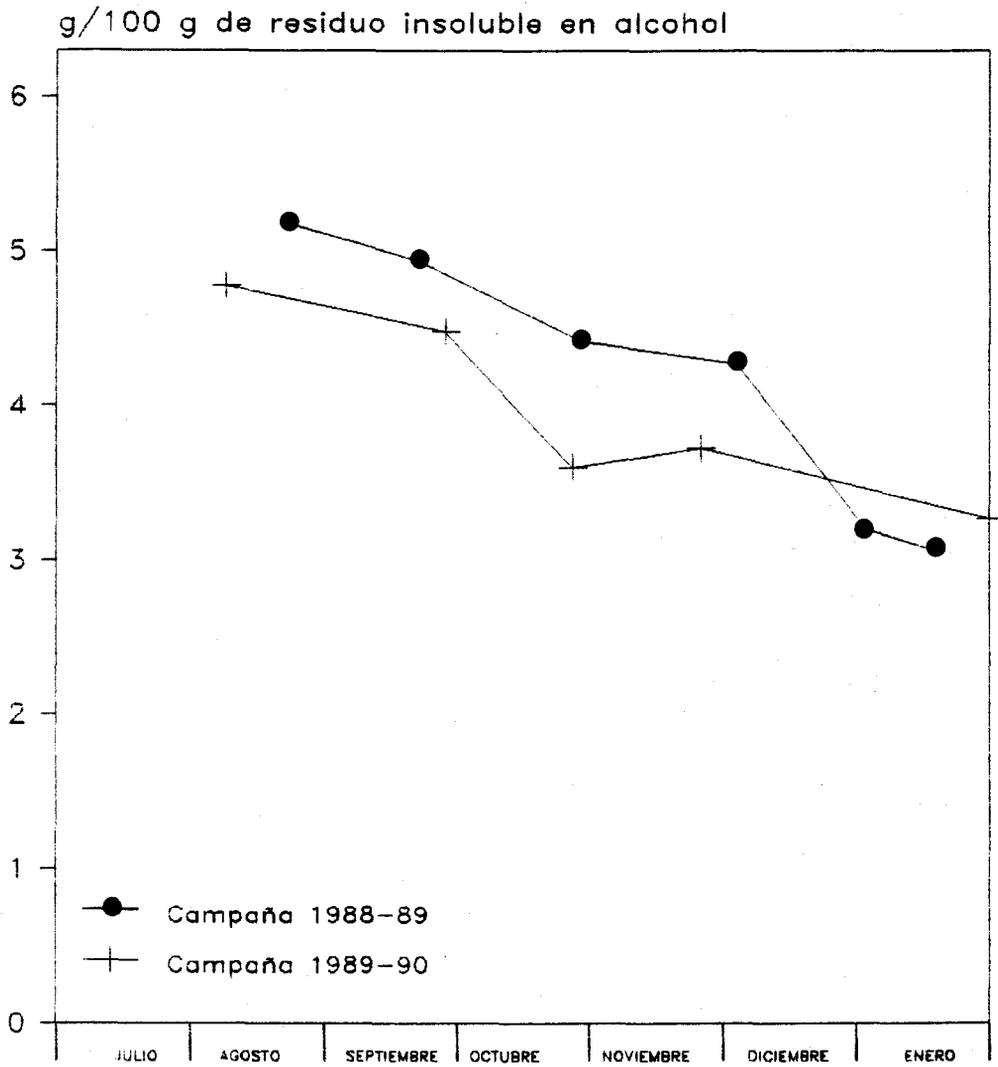


Figura 55.- Xilosa de pared durante el desarrollo y la maduración del fruto.

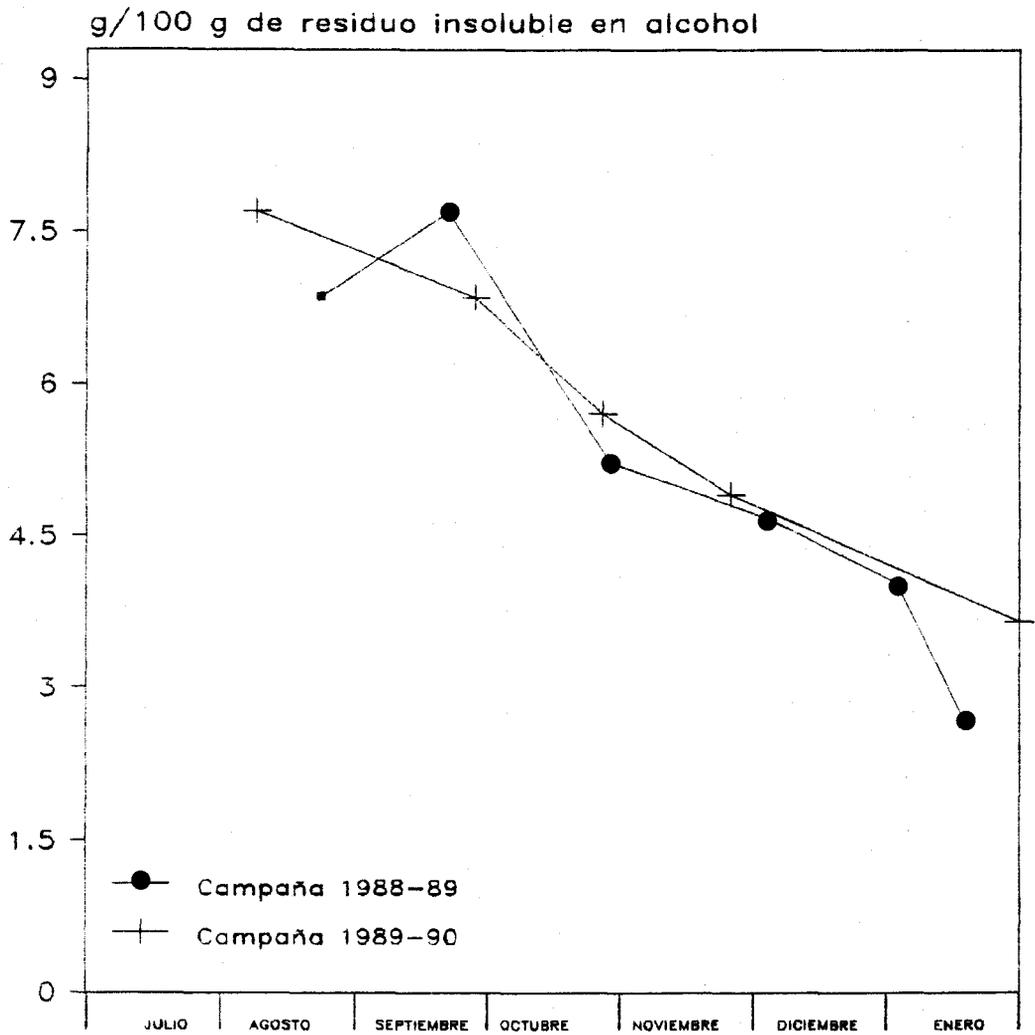


Figura 56.- Arabinosa de pared durante el desarrollo y la maduración del fruto.

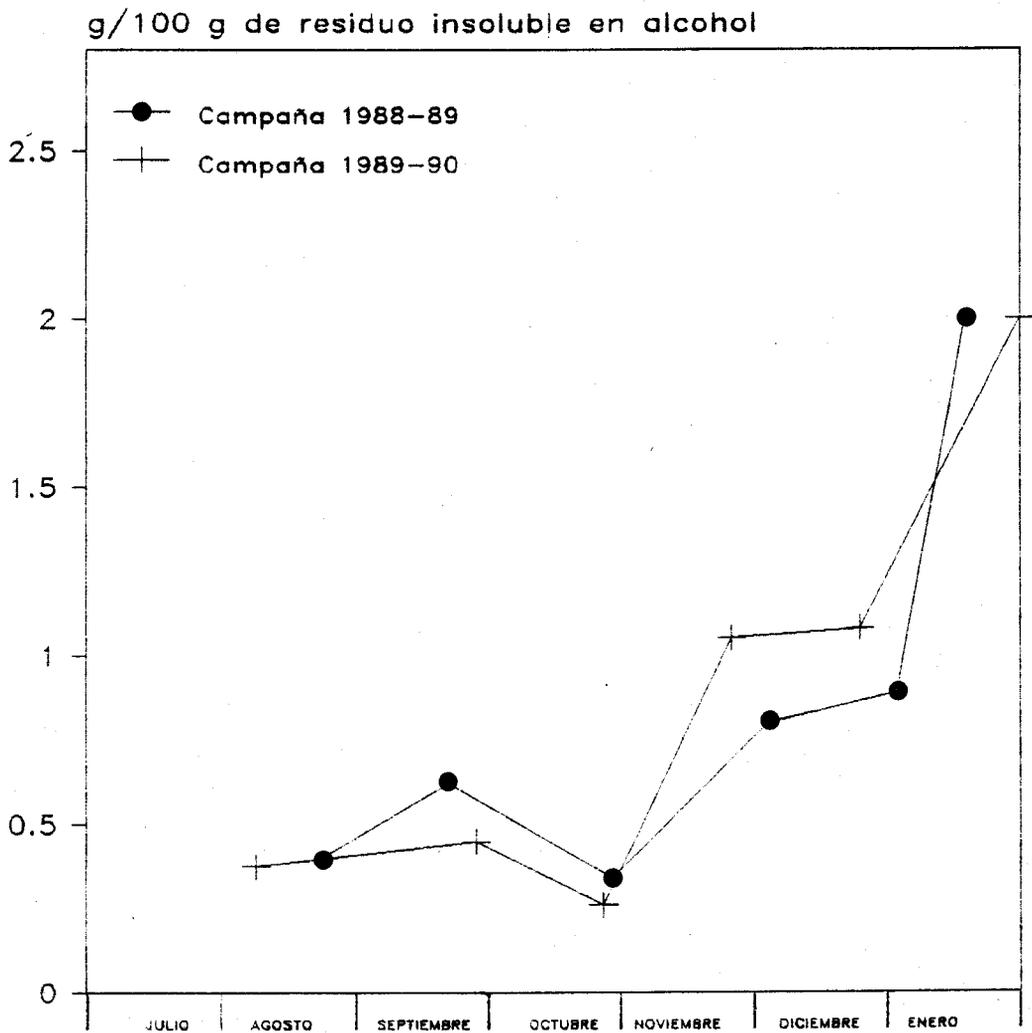


Figura 57.- Ramnosa de pared durante el desarrollo y maduración del fruto.

4.4.- PARED CELULAR.

Una vez establecida, tal y como se deduce de los apartados anteriores, la relación existente entre la pérdida de azúcares de pared y la textura e identificados los enzimas presuntos responsables de dichos cambios, en este apartado se expone el trabajo realizado con el fin de estudiar más a fondo las transformaciones que sufren los polisacáridos de la pared celular durante todo este proceso. Para ello se ha aislado la pared celular del fruto, tanto en su estado de verde como completamente maduro, fraccionando posteriormente estos polisacáridos y determinando la distribución de pesos moleculares de cada fracción.

4.4.1.- Fracciones de pared.

En la tabla X se recogen los porcentajes, referidos a pulpa, de cada una de las fracciones obtenidas para el fruto verde y maduro. En ella se observa que mientras el material de pared representa alrededor de un 7,5% de la pulpa en la aceituna madura, desciende hasta un 4,70%, es decir, se da una disminución global de casi un 3% referido a pulpa y de un 38% referido a material de pared.

En cuanto a fracciones, el material soluble en agua caliente sufre una importante reducción de aproximadamente un 56%, sin embargo en el total del material de pared su significación es pequeña, puesto que sólo representa un 0,58% de disminución.

La fracción de lignina, considerada como la pérdida de peso del material de pared al ser sometido al tratamiento con clorito sódico, permanece prácticamente constante, mientras que la de polisacáridos solubles en oxalato disminuye muy ligeramente contribuyendo, aproximadamente con un 0,2%, a la pérdida de material de pared.

La fracción que más disminuye, con gran diferencia respecto a las demás, es la de holocelulosa representando un 2% de disminución respecto al material de pared. Analizando los componentes de esta fracción se observa que, mientras la celulosa permanece prácticamente constante y sólo en posteriores estados de sobremaduración se detecta un descenso apreciable (*Heredia et al*), tanto la fracción de hemicelulosas A como la B sufren importantes descensos, 74 y 74,5% respectivamente siendo, sin lugar a dudas, los componentes más afectados durante la maduración del fruto.

TABLA X.- Fracciones de pared (g/100 g de pulpa) para el fruto verde y maduro

	<u>FRUTO VERDE</u>	<u>FRUTO MADURO</u>	<u>DISMINUCION</u>
Material de pared	7.50	4.70	2.80
F. s. agua caliente	1.04	0.46	0.58
F. soluble oxalato	1.31	1.13	0.18
Holocelulosa	3.90	1.86	2.04
Lignina	1.19	1.20	
<u>FRACCION DE HOLOCELULOSA</u>			
Hemicelulosa A	1.78	0.46	1.32
Hemicelulosa B	1.02	0.26	0.76
Celulosa	1.10	1.13	

4.4.2.- Distribución de pesos moleculares de las distintas fracciones.

En las figuras 58 a 67 se recogen los perfiles de elución de las distintas fracciones en estudio y en la figura la recta de calibrado para dextranos patrones.

En las fracciones solubles en agua fría y en oxalato no se aprecian diferencias importantes para los dos estados de madurez del fruto, encontrándose en la primera dos picos de polisacáridos de pesos moleculares 160000 y 6000 respectivamente (figuras 58 y 59), mientras que en la segunda se encuentra un único pico de peso molecular 180000 (figuras 60 y 61).

Para los polisacáridos solubles en agua caliente, se observan perfiles de elución muy diferentes, encontrándose que mientras en el fruto verde los polisacáridos de alto peso molecular son mayoritarios en el maduro tiene lugar un desplazamiento hacia pesos moleculares menores, indicando por tanto que ha habido una degradación neta de los polisacáridos originales durante la maduración (figuras 62 y 63).

Como en el apartado anterior se ha encontrado que también en la distribución de pesos moleculares los cambios más pronunciados tienen lugar en la fracción de hemicelulosas.

En el perfil de elución de la hemicelulosa B de aceituna

verde, se encuentra un único pico de peso molecular 150000, sin embargo en el del fruto maduro se detectan además tres picos de pesos moleculares decrecientes, 60000, 20000 y 15000 (Figuras 64 y 65).

En la hemicelulosa A de la aceituna verde se encuentra un pico mayoritario de peso molecular 180000, así como una serie de picos minoritarios de pesos moleculares inferiores. En la correspondiente a la madura se observa un incremento notable de la proporción de picos de bajo peso molecular (Figuras 66 y 67).

Como resumen se puede concluir que durante la etapa de maduración de la aceituna, los cambios más importantes que tienen lugar en su pared celular, ocurren fundamentalmente sobre la fracción de hemicelulosas.

Probablemente la degradación de la fracción de hemicelulosas ocurra en dos fases consecutivas, en una primera las cadenas de hemicelulosas se pueden romper a cadenas más cortas de menor peso molecular, las cuales serían posteriormente degradadas a monómeros u oligosacáridos de muy bajo peso molecular. En esta degradación deben estar implicados los enzimas glicosidasas, en una o en ambas fases.

4.2.7. Azúcares libre.

Los azúcares libres detectados son , glucosa, sacarosa, fructosa y manitol. Los mayoritarios son glucosa y manitol, encontrándose la fructosa en una proporción muy inferior.

Salvo la fructosa, que parece tener una clara tendencia a aumentar con la maduración, el resto permanece practicamente constante aunque los valores fluctuan de una muestra a otra.

TABLA XI.- Azúcares libres (g/100 g de pulpa) durante el desarrollo y la maduración del fruto.

FECHA	SACAROSA	GLUCOSA	FRUCTOSA	MANITOL
21AGO	1,03±0,02	1,76±0,02	0,19±0,50	1,94±0,50
20OCT	1,37±9,12	2,26±0,30	0,28±0,04	2,44±0,48
27NOV	1,31±0,12	1,70±0,20	0,57±0,07	1,27±0,10
13DIC	1,39±0,10	2,19±0,30	0,86±0,02	1,54±0,05
25DIC	1,04±0,40	2,10±0,30	0,77±0,01	2,03±0,10

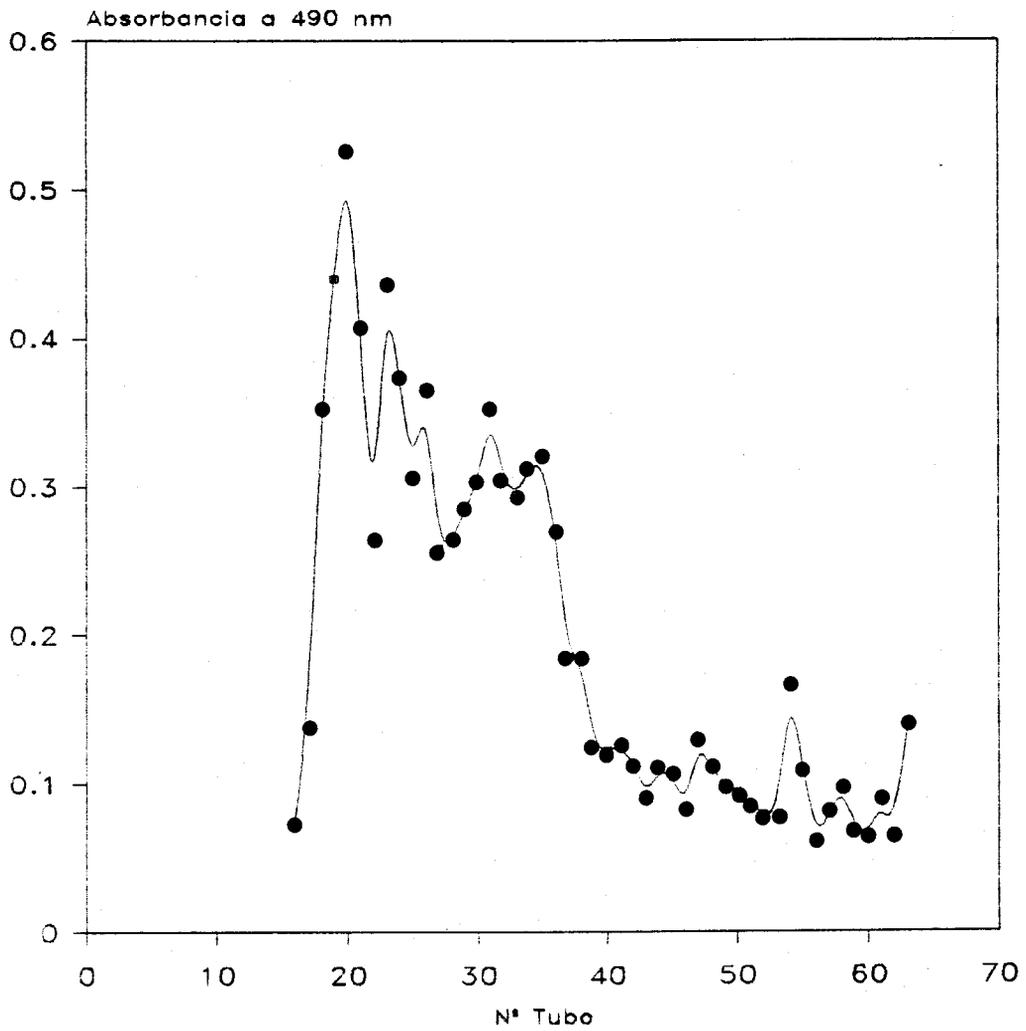


Figura 60.- Perfil de elución de los polisacáridos solubles en agua caliente del fruto verde.

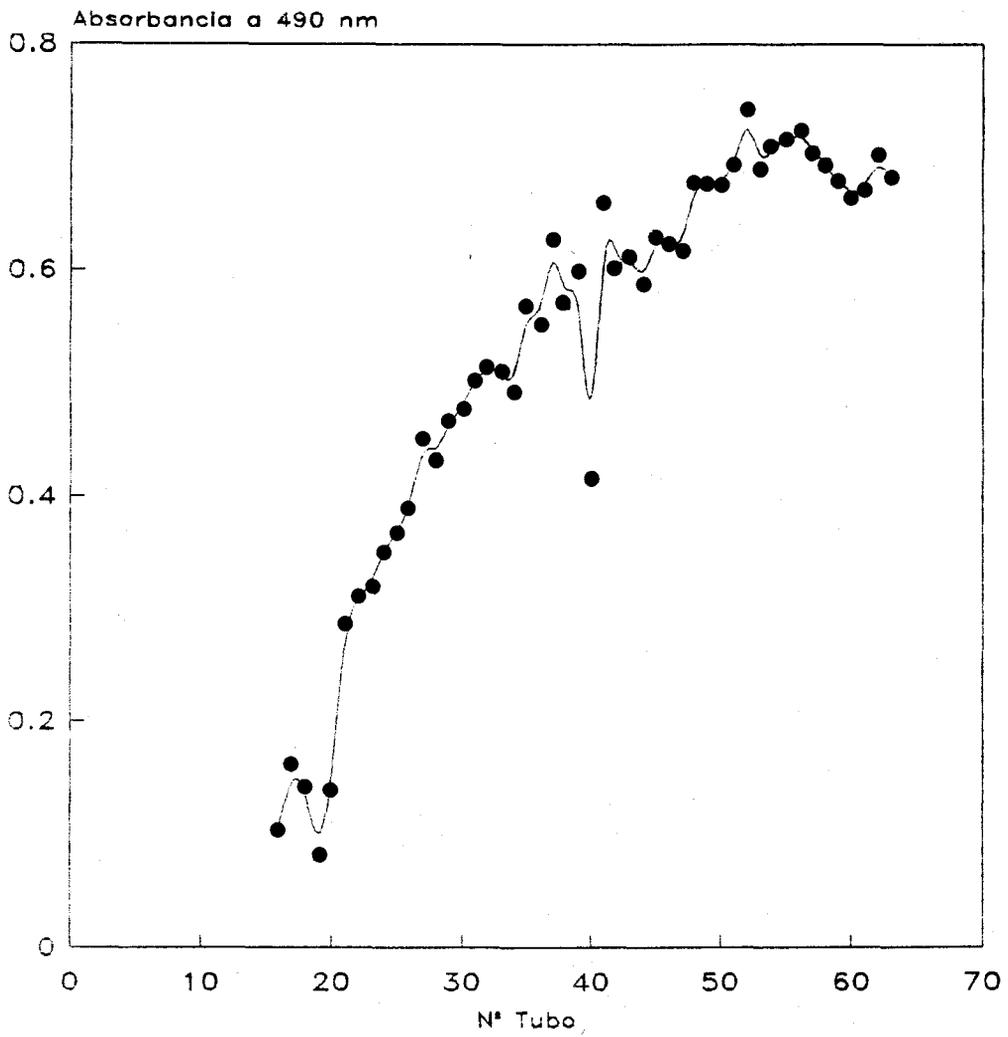


Figura 61.- Perfil de elución de los polisacáridos solubles en agua caliente del fruto maduro.

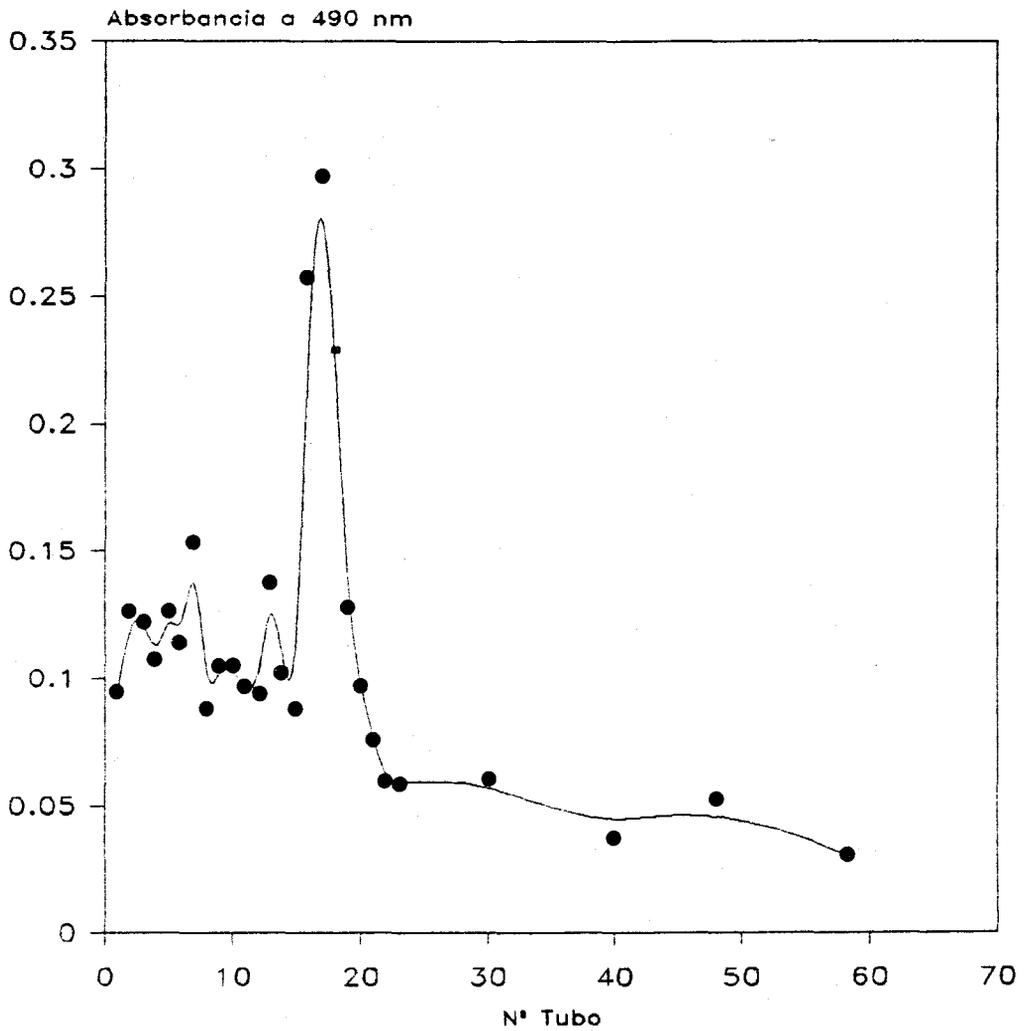


Figura 62.- Perfil de elución de los polisacáridos solubles en oxalato amónico del fruto verde.

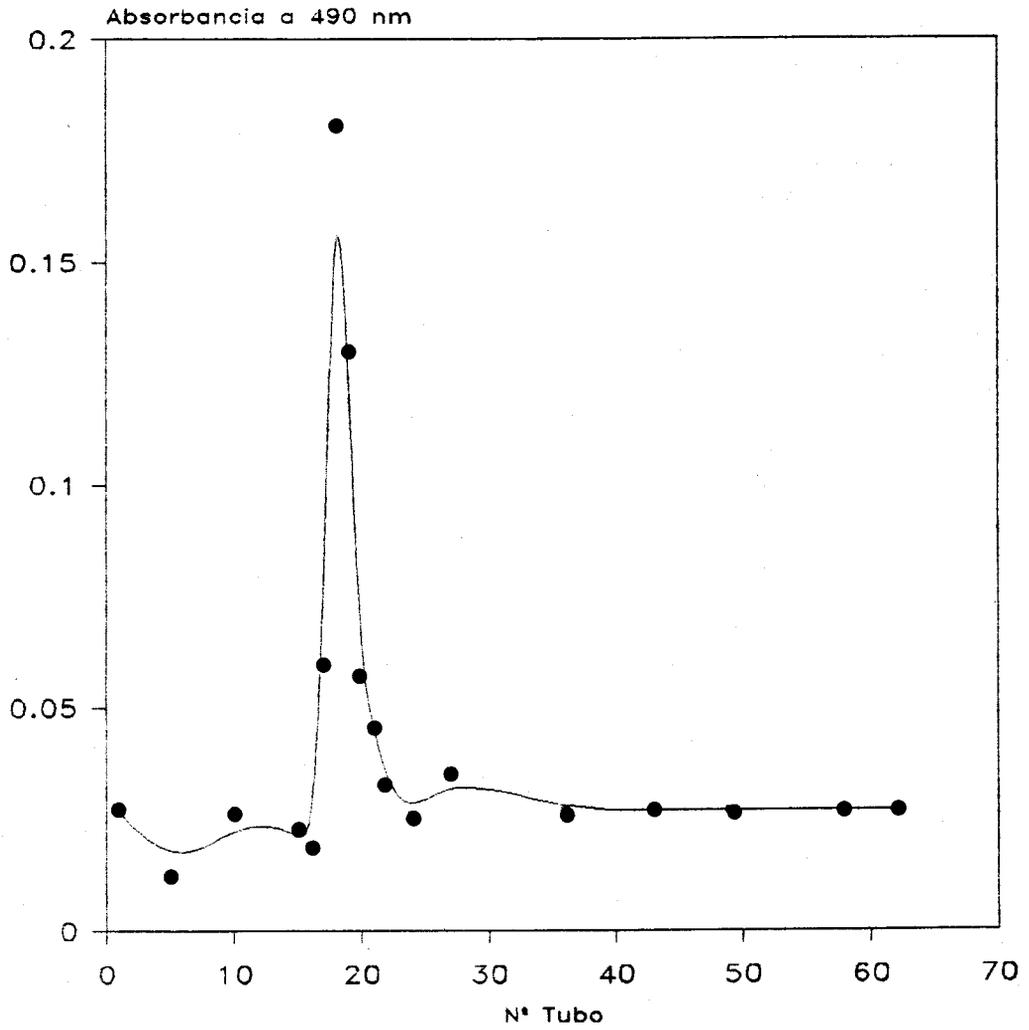


Figura 63.- Perfil de elución de los polisacáridos solubles en oxalato amónico del fruto maduro.

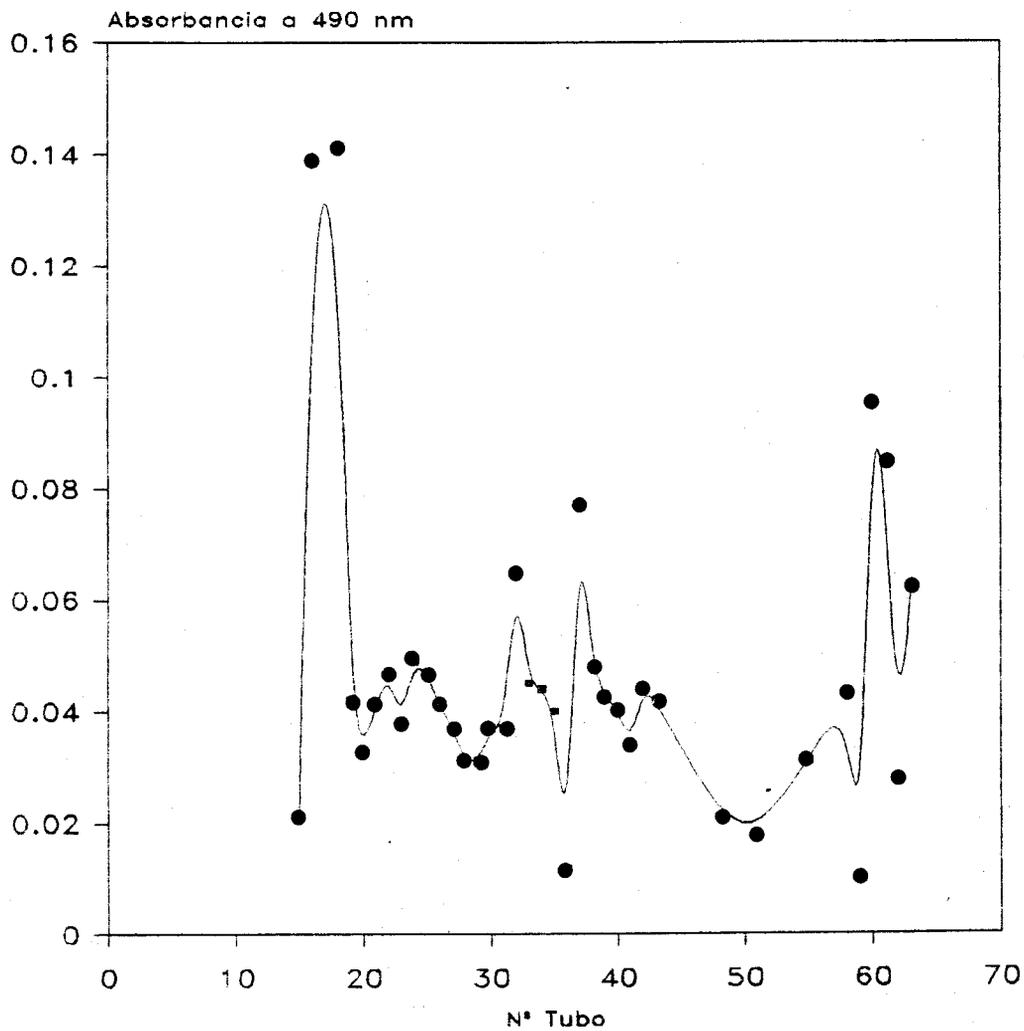


Figura 64.- Perfil de elución de la fracción de hemicelulosa A del fruto verde.

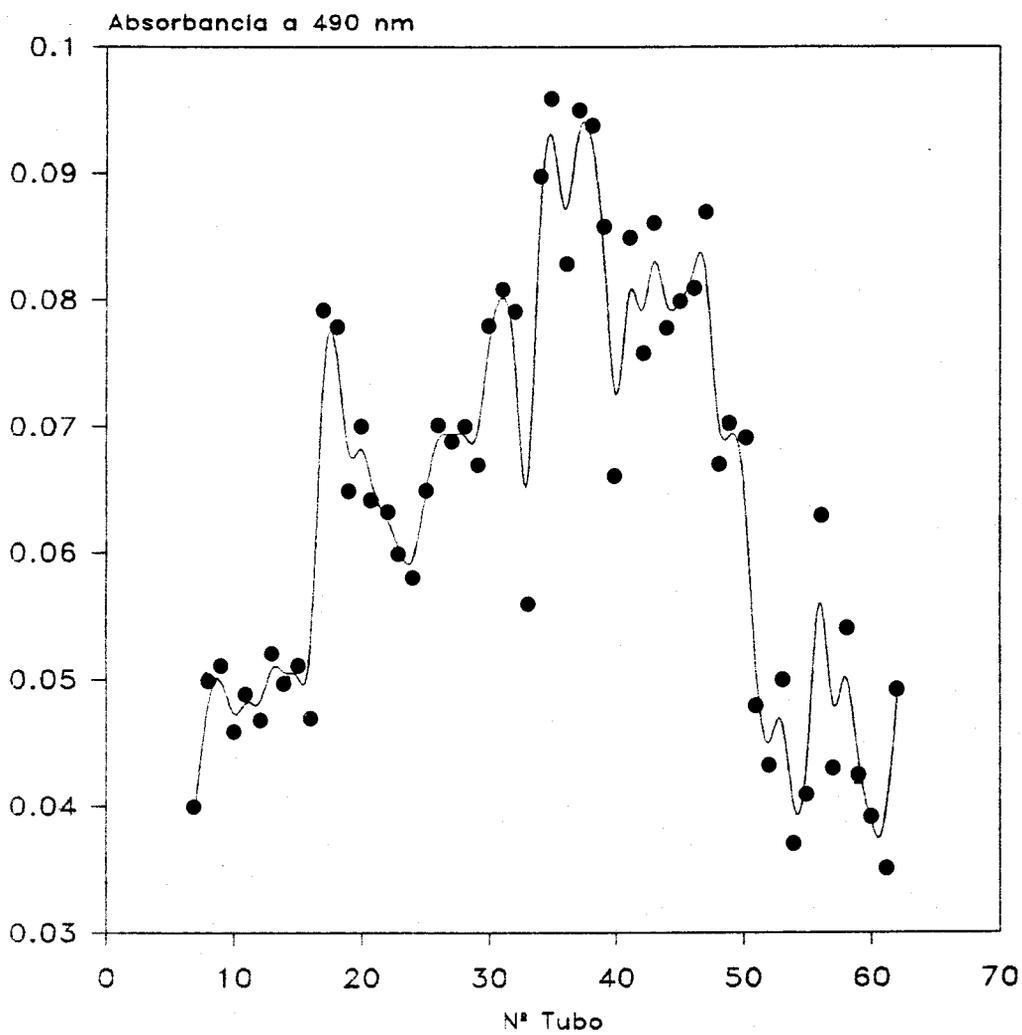


Figura 65.- Perfil de elución de la fracción de hemi-cellulosa A del fruto maduro.

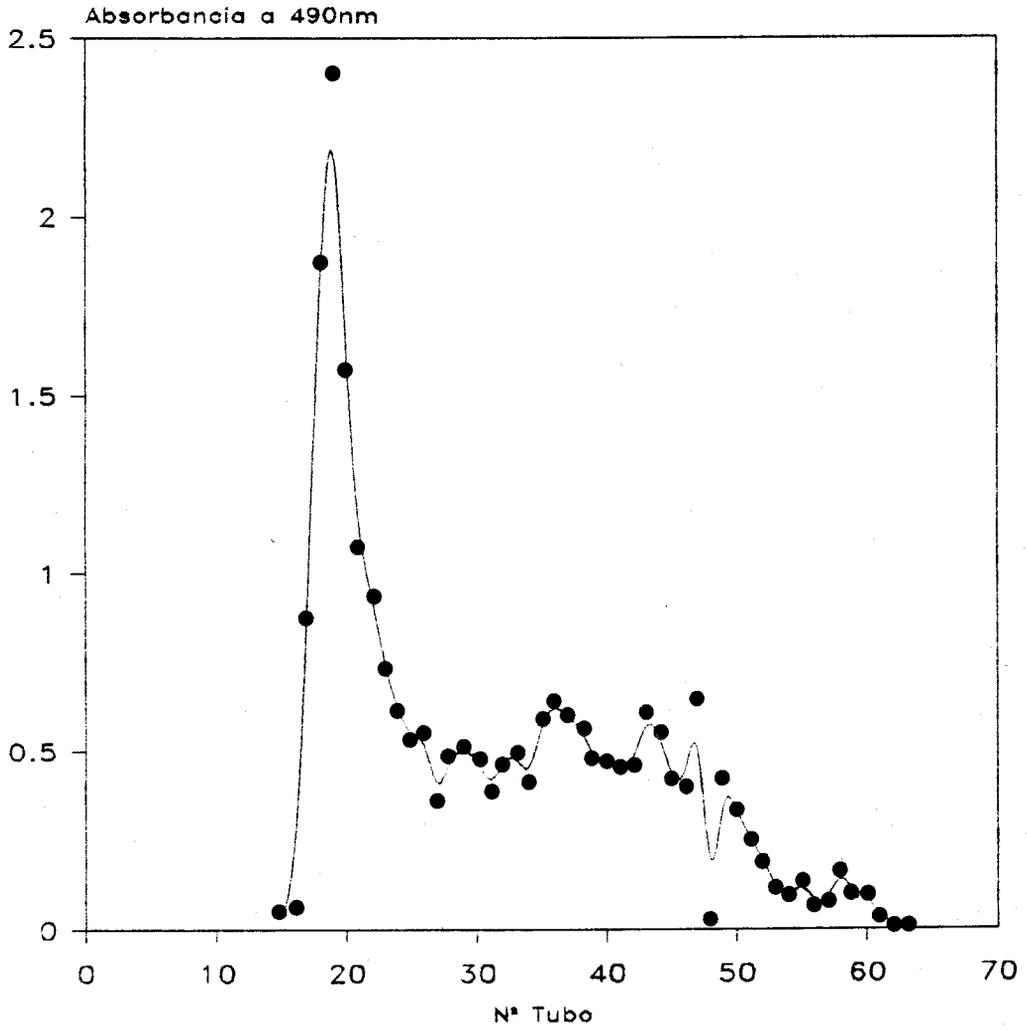


Figura 66.- Perfil de elución de la fracción de hemicelulosa B del fruto verde.

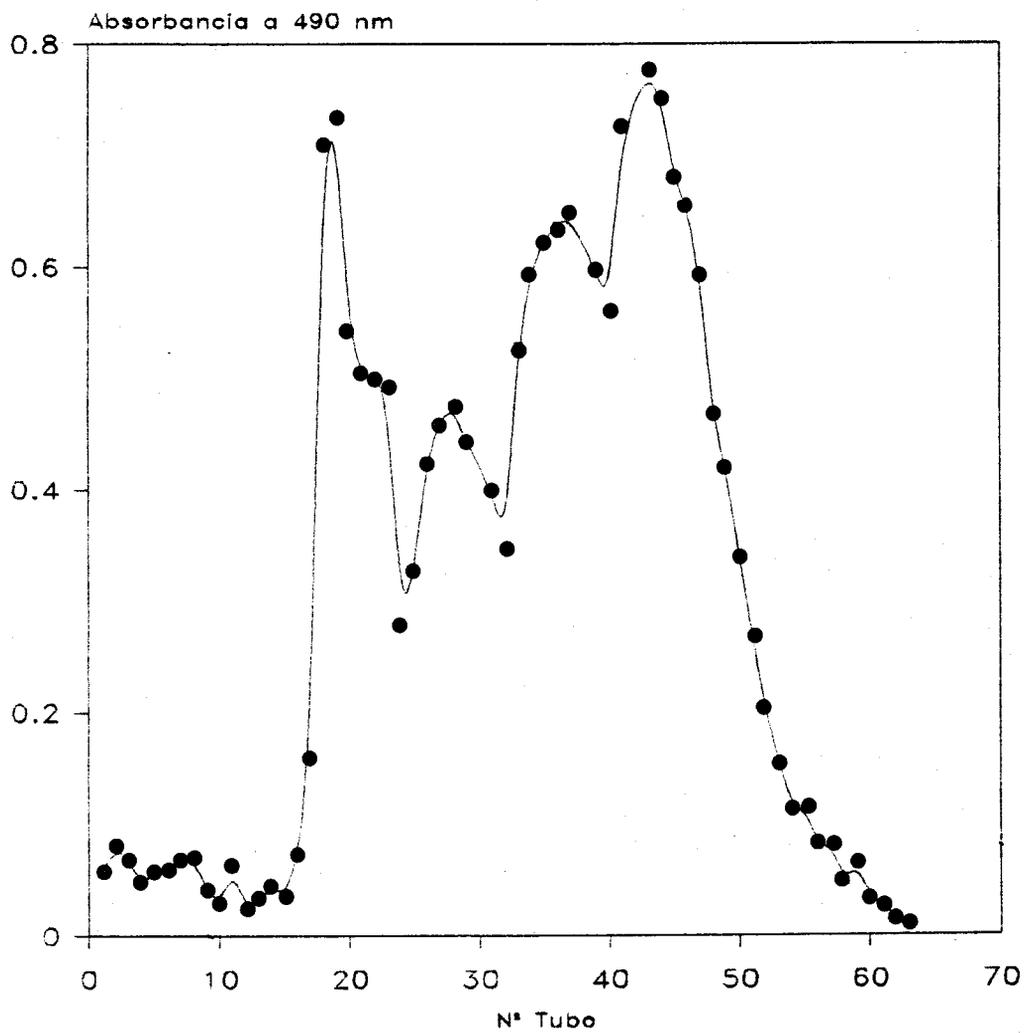


Figura 67.- Perfil de elución de la fracción de hemicelulosa B del fruto maduro.

5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES.

1.- Se han detectado los enzimas α - y β -galactosidasa, α -manosidasa, α -xilosidasa y α -arabinosidasa en aceituna, estableciéndose las condiciones óptimas para la medida de su actividad.

La aparición de actividad glicosidasas se inicia con la presencia de α -manosidasa y α -arabinosidasa, seguidos de α - y β -galactosidasa que lo hacen entre 15 y 40 días después y muy posteriormente, de α -xilosidasa.

2.- La actividad enzimática crece gradualmente alcanzando un máximo entre los 30 y 50 días de su aparición y disminuyendo seguidamente. Durante este periodo de tiempo, no se aprecia actividad importante de celulasa y poligalacturonasa.

Por cromatografía de filtración sobre gel se obtiene una buena separación de estos enzimas y se calculan sus pesos moleculares: α -manosidasa 90000; β -galactosidasa 65000; α -arabinosidasa, 65000 y α -galactosidasa 33000.

3.- Se observa una disminución de textura con tres etapas sucesivas, siendo la segunda la más pronunciada, coincidente con la aparición e incremento de actividad de glicosidasas. Por tanto, se llega a la conclusión de que estos enzimas son los principales.

responsables de la pérdida de textura en esta fase.

4.- Los cambios más significativos de azúcares de pared encontrados durante el desarrollo y maduración del fruto son: disminución de manosa y xilosa en torno a un 40% y de galactosa y arabinosa alrededor del 60%.

Las mayores pérdidas tienen lugar en la fase de maduración del fruto, coincidiendo con la máxima pérdida de textura y mayor actividad de glicosidasas.

5.- En relación con las fracciones de pared, los cambios más importantes se originan en la fracción de hemicelulosas. Se encuentran disminución del orden del 70% tanto de hemicelulosas A como B. Asimismo, se aprecia un notable incremento de la fracción soluble en agua fría y ligeros descensos de las solubles en agua caliente y oxalato.

6.- Se ha estudiado la distribución de pesos moleculares de las distintas fracciones de aceituna verde y madura, por cromatografía de filtración sobre gel. No se aprecian diferencias ni en las fracciones solubles en oxalato ni en las solubles en agua fría. En la soluble en agua caliente se observa un desplazamiento a polisacáridos de bajo peso molecular con la maduración, indicativo de que ha habido rotura de los mismos.

7.- En la determinación de pesos moleculares de hemicelulosas A y B aparecen notables cambios con la maduración.

Mientras en la hemicelulosa B de la aceituna verde se encuentra un pico bien definido de peso molecular 150000, en la de la madura aparecen además tres picos de pesos moleculares 60000, 20000 y 15000.

En la hemicelulosa A de la aceituna verde se encuentra un pico mayoritario de peso molecular 180000, así como una serie de picos minoritarios de menores pesos moleculares. Por el contrario, en la correspondiente a la madura se observa un incremento notable de la proporción de picos de bajo peso molecular.

De todo ello se concluye que existe una importante degradación de los polisacáridos de las hemicelulosas, tanto cuantitativamente como en la distribución de pesos moleculares.

6.- BIBLIOGRAFIA

AHMED, A.E. y LABAVITCH, J.M. (1980a).- "Cell wall metabolism in ripening fruit. I. Cell wall changes in ripening Bartlett pears".- *Plant Physiol.*, 65, 1009-1013.

AHMED, A.E. y LABAVITCH, J.M. (1980b).- "Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening Bartlett pears".- *Plant Physiol.*, 65, 1014-1016.

ARPAIA, M.L.; LABAVITCH, C.G. y KADER, A.A. (1987).- "Changes in the cell wall components of kiwifruit during storage in air or controlled atmosphere".- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112, 474-481.

ASP, N.G.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H. y SILJESTRÖM, M. (1983).- "Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber".- *J. Agric. Food Sci.*, 31, 476-482.

ASP, N.G. y JOHANSSON, C.G. (1984).- "Dietary fiber analysis".- *Nutr. Abstr. Rev. Clin. Nutr. (Serie A)*, 54, 735-752.

BARTLEY, I.M. (1974).- " β -Galactosidase activity in ripening apples".- *Phytochemistry*, 13, 2107-2111.

BEN-ARIE, R. y KISLEV, N. (1979).- "Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit".- *Plant Physiol.*, 64, 197-202.

BEN-SHALOM, N. (1986).- "Hindrance of hemicellulose and cellulose hydrolysis by pectic substances".- J. Food Sci., 51, 720-722.

BITTER, T. y MUIR, H.M. (1962).- "A modified uronic acid carbazole reaction".-Anal. Biochem., 4, 330-334.

BITNER, A.S.; HARRIS, L.E. y CAMPBELL, W.F. (1980).- "Rapid N-methylimidazole-catalyzed acetylation of plant cell wall sugars".- J. Agric. Food Chem., 28, 1242-1245.

BLUMENKRANTZ, N. y ASBOE-HANSEN, G. (1973).- "New method for quantitative determination of uronic acids".- Anal. Biochem., 54, 484-489.

BRILLOUET, J.M. y MERCIER, CH. (1981).- "Fractionation of wheat bran carbohydrates".- J. Sci.Food Agric., 32, 243-251.

BRILLOUET, J.M.; JOSELEAU, J.P.; UTILLE, J.P. y LELIEVRE, D. (1982).- "Isolation, purification, and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran".- J. Agric. Food Chem., 30, 488-495.

BRILLOUET, J.M. y ROCHET, D. (1983).- "Cell wall polysaccharides and lignin in cotyledons and hulls of seeds from various Lupin (*Lupinus L.*) species".- J. Sci. Food Agric., 34, 861-868.

BRILLOUET, J.M.; ROUAU, X.; HOEBLER, CH.; BARRY, J.L.; CARRE, B. y LORTA, E. (1988).- "A new method for determination of insoluble cell walls and soluble nonstarchy polisaccharides from plant materials".- J. Agric. Food Chem., 36, 969-979.

BUCHALA, A.J.; GENOUD, T. y MEIER, H. (1987).- "Polysaccharides in the culture medium of cotton cells cultured in vitro".- Food Hydrocolloids, 1, 359-363.

BURKE, D.; KAUFMAN, P.; McNEIL, M. y ALBERSHEIM, P. (1974).- "The structure of plant cell walls. VI. A survey of the walls of suspension-cultured monocots".- Plant Physiol., 54, 109-115.

CARRE, B.; BRILLOUET, J.C. y THIBAULT, J.F. (1985).- "Characterization of polysaccharides from white Lupin (*Lupinus albus* L.) cotyledons".- J. Agric. Food Chem., 33, 285-292.

CASTILLO, J.; MINGUEZ, M.I. y FERNANDEZ, M.J. (1974).- "Enzimas pectinolíticas y su relación con el ablandamiento de los productos de aderezo".- Grasas y aceites, 25, 362-366.

CASTILLO, J.; MINGUEZ, M.I. y FERNANDEZ, M.J. (1978).- "Presencia de poligalacturonasa y su relación con el ablandamiento en algunos productos empleados en la industria de aderezo (pimientos y aceitunas)".- Grasas y Aceites, 29, 97-101.

CASTILLO, J.; MINGUEZ, M.I. y FERNANDEZ, M.J. (1978).- "Presencia de poligalacturonasa en la aceituna negra madura. Factores que influyen la actividad de dicha enzima".-Grasas y Aceites, 29, 333-338.

CHAMBAT, G., JOSELEAU, J.P. y BARNOUD, F. (1981).- "The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures of *Rosa glauca*".- Phytochemistry, 20, 241-246.

CROOKES, P.R. y GRIERSON, D. (1983).- "Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation".- Plant Physiol., 72, 1088-1093.

DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, M.; LAU, J.M., STEVENSON, J.; DOARES, S.; GOLLIN, D.J.; CHELF, P. y DAVIS, K. (1985).- "Structure and function of plant cell wall polysaccharides. New developments in industrial polysaccharides".- Ed. Crescenzi, V.; DEA, I.M. y Stivala, S.S. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam, 57-80.

DEKKER, R.F. y RICHARDS, G.N. (1972).- "Determination of pectic substances in plant material". J. Sci. Food Agric., 23, 475-483.

DEKKER, R.F. y RICHARDS, G.N. (1976).- "Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry".- Academic Press. New York, 277-352.

DREHER, M.L. (1987).- "Handbook of dietary fiber".- Marcel Dekker,

INC. New York.

ENGLYST, H.; WIGGINS, H.J. y CUMMING, J.H. (1982).- "Determination of the nonstarch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography".- *Analyst*, 107, 302-318.

ENGLYST, H.N. y CUMING, J.H. (1984).- "Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-chromatography of constituent sugars as alditol acetates".- *Analyst*, 109, 937-942.

FERNANDEZ, M.J.; MINGUEZ, M.I. y CASTILLO, J. (1974).- "Composicion pèctica y presencia de pectinesterasa en algunos productos del aderezo".- *Grasas y Aceites*, 21, 331-340.

FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. y HEREDIA, A. (1987).- "Efecto inhibitor de algunos aditivos utilizados en la elaboraci3n de aceitunas de mesa".- *World Congress of Food Technology*, Barcelona.

FURDA, I. (1981).- "Simultaneous analysis of soluble and insoluble dietary fiber". En "The analysis of dietary fiber in food".- James y Theander Eds. New York.

GOERING, H.K. y VAN SOEST, P.J. (1973).- "Forage fiber analysis". *J. Assoc. Offic. Anal. Chemist.*, 4, 1-10.

GROSS, K.C. y WALLNER, S.J. (1979).- "Degradation of cell wall

polysaccharides during tomato fruit ripening".- *Plant Physiol.*, 63, 117-120.

GROSS, K.C. (1986).- "Composition of ethanol-insoluble polysaccharides in water extracts of ripening tomatoes".- *Phytochemistry*, 25, 373-376.

GUILLEN, R.; HEREDIA, A. y FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. (1987).- "Análisis de fibra dietética en alimentos".- *Grasas y Aceites*, 38, 404-408.

HA, Y.W. y THOMAS, R.L. (1988).- "Simultaneous determination of neutral sugars and uronic acids in hydrocolloids".- *J. Food Sci.*, 53, 574-577.

HAYWOOD, J.K. (1907).- "Reports on food and feeding stuffs".- U.S.D.A. *Bur. Chem. Bull.*, 105, 112-116.

HEREDIA, A. (1979).- "Composición de fibra. I. Métodos de determinación de lignina y celulosa".- *Grasas y Aceites*, 30, 149-154.

HEREDIA, A.; FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. y GUILLEN, R. (1990).- "Cellulases in cell wall-degrading extracts of *olea europaea arolensis*".- *Z. Lebensm. Unters Forsch*, 190, 22-24.

HEREDIA, A.; FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. y GUILLEN, R. (1990).- "Cellulase inhibition by polyphenols in olive fruits".- *Food Chem.*, 38, 69-73.

HUBER, D.J. (1983).- "Polyuronide degradation and hemicellulose

modifications in ripening tomato fruit".- J. Amer. Soc.Hort. Sci., 108, 405-409.

HUBER, D.J. y LEE, J.H. (1988).- "Uronic acid products release from enzymically active cell wall from tomato fruit and its dependency on enzyme quantity and distribution".- Plant Physiol., 87, 592-597.

JONES, J. y ALBERSHEIM, P. (1972).- "Aldoses and uronic acids of cell walls".- Plant Physiol., 49, 926-936.

JOSELEAU, J.P. y MARAIS, M.F. (1988).- "The structural repeating-unit of the capsular polysaccharide from Klebsiella serotype K48".- Carbohydrate Research. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 179, 321-326.

KARR, A. L. y ALBERSHEIM, P. (1970).- "Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a wall-modifying enzyme".- Plant Physiol., 46, 69-80

KNEE, M. (1973).- "Polisaccharide changes in cell walls of ripening apples".-Phytochemistry, 12, 1543-1549.

KNEE, M. (1974).- "Changes in structural polysaccharides of apples ripening during storage".- Colloques internationaux C.N.R.S.", 238, 341-345.

KNUTSON, C. A. y JEANES, A. (1968).- "A new modification of the

carbazole analysis: application to heteropolysaccharides".- Anal. Biochem., 24, 470-481.

KNUTSON, C.A. y JEANES, A. (1968).- "Determination of the composition of uronic acid mixtures".- Anal. Biochem., 24, 482-490.

LABAVITCH, J.M. y GREVE, L.C. (1983).- "Cell wall metabolism in ripening fruit" III. Purification of an endo- β -1,4-xylanase that degrades a structural polysaccharide of pear fruit cell walls".- Plant Physiol., 72, 668-673.

LEHRFELD, J. (1981).- "Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acids in carbohydrate mixtures".- Anal. Biochem., 115, 410-418.

McCLEARY, B.V. y MATHESON, N.K. (1975).- "Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds".- Phytochemistry, 14, 1187-1194.

McCLEARY, B.M.; MATHESON, N.K. y SMALL, D.M. (1976).- "Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms: structural requirements for β -mannanase hydrolysis".- Phytochemistry, 15, 1111-1117.

McFEETERS, R.F. y LOVDAL, L.A. (1987).- "Sugar composition of Cucumber

cell walls during fruit development".- J. Food Sci., 52, 996-1001.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G. y ALBERSHEIM, P. (1980).- "Structure of plant cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells".- Plant Physiol., 66, 1128-1134.

McNEIL, M.; DARVILL, A.L. y ALBERSHEIM, P. (1982).- "Structure of plant cell walls. XII. Identification of seven differently linked glycosyl residues attached to O-4 of the 2,4-linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I".- Plant Physiol., 70, 1586-1591.

MINGUEZ, M.I. (1982).- "Evolución de los constituyentes pécticos y de las enzimas pectolíticas durante el proceso de maduración y almacenamiento de la aceituna Hojiblanca".- Grasas y Aceites, 33, 327-333.

MONTIES, B. (1980).- "Les polimeres vegetaux".- Ed. B. Monties, Gauthier-Villars, París.

MORRISON, I.M. (1988).- "Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid".- Phytochemistry, 27, 1097-1100.

PILNIK, W. y VORAGEN, A.G. (1973).- "Pectic substances and other uronides". En "The Biochemistry of Fruits and their Products". Ed. A.C. Hulme, Academic Press, London, 53-87.

RING, S.G. y SELVENDRAN, R.R. (1978).- "Purification and methylation analysis of cell wall material from *Solanum tuberosum*".- *Phytochemistry*, 17, 745-752.

RING, S.G. y SELVENDRAN, R.R. (1980).- "Isolation and analysis of cell wall material from beeswing wheat bran (*Triticum aestivum*)".- *Phytochemistry*, 19, 1723-1730.

ROBERTSON, J.B. y VAN SOEST, P.J. (1980).- "The detergents system of analysis and its application to human foods". En "The Analysis of Dietary Fiber in Foods".- Eds. James y Theander, New York.

SELVENDRAN, R.R. (1975).- "Analysis of cell wall material from plant tissues: extraction and purification".- *Phytochemistry*, 14, 1011-1017.

SELVENDRAN, R.R. (1975).- "Cell wall glycoproteins and polysaccharides of parenchyma of *Phaseolus coccineus*".- *Phytochemistry*, 14, 2175-2180.

SELVENDRAM, R.R.; MARCH, J.F. y RING, S.G. (1979).- "Determination of aldoses and uronic acids content of vegetable fiber".- *Anal. Biochem.*, 96, 282-292.

SELVENDRAN, R.R. (1982).- "The chemistry of plant cell walls".- En "Dietary Fibre". Eds. Birch y Parker, Appl. Sci. Publ. London.

SIDDIQUI, I.R. (1990).- "Studies on vegetables. Investigation of water, oxalate, and sodium hydroxide soluble celery (*Apium graveolens*) polysaccharides: celery arabinogalactan".- J. Agric. Food Chem., 38, 38-41.

SIDDIQUI, I.R. (1990).- "Studies on vegetables. Investigation of water, oxalate, and sodium hydroxide soluble celery (*Apium graveolens*) polysaccharides: pectic polysaccharides".- J. Agric. Food. Chem., 38, 70-74.

SIDDIQUI, I.R. y EMERY, J.P. (1990).- "Studies on vegetables. Investigation of an arabinan from parsnip (*Pastinica sativa*)".- J. Agric. Food Chem., 38, 387-389.

SOUTHGATE, D.A.T. (1969).- "Determination of carbohydrates in foods. II. Unavailable carbohydrates".- J. Sci. Food Agric., 20, 331-335.

STEVENS, B.J.H. y SELVENDRAN, R.R. (1980).- "The isolation and analysis of cell wall material from the alcohol-insoluble residue of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)".- J. Sci. Food Agric., 31, 1257-1267.

STEVENS, B.J.; SELVENDRAN, R.R.; BAYLISS, C.E. y TURNER, R. (1988).- "Degradation of cell wall material of apple and wheat bran by human faecal bacteria in vitro".- J. Sci. Food Agric., 44, 151-166.

STEVENSON, T.T.; McNEIL, M.; DARVILL, A.G. y ALBERSHEIM, P. (1986).-

"Structure of plant cell walls. XVIII. An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells".- *Plant Physiol.*, 80, 1012-1019.

TAIZ, L. y HONIGMAN, W.A. (1976).- "Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid".- *Plant Physiol.*, 58, 380-386.

TAKEUCHI, Y.; KOMAMINE, A.; TOMOO, S.; WATANABE, K. y MORIKAWA, N. (1980).- "Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. II. Radio gas chromatographical analyses".- *Physiol. Plant.*, 48, 536-541.

TAKEUCHI, Y. y KOMAMINE, A. (1980).- "Turnover of cell wall polysaccharides of a *Vinca rosea* suspension culture. III. Turnover of arabinogalactan".- *Physiol. Plant.*, 50, 113-118.

THEANDER, O. y AMAN, P. (1979).- "The chemistry morphology and analysis of dietary fiber components". En "Dietary Fiber. Chemistry and Nutrition". Eds. Inglett y Folkeheg. Academic Press, New York, 214-244.

THEANDER, O. y AMAN, P. (1982).- "Studies on dietary fibre. A method for the analysis and chemical characterisation of total dietary

fibre".- J. Sci. Food Agric., 33, 340-344.

THEANDER, O. y WESTERLUND, E. (1986).- "Improved procedures por analysis of dietary fiber".- J. Agric. Food Chem., 34, 330-336.

THIBAUT, J.F. (1983).- "Enzymatic degradation and β -elimination of the pectic substances in cherry fruits".- Phytochemistry, 22, 1567-1571.

THOMAS, B. y WEBB, J.A. (1977).- "Multiple forms of α -galactosidase in mature leaves of Cucurbita pepo".- Phytochemistry, 16, 203-206.

TRACEY, M.V. (1964).- "The role of wheat flour pentosans in baking. I. Enzymic destruction of pentosans in situ".- J. Sci. Food Agric., 15, 607-611.

VALENT, B.S. y ALBERSHEIM, P. (1974).- "The stucture of plant cell wall. V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers".- Plant Physiol., 54, 105-108.

VAN SOEST, P.J. (1963).- "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content".- J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 46, 825-829.

VAN SOEST, P.J. (1963).- "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin".-

J. Assoc.. Offic. Anal. Chem., 46, 829-835.

VAN SOEST, P.J. (1965).- "Use of detergents in analysis of fibrous feeds. III. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages".- J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 48, 785-790.

VAN SOEST, P.J. y WINW, R.H. (1967).- "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents".- J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 50, 50-55.

VAN SOEST, P.J. y WINE, R.H. (1968).- "Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate".- J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 51, 780-785.

VAN SOEST, P.J. y McQUEEN, R.W. (1973).- "The chemistry and estimation of fibre".- Proc. Nutr. Soc., 32 123-130.

VAN DER WILDEN, W. y CHRISPEELS, M.J. (1983).- "Characterization of the isozymes of α -mannosidase located in the cell wall, protein bodies, and endoplasmic reticulum of *Phaseolus vulgaris* cotyledons".- Plant Physiol., 71, 82-87.

WALLNER, S.J. y WALKER, J.E. (1975).- "Glycosidases in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits".- Plant Physiol., 55, 94-98.

WALLNER, S.J. y BLOOM, H.L. (1977).- "Characteristic of tomato cell wall degradation in vitro".- *Plant Physiol.*, 60, 207-210.

WALLNER, S.J. (1978).- "Apple fruit β -galactosidase and softening in storage".- *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 103, 364-366.

WALTERS, J.S. y HEDGES, J.I. (1988).- "Simultaneous determination of uronic acids and aldoses in plankton, plant tissues, and sediment by capillary gas chromatography of hexylaldonamide and alditol acetates".- *Anal. Chem.*, 60, 988-994.

WEN, L.F.; CHANG, K.C., BROWN, G. y GALLAHER, D.D. (1988).- "Isolation and characterization of hemicellulose and cellulose from sugar beet pulp".- *J. Food Sci.*, 53, 826-829.

YAMAKI, S. y KAKIUCHI, N. (1979).- "Changes in hemicellulose-degrading enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit".- *Plant Cell Physiol.*, 20, 301-309.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Rafael Guillen Bajarzo titulada Modificaciones de la pared celular de ciertos

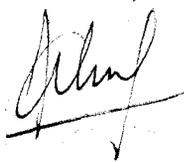
acordó otorgarle la calificación de APTO POR LIMITADA

Sevilla, 17 de octubre 1990

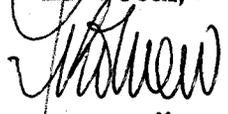
El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Doctorado,

