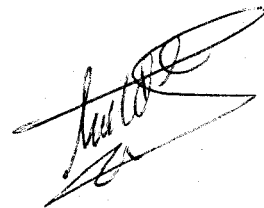


UNIVERSIDAD DE SEVILLA
 DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA
 Y TOXICOLOGÍA

**BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PULPA DE ACEITUNA EN
 DESARROLLO: PAPEL DE LA FOTOSÍNTESIS DEL FRUTO**

Memoria presentada por la licenciada M^a Teresa del Cuvillo Palomino para optar al grado de Doctora en Farmacia

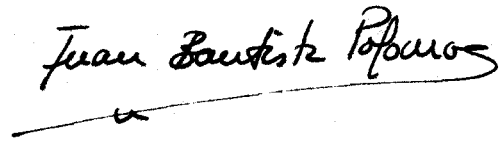


M^a Teresa del Cuvillo Palomino



Director

Dr. Juan Sánchez García
 Colaborador Científico
 del C.S.I.C



Tutor

Dr. Juan Bautista Palomas
 Profesor Titular del Departamento de
 Bioquímica, Bromatología y Toxicología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
folio 43 número 175 del libro
correspondiente.

Sevilla, 17 MARZO 1934
El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro Raffelli

A mis padres y hermanos

A Benito

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. Juan Sánchez García, a quien quiero agradecer su esfuerzo y dedicación. Igualmente deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Juan Bautista Palomas, tutor de este tesis, por su ayuda y apoyo.

Este agradecimiento quisiera hacerlo extensivo:

Al Instituto de la Grasa y sus Derivados por poner a mi disposición el material y los equipos instrumentales necesarios para la realización de esta tesis doctoral, al personal de la segunda planta y a todos aquellos cuya colaboración y apoyo me fueron brindados en todo momento.

A Azucena Blasco y Mercedes García de la Vega por los años compartidos de trabajo y por su incansable apoyo en todo momento.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la conseción de una beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador.

INDICE DE MATERIAS

Indice de materias	I
Abreviaturas	V
Enzimas nombradas en la memoria	VII
Indice de figuras	IX
Indice de tablas	XI

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción	1
1.2 Biosíntesis de triacilgliceroles de reserva en plantas oleaginosas	4
1.2.1 Formación de glicerol-3-fosfato	4
1.2.2. Síntesis de ácidos grasos	7
1.2.2.1 Reacciones iniciales	7
1.2.2.1.1 Generación de acetil-CoA	7
1.2.2.1.2 Formación de malonil-CoA	9
1.2.2.2 Ruta de síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos	11
1.2.2.2.1 Proteína transportadora de acilos (ACP)	11
1.2.2.2.2 Sistema ácido graso sintasa	12
1.2.2.3 Sistemas de desaturación	16
1.2.3 Formación de triacilgliceroles. Ruta de Kennedy	18
1.3 Interrelación entre fotosíntesis y biosíntesis lipídica	22
1.3.1 Semillas	24
1.3.2 Frutos	24

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico	31
2.2 Productos empleados	31
2.3 Determinación de la edad de las aceitunas y toma de muestras	32
2.4 Ensayos con precursores radioactivos	33

2.4.1	Precusores	33
2.4.2	Preparación del tejido	33
2.4.3	Ensayos <i>in vivo</i> de trozos de pulpa de aceituna	34
2.4.4	Ensayos <i>in vivo</i> de aceitunas enteras	36
2.5	Métodos	38
2.5.1	Extracción de lípidos	38
2.5.2	Fraccionamiento de lípidos	40
2.5.2.1	Cromatografía en columna de los extractos lipídicos	40
2.5.2.2	Separación de lípidos radioactivos por cromatografía en capa fina	42
2.5.3	Fraccionamiento de productos hidrosolubles	45
2.5.4	Análisis posicional de ácidos grasos en glicerolípidos	47
2.5.4.1	Estudio de las posiciones α y β de diacilgliceroles y triacilgliceroles. Lipolisis	48
2.5.4.2	Estudio de las posiciones α y β de la fosfatidilcolina. Fosfolipolisis	50
2.5.5	Transesterificación de glicerolípidos	51
2.5.6	Cuantificación de la radioactividad incorporada en lípidos	52
2.5.7	Determinación de actividades de las enzimas carboxilantes	52
2.5.8	Determinación de riqueza grasa. Método Soxhlet	55
2.5.9	Análisis de triacilgliceroles por cromatografía gaseosa	55

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Desarrollo del fruto	61
3.1.1	Ciclo vegetativo del olivo	61
3.1.2	Variación de la composición de triacilgliceroles durante el desarrollo del fruto	66
3.2	Biosíntesis de glicerolípidos en la pulpa. Ruta no fotosintética	69
3.2.1	Utilización de ^{14}C -acetato como precursor más adecuado para la síntesis de ácidos grasos	69
3.2.1.1	Efecto del pH del medio	70
3.2.1.2	Curva de concentración de precursor	73
3.2.1.3	Efecto del tiempo de incubación	74

3.2.1.4 Efecto de la luz y temperatura	78
3.2.2 Perfil de actividad biosintética durante el desarrollo	82
3.2.3 Distribución estereoespecífica de los ácidos grasos formados en las moléculas de glicerolípidos	86
3.2.4 Utilización de sustratos alternativos	90
3.2.5 Implicación relativa de acetato y piruvato en la biosíntesis de ácidos grasos	95
3.2.6 Localización histológica de la actividad biosintética	98
3.2.7 Influencia del estado de maduración sobre la actividad biosintética .	101
3.3 Fotosíntesis de lípidos	103
3.3.1 Biosíntesis de lípidos a partir de ¹⁴ C-bicarbonato en la pulpa de aceituna	103
3.3.1.1 Naturaleza de los productos de fijación fotosintética de ¹⁴ C-bicarbonato	105
3.3.1.2 Distribución de la radioactividad en las moléculas de glicerolípidos	106
3.3.1.3 Cinética de incorporación de ¹⁴ C-bicarbonato	108
3.3.1.4 Curva de concentración de bicarbonato	111
3.3.1.5 La fotosíntesis de glicerolípidos se localiza en el epicarpo	113
3.3.2 Biosíntesis de lípidos a partir de ¹⁴ CO ₂ en aceitunas	118
3.3.3 Sobre la participación relativa de Rubisco y PEP carboxilasa en la fijación de ¹⁴ C-bicarbonato	121
4. CONCLUSIONES	125
5. BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	Posición <u>sn</u> -1 y <u>sn</u> -3 de la molécula de glicerol
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACH	Acetil-CoA hidrolasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ACS	Acetil-CoA sintetasa
AG	Ácidos grasos
AGS	Ácido graso sintasa
ANSA	8-anilinaftaleno-1-ácido sulfónico, sal amónica
β	Posición <u>sn</u> -2 de la molécula de glicerol
β -ME	β -Mercaptoetanol
BCCP	Biotin carboxyl carrier protein
CC	Ciclo de Calvin
CCF	Cromatografía en capa fina
CCo	Cromatografía en columna
CK	Ciclo de Krebs
DAG	Diacilglicerol
DHAP	Fosfato de dihidroxiacetona
FAMES	Ésteres metílicos de los ácidos grasos
G3P	Glicerol-3-fosfato
GDH	Glicerofosfato deshidrogenasa
GK	Glicerol kinasa
KAS	β -cetoacil sintasa
L	Linoleato (18:2)
Lig	Lignificación
LP	Lípidos polares
Mad	Maduración
Mal	Malato
mal	Malonil
MAG	Monoacilglicerol
Mit	Mitocondria

O	Oleato (18:1)
OAA	Oxalacetato
OOO	Trioleina
P	Palmitato (16:0)
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pir	Piruvato
Po	Palmitoleato (16:1)
POO	Palmitildioleina
POP	Oleildipalmitina
p/v	peso/volumen
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QAE	Resina aniónica
S	Estearato (18:0)
SDF	Semanas después de la floración
SP	Resina catiónica
SOO	Estearildioleina
TAG	Triacilglicerol
tm	Toneladas métricas
U	Unidades

Otras abreviaturas empleadas en este trabajo, y no definidas en esta lista, son las de uso común en el campo de la Fisiología y Bioquímica Vegetal definidas en Instructions to Authors, Plant Physiol. 98, 1-10 (1992).

En ácidos grasos se especifica el número de átomos de carbono seguido del número de dobles enlaces, p.e.:

15:0	Ácido pentadecanoico
16:0	Ácido palmítico
18:0	Ácido estearico
18:1	Ácido oleico

ENZIMAS NOMBRADAS EN LA MEMORIA

Acetil-CoA carboxilasa	(EC 6.4.1.2)
Acetil-CoA hidrolasa	(EC 3.1.2.1)
Acetil-CoA sintetasa	(EC 6.2.1.1)
Acetil-CoA:ACP transacilasa	(EC 2.3.1.28)
Acil-CoA:1 acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa	(EC 2.3.1.51)
Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa	(EC 2.3.1.20)
Acil-CoA:glicerol-3-fosfato aciltransferasa	(EC 2.3.1.15)
Acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa	(EC 2.2.1.23)
Acil-CoA sintetasa	(EC 6.2.1.2 o 3)
Acil-ACP tioesterasa	(EC 3.1.2.14)
β -Cetoacil sintasa I	(EC 1.3.1.41)
β -Cetoacil sintasa II	(EC 2.3.1.41)
β -Cetoacil sintasa III	
β -Cetoacil-ACP reductasa	(EC 1.1.1.100)
CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa	(EC 2.7.8.2)
Enoil-ACP reductasa I	(EC 1.3.1.9)
Enoil-ACP reductasa II	(EC 1.3.1.10)
Enzima málico	(EC 1.1.1.40)
Estearil-ACP desaturasa	(EC 1.14.99.6)
Fosfatidato fosfohidrolasa	(EC 3.1.3.4)
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	(EC 4.1.1.31)
Fosfolipasa A ₂	(EC 3.1.1.4)

Glicerofosfato aciltransferasa	(EC 2.3.1.15)
Glicerofosfato deshidrogenasa	(EC 1.1.1.8)
Glicerol kinasa	(EC 2.7.1.30)
Lipasa	(EC 3.1.1.3)
Malonil-CoA sintetasa	
Malonil-CoA:ACP transacilasa	(EC 2.3.1.39)
Malato deshidrogenasa	(EC 1.1.1.82)
Oleato desaturasa	(EC 1.3.1.35)
Piruvato deshidrogenasa	(EC 1.2.4.1)
Polifenol oxidasa	(EC 1.10.3.1)
Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa	(EC 4.1.1.39)

INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Corte esquemático del fruto	3
Fig.2. Síntesis de acetil-CoA y glicerol-3-fosfato en los diferentes compartimentos de las células de semilla y mesocarpo	6
Fig.3. Ruta de síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos	14
Fig.4. Ruta de Kennedy para la síntesis de triacilgliceroles	19
Fig.5. Interrelación fotosíntesis y biosíntesis lipídica en semillas	23
Fig.6. Interrelación fotosíntesis y biosíntesis lipídica en frutos fotosintéticos	27
Fig.7. Preparación del tejido	35
Fig.8. Diagrama de flujo que resume el procedimiento analítico para la separación de las distintas fracciones acílicas y polares	39
Fig.9. Separación por cromatografía en capa fina de los diferentes lípidos de la pulpa de aceituna	44
Fig.10. Análisis de triacilgliceroles por cromatografía gaseosa	57
Fig.11. Ciclo vegetativo del olivo	62
Fig.12. Evolución del peso medio del fruto y contenido graso de la pulpa de aceituna durante su desarrollo	65
Fig.13. Variación de la composición en los principales triacilgliceroles de la pulpa de aceituna durante su desarrollo	68
Fig.14. Efecto del pH sobre la incorporación de ¹⁴ C-acetato en glicerolípidos de pulpa de aceituna	72
Fig.15. Efecto de la concentración de acetato sobre la incorporación en glicerolípidos de pulpa de aceituna	74
Fig.16. Incorporación de ¹⁴ C-acetato a distintos tiempos de ensayo en glicerolípidos de pulpa de aceituna	76
Fig.17. Estimulación de la luz sobre la incorporación de ¹⁴ C-acetato en glicerolípidos de pulpa de aceituna durante su desarrollo	79
Fig.18. Efecto de la temperatura sobre la incorporación de ¹⁴ C-acetato en glicerolípidos, en luz y oscuridad	81

Fig.19. Perfil de incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos de pulpa de aceituna a lo largo de su desarrollo	83
Fig.20. Incorporación relativa de ^{14}C -acetato en TAG y PC de pulpa de aceituna durante su desarrollo	85
Fig.21. Tejidos constituyentes de la pulpa de aceituna	99
Fig.22. Incorporación de ^{14}C -bicarbonato a distintos tiempos de ensayo en glicerolípidos y productos hidrosolubles	109
Fig.23. Efecto de la concentración de bicarbonato sobre la incorporación en glicerolípidos y productos hidrosolubles	113
Fig.24. Variación con el tiempo del nivel de CO_2 presente en la cámara de incubación	120
Fig.25. Participación relativa de Rubisco y PEP carboxilasa en la fijación de CO_2 en glicerolípidos	124

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución con el desarrollo de la incorporación de ^{14}C -acetato en posición α y β de los principales glicerolípidos de la pulpa de aceituna	89
Tabla 2. Incorporación de diferentes sustratos radioactivos en glicerolípidos de pulpa de aceituna	92
Tabla 3. Efecto de la adición de piruvato y acetato no marcados sobre la incorporación de ^{14}C -acetato y ^{14}C -piruvato en glicerolípidos	97
Tabla 4. Distribución de la actividad biosintética, como medida de ^{14}C -acetato, entre epicarpo y mesocarpo. Efecto de la luz	100
Tabla 5. Efecto del estado de maduración sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos	102
Tabla 6. Efecto de la luz sobre la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos	104
Tabla 7. Incorporación relativa de ^{14}C -bicarbonato en productos hidrosolubles y glicerolípidos de pulpa de aceituna en diferentes estados de desarrollo	106
Tabla 8. Incorporación relativa en diferentes subfracciones de glicerolípidos de pulpa de aceituna en diferentes estados de desarrollo	107
Tabla 9. Distribución de la actividad biosintética, como medida de ^{14}C -bicarbonato, entre epicarpo y mesocarpo. Efecto de la luz	115
Tabla 10. Localización histológica de enzimas carboxilantes en la pulpa de aceituna	116
Tabla 11. Efecto de la adición de gliceraldehído y Mg^{++} sobre la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos y productos hidrosolubles	117
Tabla 12. Distribución de la actividad biosintética, como medida de $^{14}\text{CO}_2$, entre epicarpo y mesocarpo de aceitunas enteras	119

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

El origen del olivo así como el zumo de su fruto, el aceite de oliva, es muy antiguo aunque no se puede determinar con certeza su procedencia y expansión en el curso del tiempo. La tesis más usada designa a Siria e Irán como sus lugares de origen y desde estos países, la expansión se hizo de Este a Oeste extendiéndose por toda la cuenca mediterránea. En tiempos más modernos, el olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo cultivándose en lugares tan alejados como Australia, Japón, China, Sudáfrica, California o Argentina.

Actualmente, la superficie dedicada a su cultivo se evalúa en unos 8,7 millones de hectáreas en todo el mundo, de las cuales más del 98 % se localiza en la cuenca mediterránea. Entre los principales países productores de aceite de oliva se encuentran España (2,0 millones ha de cultivo, casi 200 millones de árboles) e Italia (1,17 millones ha). Así mismo, producciones importantes poseen países como Grecia, Turquía, Túnez y Portugal. La producción mundial del olivar es de 10 millones de tm de aceitunas, de las que 9 millones sirven para la fabricación del aceite de oliva. En nuestro país, la producción de aceite de oliva alcanza una media de 500.000 tm por año, de las que más de la mitad (aproximadamente 58%) se obtienen en Andalucía.

El olivo cultivado es propio del clima templado-cálido característico de la cuenca del Mediterráneo. El árbol se distingue de las demás especies frutales por

su crecimiento lento, gran longevidad y rusticidad, estando preparado para resistir altas temperaturas, sequías, vientos, siendo posible su desarrollo en suelos a veces muy pobres. El olivo está compuesto por un tronco grueso de uno o varios pies, de corteza pardo grisácea. Sus hojas son simples, perennes, de color verde oscuro por el haz. Junto al nacimiento de cada hoja se sitúan las yemas que dan lugar a los racimos y las inflorescencias. Sus flores son blanquecinas y pequeñas.

El fruto es una drupa de mesocarpo carnoso y rico en lípidos; su forma es elipsoidal u ovoidal y de tamaño variable en función de la variedad. Consta de tres tejidos bien diferenciados: epicarpo, mesocarpo (ambos constituyen la pulpa) y endocarpo. El epicarpo está unido al mesocarpo que durante la maduración pasa de un color verde suave (aceituna verde) a una coloración negruzca (aceituna negra), pasando por una etapa intermedia en que se exhibe un tono rojo-violáceo llamada vulgarmente *envero* de la aceituna. El endocarpo o hueso es de consistencia leñosa y encierra a una sola semilla, la almendra (Fig. 1).

La variedad más importante destinada a la producción de aceites en España es la Picual, que se cultiva principalmente en la zona de Jaen y Córdoba. El aceite de oliva virgen se extrae directamente de los frutos mediante el uso de métodos físicos y es, sin duda, muy diferente de los demás aceites vegetales comestibles; posee una calidad superior debido a que es un producto natural obtenido por centrifugación o decantación del zumo resultante de la molturación del fruto. Puede

consumirse crudo, conservando en su estado natural todas las propiedades biológicas, incluyendo vitaminas y antioxidantes naturales.

El consumo mundial del aceite de oliva se estima en 1,5 millones de tm. España se encuentra entre los principales países consumidores y exportadores por lo que su producción es base fundamental para su economía (Marti, 1990), especialmente en la región andaluza.

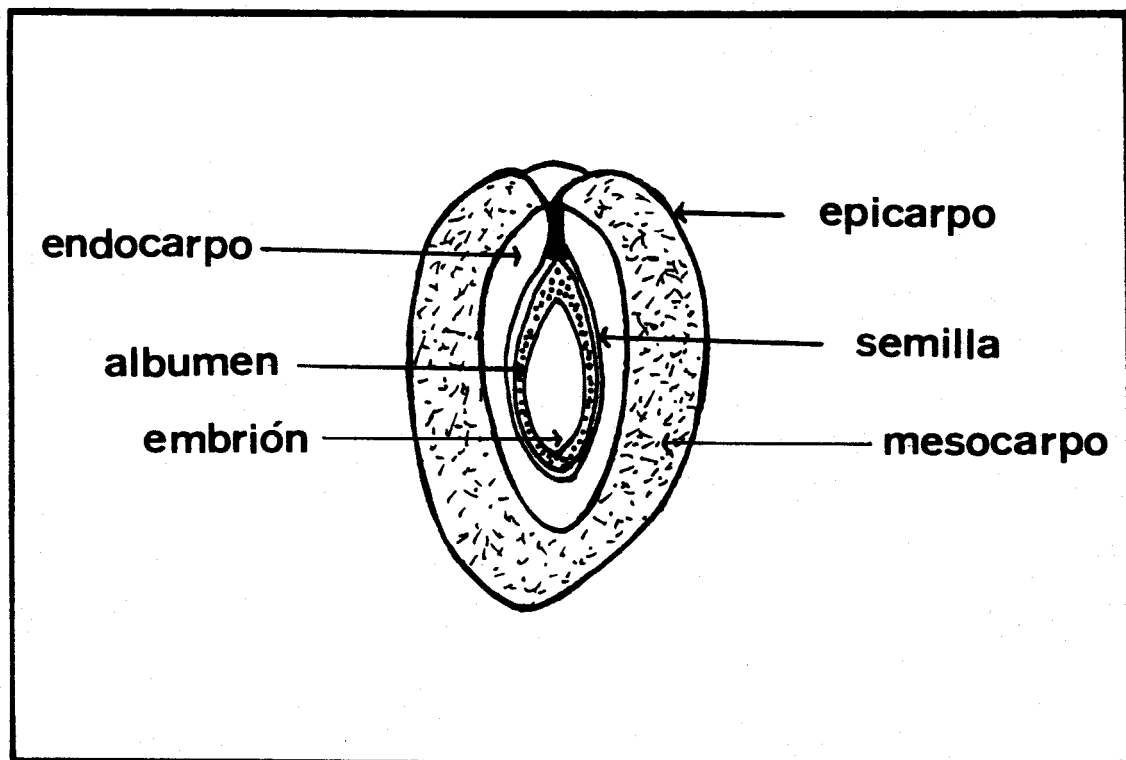


FIGURA 1. Corte esquemático del fruto.

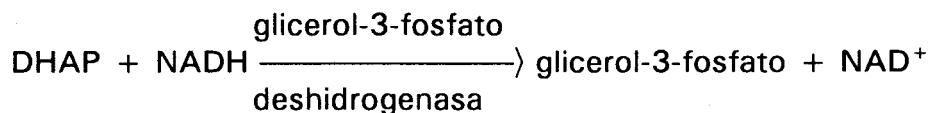
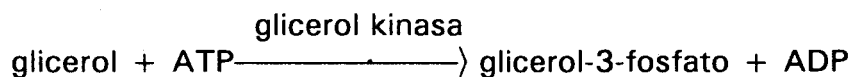
1.2 BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROLES DE RESERVA EN PLANTAS OLEAGINOSAS

Los lípidos constituyen, junto a carbohidratos y proteínas, moléculas esenciales para la arquitectura y función de la célula viva. En muchas semillas ciertos lípidos, generalmente triacilgliceroles, forman el material de reserva que durante la germinación servirán de nutrientes al embrión en las primeras etapas de su desarrollo.

La formación de triacilgliceroles de reserva en plantas oleaginosas tiene lugar en las membranas del retículo endoplasmático a partir de glicerol-3-fosfato y ácidos grasos en forma de tioésteres de CoA, acil-CoAs.

1.2.1 Formación de glicerol-3-fosfato

El glicerol-3-fosfato actúa como aceptor de restos acilos en la formación de glicerolípidos mediante la ruta de Kennedy (Fig. 4). En su formación participan dos enzimas cuya existencia está bien documentada tanto en procariotas como eucariotas:



La glicerol kinasa cataliza la fosforilación dependiente de ATP de glicerol (Fig. 2); la enzima ha sido caracterizada tanto en microorganismos (Thorner y Paulus, 1971) como en tejidos animales (Tyson y col., 1976). La existencia de actividad glicerol kinasa en tejidos vegetales se deduce los experimentos de marcaje *in vivo* con glicerol marcado, que resulta ser activamente incorporado en lípidos de hojas (Slack y col., 1977; Ohnishi y Yamada, 1980) y semillas en desarrollo (Slack y col., 1978). Sin embargo, en los pocos casos documentados (Huang, 1975; Hippmann y Heinz, 1976), su actividad en tejidos vegetales ha resultado ser muy baja, lo que sugiere que desempeña un papel poco significativo en la biosíntesis de glicerofosfato en plantas (Stymne y Stobart, 1987).

Una segunda enzima, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, cataliza la formación de glicerofosfato a partir del fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) generado vía glucolisis (Fig. 2). La existencia de esta actividad enzimática en plantas pasó desapercibida hasta su detección en hojas de espinaca (Santora y col., 1979), razón por la que hasta la década de los 80 no era considerada su participación en la biosíntesis de glicerofosfato en plantas (Harwood, 1979; Gurr, 1980). Desde entonces la enzima ha sido detectada y caracterizada en hojas de espinaca (Gee y col., 1988), en el alga *Dunaliella tertiolecta* (Haus y Wegmann, 1984), semillas de ricino (Finlayson y Dennis, 1980). La enzima de hojas de espinaca ha sido purificada a homogeneidad (Kirch y col., 1992) encontrándose tres isoenzimas localizados en el citosol, cloroplasto y peroxisoma; las tres isoformas son específicas para NADH y DHAP. En condiciones fisiológicas de

concentraciones de sustrato y pH la enzima es virtualmente inactiva como deshidrogenasa, por lo que ha venido en denominarse DHAP reductasa. Actualmente se considera a esta enzima como la fuente principal de glicerofosfato para la biosíntesis de glicerolípidos en plantas.

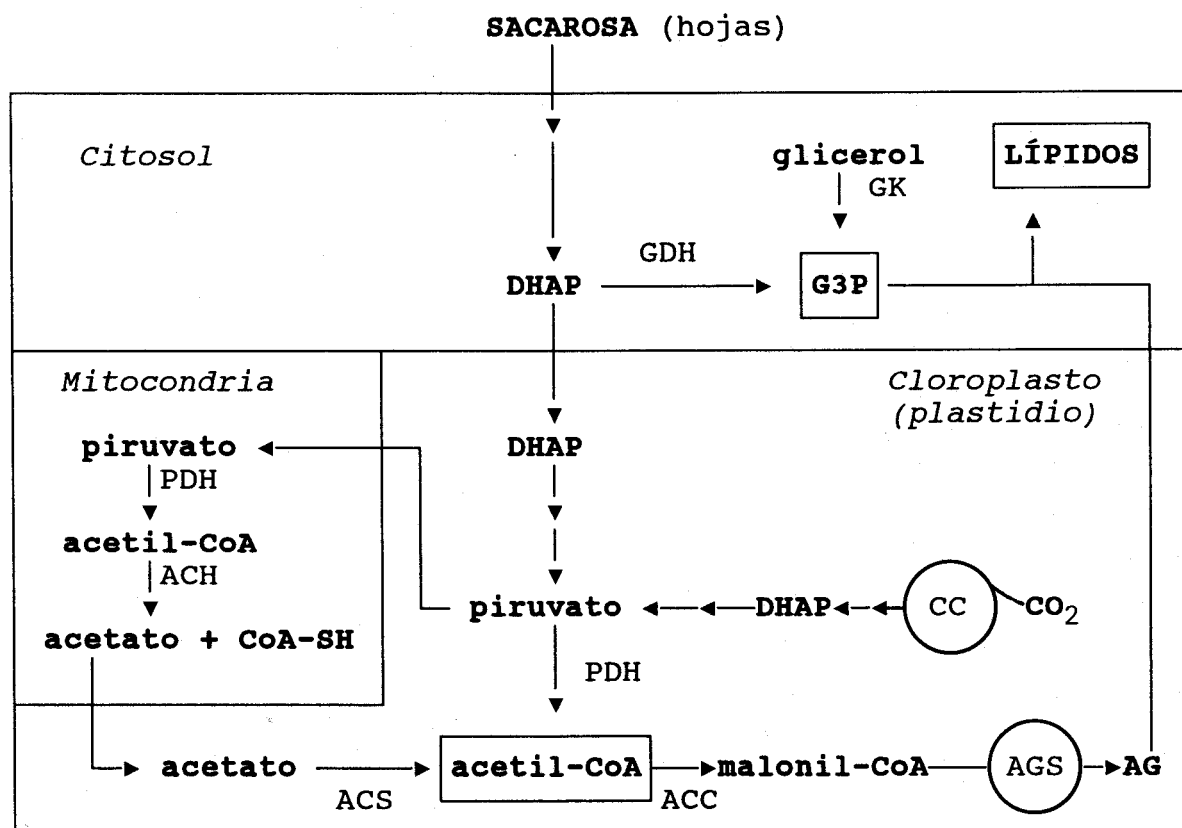


FIGURA 2. Síntesis de acetil-CoA y glicerol-3-fosfato en los diferentes compartimentos de la célula de semilla o mesocarpo. Abreviaturas usadas: ACC, acetil-CoA carboxilasa; ACH, acetil-CoA hidrolasa; ACS, acetil-CoA sintetasa; AG, ácidos grasos; AGS, ácido graso sintasa; CC, ciclo de Calvin; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; GDH, glicerofosfato deshidrogenasa; G3P, glicerol-3-fosfato; GK, glicerol kinasa; PDH, piruvato deshidrogenasa.

1.2.2 Síntesis de ácidos grasos

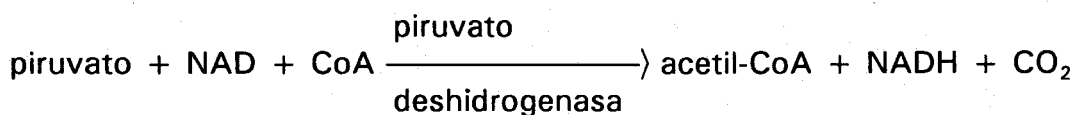
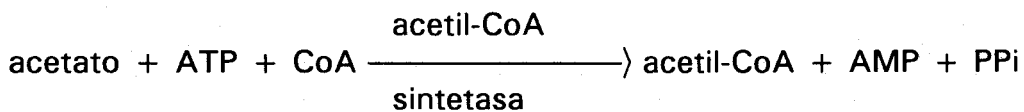
La síntesis de ácidos grasos es una actividad bioquímica presente en casi todos los seres vivos. Básicamente el proceso consiste en la adición de sucesivas unidades de dos átomos de carbono, procedentes de la descarboxilación de moléculas de malonato, a una molécula inicial de acetato.

En células vegetales el sistema está compartimentalizado en orgánulos específicos identificados como plastidios en tejidos no fotosintéticos y cloroplastos en los tejidos fotosintéticos (Stumpf, 1980).

1.2.2.1 Reacciones iniciales

1.2.2.1.1 Generación de acetyl-CoA

El acetyl-CoA es el precursor de la biosíntesis de ácidos grasos, y en su formación participan al menos dos enzimas diferentes:



La activación de acetato a acetil-CoA, catalizada por la acetil-CoA sintetasa (ACS), se dedujo a partir de experimentos de marcaje con ^{14}C -acetato. Este precursor ha sido, y continúa siendo, el más ampliamente utilizado en estudios de metabolismo lipídico, debido a que difunde fácilmente a los tejidos y es eficientemente incorporado en ácidos grasos. [Además, es químicamente estable y disponible a precio razonable]. En los tejidos fotosintéticos la enzima se localiza en los cloroplastos (Kuhn y col., 1981), mientras que en semillas la actividad enzimática se distribuye entre plastidios y citosol (Dennis y Miernyk, 1982). La enzima ha sido purificada recientemente a partir de hojas de espinaca (Zeiber y Randall, 1991) y plántulas etioladas de rábano (Golz y Lichtenthaler, 1993). Se ha argumentado que el acetato requerido se origina en las mitocondrias, a partir de piruvato (Fig.2), mediante la acción consecutiva de la piruvato deshidrogenasa y la acetil-CoA hidrolasa (Liedvogel y Stumpf, 1982).

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato. Su existencia en plantas fue asimismo deducida a partir de experimentos de marcaje de cloroplastos de espinaca con ^{14}C -piruvato (Yamada y Nakamura, 1975; Murphy y Leech, 1977), aunque estos resultados fueron descalificados después en base a la ausencia de actividad PDH en cloroplastos (Roughan y col., 1979a). Más recientemente la existencia de actividad PDH ha sido demostrada en cloroplastos aislados de distinta especies (Camp y Randall, 1985; Treede y Heise, 1985; Liedvogel, 1985), así como en plastidios de semillas (Denger y Smith, 1988), quedando establecida la capacidad de formación de acetil-CoA a

partir de piruvato, y por tanto la incorporación de este precursor en ácidos grasos, en plastidios aislados (Fig.2).

Puesto que el acetil-CoA es el iniciador de la síntesis de ácidos grasos, la contribución relativa de estas dos enzimas, ACS y PDH, a su formación podría desempeñar un papel importante en la regulación de la síntesis de triacilgliceroles.

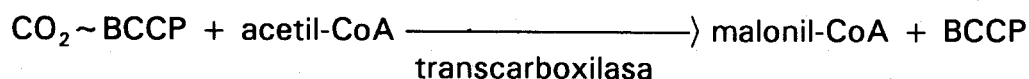
1.2.2.1.2 Formación de malonil-CoA

El primer paso de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos consiste en la carboxilación del acetil-CoA, produciéndose una molécula de malonil-CoA. Esta reacción está catalizada por una proteína multifuncional denominada acetil-CoA carboxilasa. Básicamente el mecanismo de la reacción se realiza en dos etapas (Nikolau y col., 1981):

1.- carboxilación de la biotina que se halla unida a la enzima.



2.- transferencia al acetil-CoA del CO₂ fijado.



La acetil-CoA carboxilasa de bacteria está constituida por tres proteínas discretas (BCCP, biotina carboxilasa y transcarboxilasa), mientras que la de animales consiste en un polipéptido multifuncional que contiene los tres dominios. Hatch y Stumpf (1961) fueron los primeros en caracterizar la enzima de plantas superiores. A pesar de que originalmente se propuso que la enzima de plantas era de tipo bacteriano (Kannangara y Stumpf, 1972), la evidencia acumulada indica que se trata de un polipéptido multifuncional como el de animales (Nikolau y col., 1981; Harwood, 1988). La enzima está localizada en los cloroplastos de las células foliares (Mohan y Kekwick, 1980; Nikolau y col., 1981) y en los plastidios de tejidos no fotosintéticos (Finlayson y Dennis, 1983).

La actuación de la enzima es un factor regulador en la síntesis de ácidos grasos en plantas (Simcox y col., 1979; Turnham y Northcote, 1982; Harwood, 1988) y su actividad podría estar modulada por la luz (Hawke y Leech, 1987). Así mismo, se ha descrito que cambios en la actividad de la enzima están relacionados con una diferente acumulación de lípidos en cotiledones de semillas (Turnham y Northcote, 1983).

1.2.2.2 Ruta de síntesis *de novo* de los ácidos grasos

Se ha dado en llamar con el nombre genérico de síntesis *de novo* a la actividad realizada por un grupo de enzimas que catalizan la formación de ácido palmítico, en forma de palmitil-ACP, a partir de malonil-CoA y acetil-CoA, y la intervención indispensable de la molécula portadora de acilos, ACP (acyl carrier protein).

1.2.2.2.1 Proteína transportadora de acilos (ACP)

La síntesis de ácidos grasos en las plantas superiores requiere la presencia de una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 11 KDa) que se caracteriza por poseer 4'-fosfopantoteína como grupo prostético, similar al CoA en estructura y función. Su grupo sulfidrilo terminal es el lugar de esterificación de los ácidos grasos o de los intermediarios acílicos que participan en la síntesis *de novo*.

Su existencia y requerimiento para la síntesis de ácidos grasos en plantas superiores fue demostrada por Overath y Stumpf (1964), siendo posteriormente aislada, purificada y caracterizada en el mismo laboratorio a partir de mesocarpo de aguacate (Simoni y col., 1967). Hay claras evidencias de que el ACP está exclusivamente localizado en los cloroplastos de células de las hojas y en los plastidios de los tejidos no fotosintéticos (Ohlrogge y col., 1979), aunque

evidencias más recientes indican que también se encuentra en mitocondrias (Chuman y Brody, 1989).

1.2.2.2.2 Sistema ácido graso sintasa

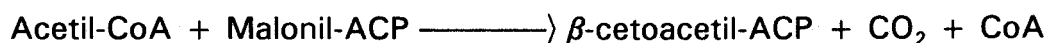
Desde el descubrimiento por Overath y Stumpf en 1964 de que el ACP era una proteína de bajo peso molecular, termoestable y estable al tratamiento ácido, que podía ser aislada de muchos tejidos vegetales, junto con los estudios realizados sobre la síntesis de ácidos grasos en diferentes plantas, se considera que, al igual que en *E. coli*, la ácido graso sintasa de plantas es de tipo II con reacciones parciales individuales catalizadas por enzimas discretas separables.

Las reacciones implicadas en la síntesis de ácidos grasos se representan en la figura 3. En primer lugar, el acetil-CoA reacciona con el ACP por la acción de la acetil-CoA:ACP transacilasa para formar acetil-ACP. Esta enzima presenta baja actividad específica en todos los tejidos analizados (Stumpf, 1984) por lo que se ha considerado como un paso limitante para la síntesis de ácidos grasos. En la reacción siguiente, catalizada por la malonil-CoA:ACP transacilasa, el malonil-CoA formado por la acción de la acetil-CoA carboxilasa, reacciona igualmente con el ACP para formar malonil-ACP.

En el siguiente paso tiene lugar la condensación de acetil-ACP y malonil-ACP, liberándose el CO₂ fijado anteriormente por la acetil-CoA carboxilasa, y requiere la

participación de la β -cetoacil-ACP sintasa (KAS). Se han separado dos formas de esta enzima denominadas KAS I y KAS II que presentan diferente especificidad por los sustratos. KAS I utiliza acil-ACPs en el rango C2-C14 con poca actividad hacia palmitil-ACP (Shimakata y Stumpf, 1983). Por el contrario, KAS II es solamente activa con miristoil-ACP y palmitil-ACP, y necesaria para la formación de esteárico (Shimakata y Stumpf, 1982a). Ambas enzimas presentan distinta sensibilidad a inhibidores; KAS I es inhibida por cerulenina mientras que KAS II es relativamente insensible a dicho antibiótico, pero sensible al arsenito.

Recientemente se ha puesto de manifiesto un enzima condensante de cadena corta en E. coli, no sensible a la cerulenina, denominada KAS III (Jackowski y Rock, 1987) que cataliza la reacción:



Experimentos realizados recientemente han demostrado la existencia de una enzima similar en extractos de hojas de espinaca (Jaworski y col., 1989), mostrando el acetil-CoA como el sustrato preferido en lugar del acetil-ACP. La actividad específica de esta enzima es al menos cinco veces mayor que la de la acetil-CoA:ACP transacilasa. Estudios posteriores, mostraron que la enzima condensante KAS III está presente en todos los tejidos de plantas estudiados, sugiriendo que la actividad de la acetil-CoA:ACP transacilasa no es necesariamente

el paso limitante en la formación de ácidos grasos, por cuanto que esta reacción podría ser sorteada mediante esta nueva enzima (Walsh y col., 1990).

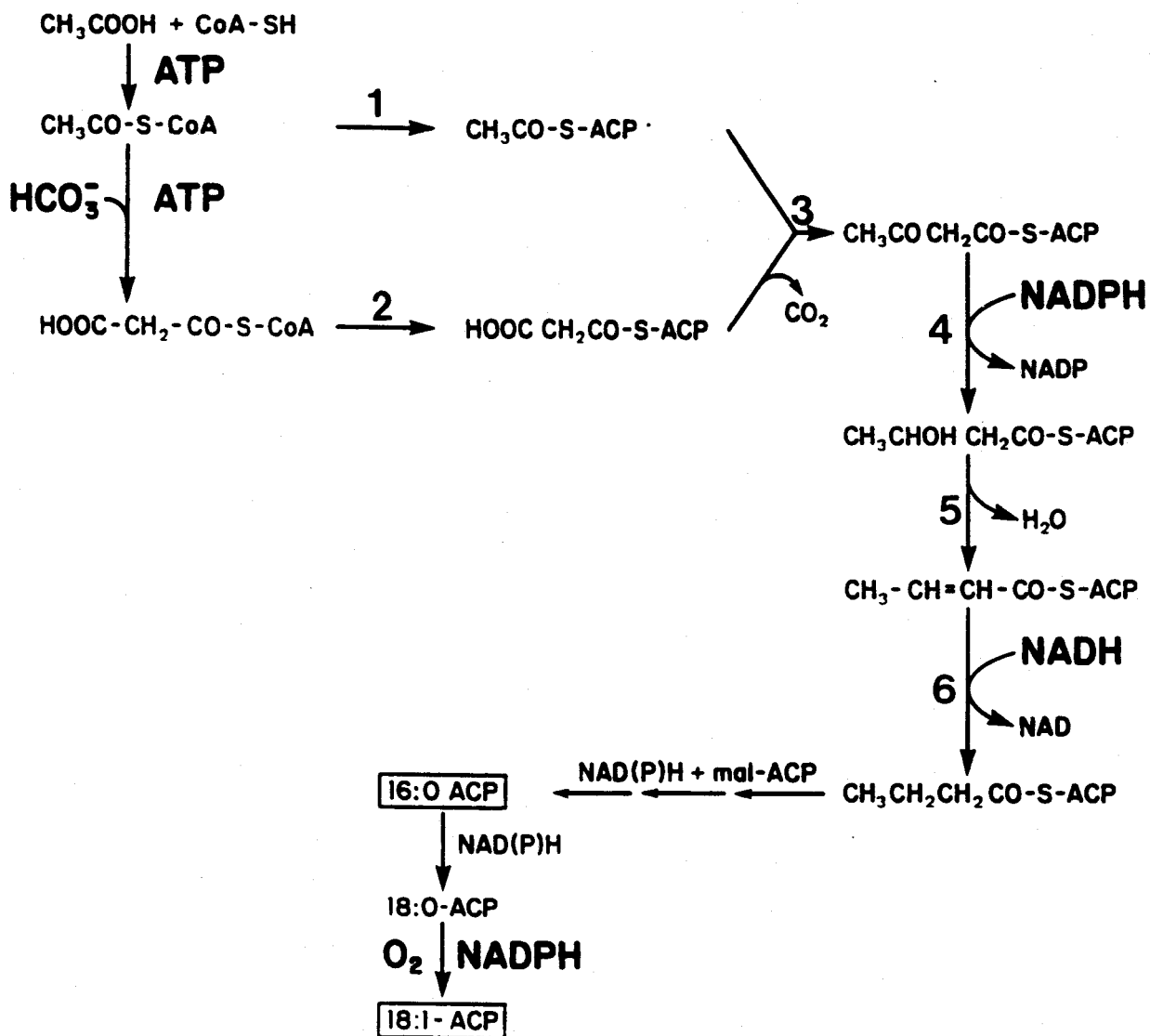
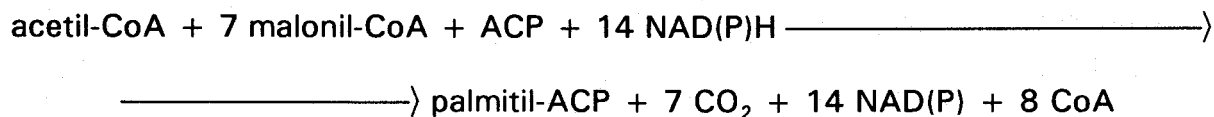


FIGURA 3. Ruta de síntesis *de novo* de los ácidos grasos. (1) acetil-CoA:ACP transacilasa; (2) malonil-CoA:ACP transacilasa; (3) β -cetoacil-ACP sintasa (KAS); (4) β -cetoacil-ACP reductasa; (5) β -hidroxiacil-ACP deshidratasa; (6) enoil-ACP reductasa. Abreviaturas: ACP, proteína transportadora de acilos; mal, malonil; 16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido estearico; 18:1, ácido oleico.

El β -cetoacil-ACP formado experimenta una reducción catalizada por la β -cetoacil-ACP reductasa. Dos isoformas de esta enzima, dependientes de NADPH o NADH, han sido descritas en diferentes tejidos (Caughey y Kekwick, 1982; Shimakata y Stumpf, 1982b), siendo la primera cuantitativamente más importante en la mayoría de los tejidos de plantas. A continuación, se produce una deshidratación catalizada por la β -hidroxiacil-ACP dehidratasa seguido de una segunda etapa de reducción catalizada por la enoil-ACP reductasa. Se han detectado dos formas de esta última enzima, una dependiente de NADH y otra de NADPH, aunque sólo la primera parece estar presente en tejidos de hojas (Shimakata y Stumpf, 1982b) y aguacate (Caughey y Kekwick, 1982).

Así pues, la ácido graso sintasa cataliza la formación de ácido palmítico a partir de acetil-CoA, mediante una secuencia cíclica de reacciones enzimáticas; en cada ciclo se produce un alargamiento de la molécula de ácido graso de dos átomos de carbono, que los suministra el malonil-CoA, según la siguiente estequiometría:



El palmitil-ACP así formado puede seguir dos destinos: puede ser alargado a estearil-ACP, mediante la misma secuencia de reacciones enzimáticas descritas,

o bien puede ser utilizado en la biosíntesis de glicerolípidos, como se verá más adelante.

1.2.2.3 Sistemas de desaturación

La biosíntesis de ácido oleico en plantas es catalizada por la enzima estearil-ACP desaturasa que se localiza en los plastidios (Jaworski, 1987). Se trata de una oxigenasa de función mixta que requiere NADPH y oxígeno molecular, e introduce un doble enlace cis entre los carbonos noveno y décimo de la cadena hidrocarbonada del estearilo, formándose en consecuencia una molécula de oleil-ACP (McKeon y Stumpf, 1982). Hasta este punto, en que culmina la síntesis de ácido oleico, todas las reacciones son catalizadas por enzimas solubles, localizadas en los plastidios y que utilizan ACP como portador.

Seguidamente otra enzima plastidial, la acil-ACP tioesterasa, actúa sobre el oleil-ACP hidrolizando el enlace tioéster (Shine y col., 1976) produciendo, por tanto, la liberación de ácido oleico. La mayor parte del oleico libre recién sintetizado, atraviesa las envueltas plastidiales. Durante este trasiego o inmediatamente después, se produce la formación de un nuevo enlace tioéster con el CoA (Sánchez y Mancha, 1981), reacción catalizada por la acil-CoA sintetasa (acil tiokinasa). Otros ácidos grasos como el palmítico o esteárico salen también del plastidio experimentando el mismo proceso. Los acil-CoAs del oleico, palmítico

y esteárico son los primeros sustratos de las reacciones que darán lugar a la formación de glicerolípidos en compartimentos subcelulares extraplasmáticos.

El ácido oleico, transformado en oleil-CoA, puede ser desaturado posteriormente fuera del plastidio. Actualmente se acepta que, oleil-fosfatidilcolina es el sustrato preferido por la oleato desaturasa. Según algunos autores la desaturación del oleato puede ocurrir en ambas posiciones de la fosfatidilcolina (Murphy y col., 1985; Stobart y Stymne, 1985a), sin embargo el grado de desaturación observado en la posición sn-1 es relativamente bajo (Demandre y col., 1986).

Todos los estudios realizados sobre la oleato desaturasa indican que esta enzima, no presente en animales, está localizada en la fracción microsomal, presumiblemente en el retículo endoplasmático (Vijay y Stumpf, 1972). Los cloroplastos de plantas 16:3 (Roughan y Slack, 1982) parecen ser también un segundo lugar de síntesis de linoleico, aunque se conoce muy poco acerca la oleato desaturasa presente en estos orgánulos.

El mecanismo de introducción del enlace cis es aeróbico, requiere oxígeno molecular, poder reductor (usualmente NADH o NADPH), un transportador de electrones y una desaturasa. Así mismo, cationes divalentes y grupos sulfidrilos reducidos son necesarios para la desaturación (Vijay y Stumpf, 1972). La actividad de la enzima es regulada por la temperatura mediante diferentes mecanismos

(Browse y Slack, 1983; Stymne y Stobart, 1986; Cheerbrough, 1989). Así mismo, se ha descrito que otros fosfolípidos, tales como la fosfatidiletanolamina, pueden actuar como sustratos de la desaturación del oleico en plantas (Gennity y Stumpf, 1985; Sánchez y Stumpf, 1984; Trémolières y col., 1980).

Menos estudiada es la linoleato desaturasa, sin embargo por los datos que se tienen (Stymne y Appleqvist, 1980; Browse y Slack, 1981) también se localiza en el retículo endoplasmático y presenta los mismos requerimientos que la oleato desaturasa.

1.2.3 Formación de triacilglicerolés. Ruta de Kennedy

El ensamblaje final de las moléculas de triacilglicerolés de reserva, a partir de glicerofosfato y ácidos grasos, tiene lugar mediante la llamada ruta de Kennedy (Kennedy, 1961). Las enzimas implicadas, tres aciltransferasas y una fosfatasa, se localizan en el retículo endoplasmático y utilizan acil-CoAs como sustrato, como lo demuestra el hecho de que fracciones microsómicas aisladas catalizan la formación de triacilglicerolés a partir de acil-CoAs (Sánchez y col., 1992a). Los pasos individuales de esta vía se representan en la figura 4.

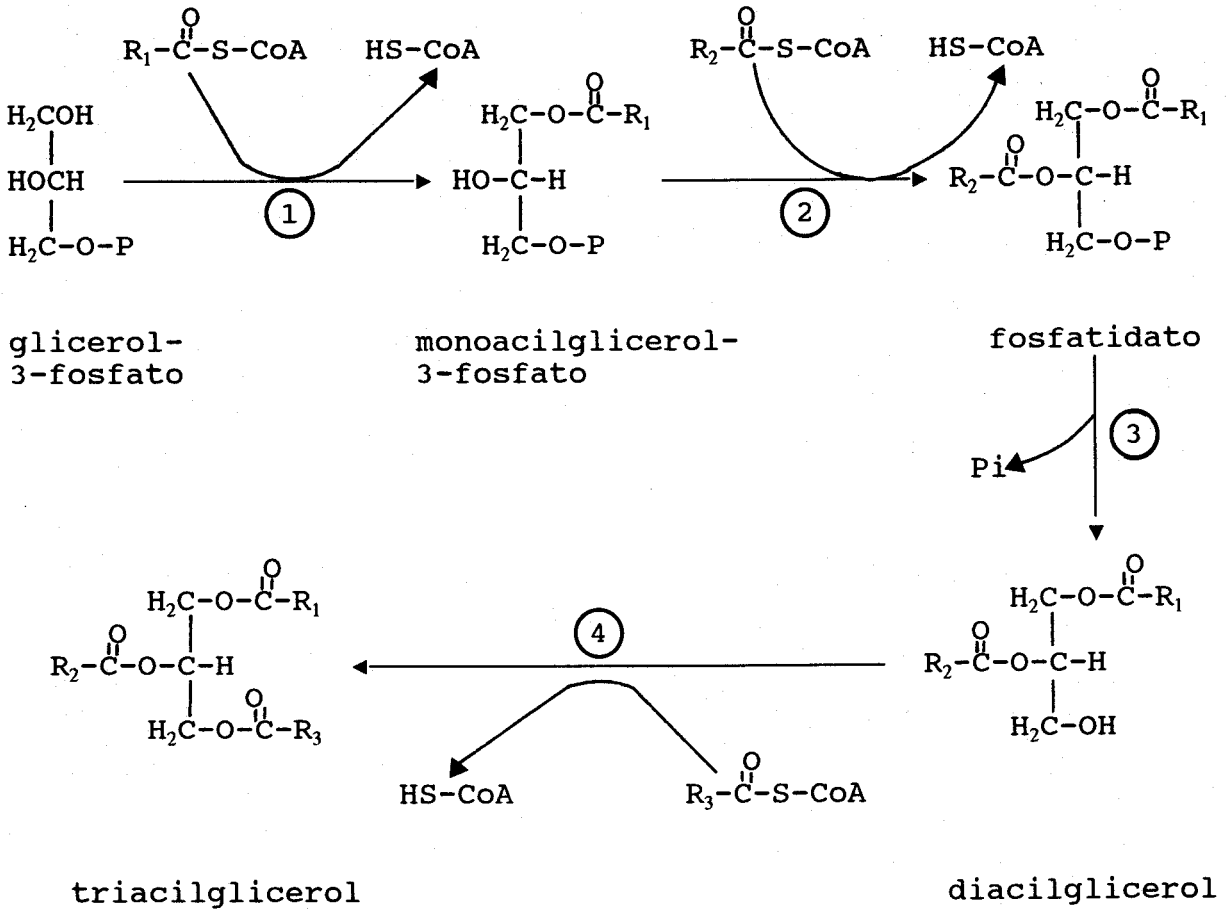


FIGURA 4. Ruta de Kennedy para la síntesis de triacilglicerol. (1) acil-CoA: glicerol-3-fosfato aciltransferasa; (2) acil-CoA:1 acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa; (3) fosfatidato fosfohidrolasa; (4) acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (Slack y Browse, 1984).

La primera enzima, acil-CoA:glicerol-3-fosfato aciltransferasa, cataliza la acilación de la molécula de glicerol-3-fosfato en posición sn-1, formando ácido lisofosfatídico. Este es el sustrato para la segunda enzima, acil-CoA:1 acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa, que cataliza la acilación de la posición sn-2 originando ácido fosfatídico. A continuación, la fosfatidato fosfohidrolasa cataliza la hidrólisis del enlace fosfoéster del ácido fosfatídico para formar

sn-1,2-diacilglicerol, que actúa como precursor directo de la síntesis de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y triacilglicerol.

En preparaciones microsómicas de cotiledones de cártamo y girasol, el paso limitante en la formación de triacilglicerol es la formación de diacilglicerol a partir del ácido fosfatídico (Stymne y Stobart, 1987). Esto indica que esta enzima desempeña un papel regulatorio en la ruta controlando el flujo de intermediarios hacia la formación de triacilgliceroles o fosfolípidos de membrana.

El último paso en la biosíntesis de triacilgliceroles es la acilación del sn-1,2-diacilglicerol en posición sn-3 catalizada por la enzima acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa, cuyas propiedades han sido estudiadas en diversas semillas oleaginosas (p.e. Ichihara y col., 1988; Cao y Huang, 1986; Weselake y col., 1991). Sin embargo, la única diacilglicerol aciltransferasa purificada hasta aparente homogeneidad es la de soja (Kwanyuen y Wilson, 1986). También parece estar presente en la envuelta de cloroplastos de hojas de espinaca (Martin y Wilson, 1984). Esta última reacción de acilación del glicerol en posición sn-3 es, de hecho, la única exclusiva de la biosíntesis de triacilgliceroles y la responsable del tercer ácido graso presente en triacilgliceroles de plantas. Se ha descrito en el caso de la aceituna (Rutter y col., 1992) y en semillas oleaginosas (Griffiths y col., 1988) que la última acilación pudiera ser el paso limitante en la biosíntesis de triacilgliceroles.

La acilación de las diferentes posiciones del glicerol-3-fosfato se produce de forma selectiva tal y como se ha demostrado en experimentos *in vivo* realizados con cotiledones de semillas (Griffiths, 1986). Así, la acilación de la posición sn-1 del glicerol-3-fosfato para la formación de ácido lisofosfatídico, muestra preferencia por los ácidos grasos saturados (Ichihara, 1984; Griffiths y col., 1985). Por el contrario, la acilación de la posición sn-2 del glicerol-3-fosfato, que resulta en la formación de ácido fosfatídico, muestra una fuerte selectividad por los ácidos grasos insaturados, excluyendo casi totalmente a los ácidos grasos saturados (Griffiths y col., 1985). Por otra parte, los análisis sobre distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en triacilglicerol de distintos aceites vegetales indica que la selectividad en la acilación de la posición sn-3 del glicerol es similar a la de la posición sn-1 y está caracterizada usualmente por la presencia de ácidos grasos saturados, que son excluidos de la posición sn-2. Sin embargo, Ichihara y Noda (1982) encontraron en semilla de cártamo, que la acilación de esta posición sn-3 tenía lugar sin preferencia por diferentes diacilgliceroles y acil-CoAs.

La especificidad mostrada por las aciltransferasas extraplastidiales descritas anteriormente, es claramente diferente de aquellas enzimas presentes en los cloroplastos, donde los ácidos grasos saturados son utilizados particularmente en la acilación de la posición sn-2 (Bertrans y Heinz, 1981; Frentzen y col., 1983). Por esta causa se pueden distinguir dos tipos de glicerolípidos en los tejidos vegetales: a) los de origen plastidial, que comúnmente se denominan procarióticos, se caracterizan por presentar en posición sn-2 el acilo correspondiente al palmítico o

un insaturado derivado del mismo; b) los de origen microsomal, llamados de tipo eucarióticos, poseen en la citada posición el acilo correspondiente al ácido oleico o uno de sus derivados más insaturados (Roughan y Slack, 1982).

1.3 INTERRELACIÓN ENTRE FOTOSÍNTESIS Y BIOSÍNTESIS LIPÍDICA

La fuente primaria de los átomos de carbono constituyentes de las grasas vegetales, carbohidratos y proteínas es el anhídrido carbónico atmosférico fijado por la fotosíntesis. El proceso de asimilación de CO_2 utiliza como fuentes de energía el ATP y NADPH generados en la fotosíntesis, y tiene lugar en los cloroplastos. Las reacciones fotosintéticas de absorción de luz y formación de ATP y NADPH (fotosíntesis propiamente dicha) ocurren en las membranas interiores de los cloroplastos, llamadas tilacoides. Las reacciones implicadas en la asimilación de CO_2 (ciclo de Calvin) tienen lugar en las zonas interlamelares o estroma. Los productos resultantes se trasladan al citoplasma de las células fotosintéticas y posteriormente a otras partes de la planta.

Como se ilustra en el figura 5, el CO_2 es fotosintéticamente reducido en los cloroplastos de las células foliares hasta ácido 3-fosfoglicérico, que es reducido posteriormente a 3-fosfogliceraldehido. La triosa fosfato resultante, preferentemente en forma de fosfato de dihidroxiacetona, es exportada al citosol mediante el translocador fosfato, en donde tiene lugar la síntesis de sacarosa a

través de una ruta bien definida. La sacarosa es transportada vía floema a los distintos órganos sumideros de la planta.

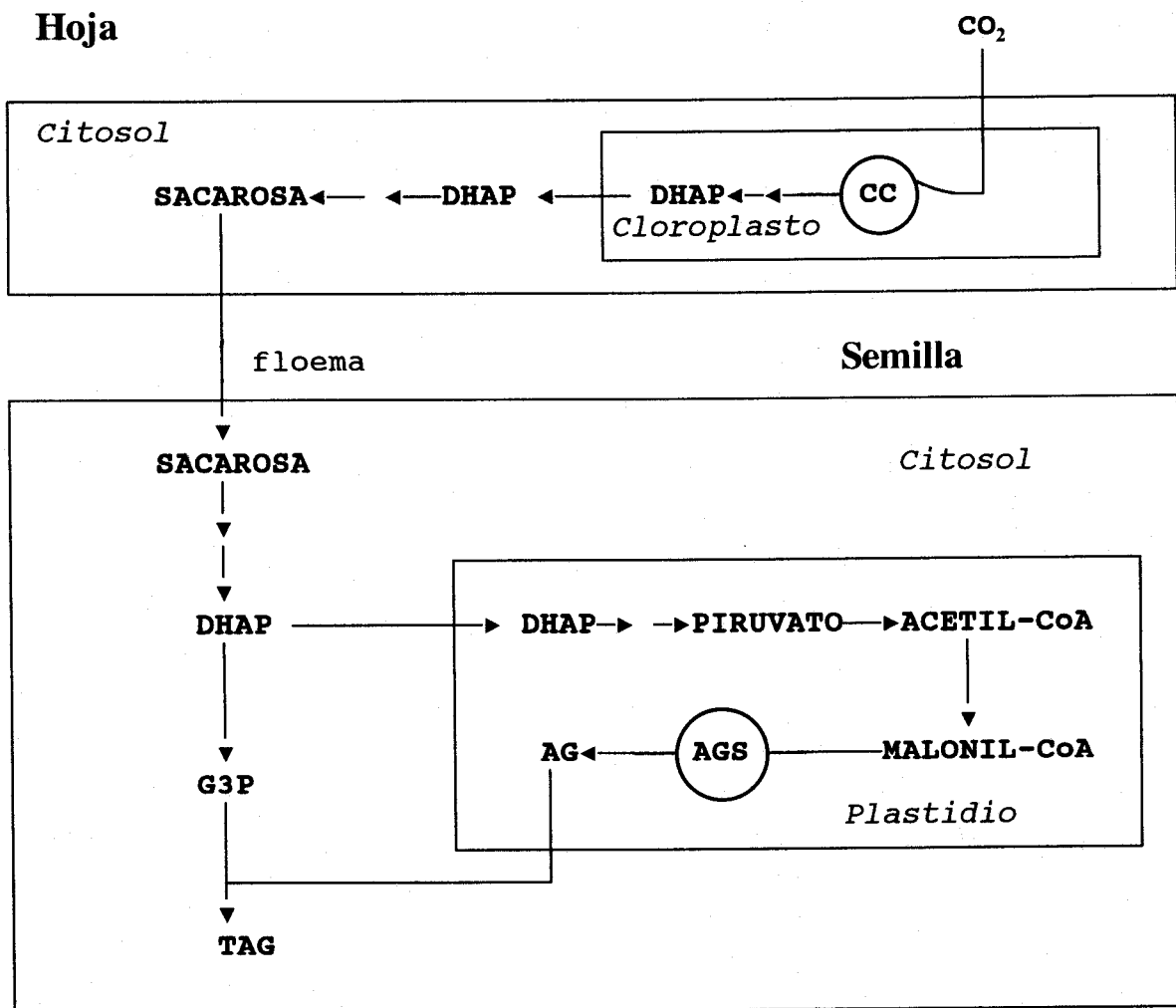


FIGURA 5. Interrelación fotosíntesis y biosíntesis lipídica en semillas. Abreviaturas usadas: AG, ácidos grasos; AGS, ácido graso sintasa; CC, ciclo de Calvin; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; G3P, glicerol-3-fosfato; TAG, triacilglicerol.

1.3.1 Semillas

Durante su desarrollo las semillas actúan como sumideros intensos, en competencia con otros órganos, importando fotosintatos de la hoja que utiliza para la síntesis y acumulación de sustancias de reserva, destinadas a nutrir al embrión durante las primeras etapas de la germinación.

En las semillas oleaginosas en desarrollo, la sacarosa importada suministra tanto energía metabólica como esqueletos carbonados para la síntesis de triacilgliceroles de reserva (Fig. 5). A tal fin, la sacarosa ha de ser desdoblada en sus monosacáridos constituyentes, que son posteriormente catabolizados a través de la ruta glucolítica. Como se discutió anteriormente, dos intermediarios de la glucolisis, fosfato de dihidroxiacetona y piruvato, generan los sustratos primarios para la biosíntesis de triacilgliceroles, glicerol-3-fosfato y acetil-CoA. Así pues, la formación de triacilgliceroles de reserva en semillas oleaginosas es absolutamente dependiente del insumo de fotosintatos generados en las hojas.

1.3.2 Frutos

A diferencia de las semillas, los frutos en desarrollo poseen cloroplastos de estructura similar a los de las hojas, de ahí el color verde que exhiben durante gran parte de su desarrollo, y son capaces de captar la energía necesaria para realizar la fotosíntesis. Esta capacidad fue reconocida hace más de 30 años cuando se

demostró que las naranjas inmaduras separadas del árbol fijaban $^{14}\text{CO}_2$ en una serie de carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos (Bean y Todd, 1960), y que tal actividad era dependiente de la luz. Además, se observó que en los frutos incubados con iluminación la mayor parte de la radioactividad se incorporaba en carbohidratos, principalmente sacarosa, mientras que cuando los frutos se incubaban en la oscuridad la mayor parte del $^{14}\text{CO}_2$ se incorporaba en malato.

En base a que los frutos generalmente acumulan ácidos orgánicos, particularmente malato (Coombe, 1976), y a que presentan elevadas actividades de enzimas características del metabolismo C_4/CAM , especialmente fosfoenolpiruvato carboxilasa (Bravdo y col., 1977), se propuso que la fotosíntesis de los frutos constituía un caso especial de fotosíntesis C_4/CAM . Sin embargo, las escasas investigaciones realizadas posteriormente, han venido a poner de manifiesto diferencias tales como la carencia de anatomía "Kranz", típica de las plantas C_4 , o la ausencia de fluctuaciones de acidez, características de las plantas dotadas de metabolismo CAM, que indican que el mecanismo de fijación de CO_2 en los frutos verdes podría ser distinto del que opera en los tejidos foliares (Willmer y Johnston, 1976), proponiéndose que la fotosíntesis de frutos es un nuevo tipo de fotosíntesis (Blanke y Lenz, 1989).

De acuerdo a este nuevo concepto los frutos se comportan como órganos sumideros, importando fotosintatos de las hojas. Como se muestra en la figura 6, los fotosintatos importados son catabolizados y suministran energía al tejido

mediante respiración mitocondrial, originando CO_2 . En los frutos, debido a la impermeabilidad de la cutícula que los recubre, el CO_2 se acumula alcanzando valores que llegan a ser dos o tres órdenes de magnitud superiores a los de la concentración atmosférica. Este CO_2 , en forma de bicarbonato, puede ser fijado en el citosol de las células de los frutos en oxalacetato por acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa que, como se ha dicho, es muy abundante en el mesocarpo de los mismos. El oxalacetato es reducido a malato por la malato deshidrogenasa y se acumula en vacuolas. Todas éstas son reacciones oscuras que explican la acumulación de ácidos orgánicos en los frutos, así como la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en malato cuando los frutos son incubados en la oscuridad, como observaron Bean y Todd (1960) en los experimentos comentados anteriormente. El CO_2 fijado en malato puede ser movilizado por acción de la enzima málico, por lo que el malato constituye un almacén temporal de CO_2 . En presencia de luz, los cloroplastos del fruto pueden fijar CO_2 a través del ciclo de Calvin. Para ello utilizan tanto el CO_2 atmosférico como el resultante de la respiración mitocondrial de los fotosintatos importados de la hoja, y de esta forma contribuyen a la economía de carbono del fruto.

Así pues, los frutos verdes, y entre ellos la aceituna, ocupan una posición intermedia entre los órganos heterotróficos estrictos, como las semillas, y los órganos autotróficos genuinos, las hojas. Como consecuencia, la aceituna no es absolutamente dependiente del suministro de fotosintatos para la síntesis de sus

triacilglicerolos de reserva, sino que el CO₂ fijado en sus cloroplastos contribuye parcialmente al proceso.

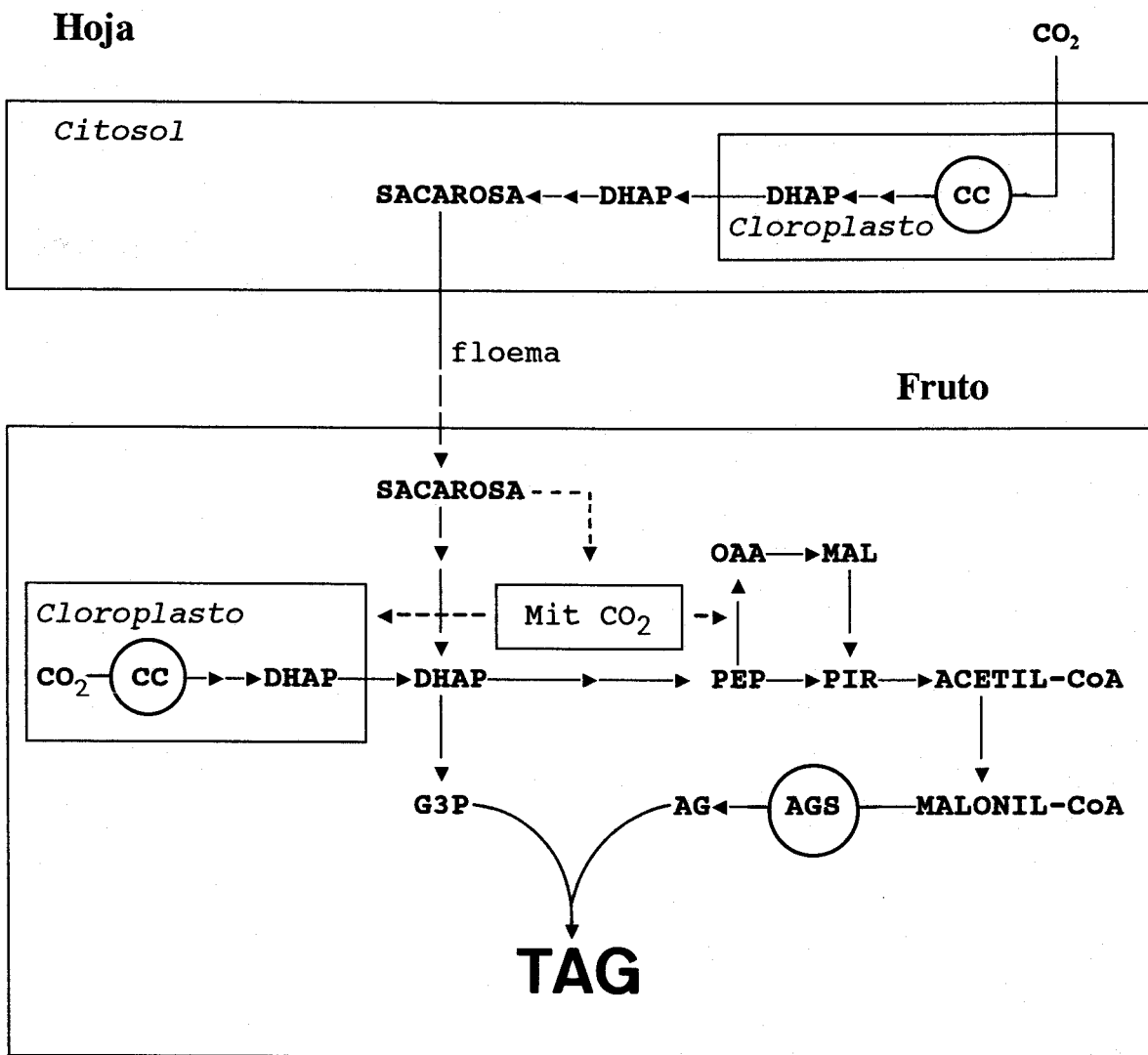


FIGURA 6. Interrelación entre fotosíntesis y biosíntesis lipídica en frutos fotosintéticos. La compartimentación no está definida en su totalidad. Abreviaturas usadas: AG, ácidos grasos; AGS, ácido graso sintasa; CC, ciclo de Calvin; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; G3P, glicerol-3-fosfato; Mal, malato; Mit, mitocondria; PEP, fosfoenolpiruvato; Pir, piruvato; OAA, oxalacetato; TAG, triacilglicerol.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se ha utilizado como material biológico pulpa de aceituna en distintos estadios de desarrollo. Los frutos se obtuvieron de unos olivos (*Olea europaea* L. var. Picual) de 20 años situados en las Plantas Experimentales del Instituto de la Grasa de Sevilla. Los árboles dispusieron de sistema de riego por goteo durante todo el período de desarrollo de las aceitunas.

2.2 PRODUCTOS EMPLEADOS

La fosfolipasa A₂ de páncreas de cerdo (en solución de sulfato amónico, de 10 mg/mL) y la lipasa de *Rhizopus arrhizus* (suspensión de 50.000 U) fueron compradas a la casa Boehringer-Mannheim (Alemania). Las resinas cambiadoras SP Sephadex C-25, QAE Sephadex A-25, y las columnas PD-10 Sephadex G-25, fueron compradas a Pharmacia (Suecia). Las placas de sílice para cromatografía en capa fina (silica gel 60A), de 0.25 mm de espesor, fueron suministradas por la casa Whatman. La sílice para la cromatografía en columna (silica gel 60) y cromatografía en capa fina (silica gel 60H) fueron compradas a la casa Merck (Alemania). El resto de los productos y reactivos utilizados se adquirieron de Sigma (EEUU).

Los precursores radioactivos [2-¹⁴C] ácido acético, sal sódica (56 Ci/mol), D-[U-¹⁴C] glucosa (246 Ci/mol), D-[U-¹⁴C] sacarosa (540 Ci/mol), [2-¹⁴C] ácido

malónico, sal sódica (27 Ci/mol), [1-¹⁴C] ácido oleico (52.9 Ci/mol), [1-¹⁴C] ácido palmítico (55.6 Ci/mol), L-[U-¹⁴C] glicerol-3-fosfato, sal amónica (171 Ci/mol) y L-[U-¹⁴C] lisina monoclóhidrato (321 Ci/mol) fueron suministrados por Amersham (Inglaterra); [¹⁴C] bicarbonato sódico (56 Ci/mol) por la casa ICN (EEUU) y el [3-¹⁴C] ácido pirúvico (21.8 Ci/mol) por NEN (EEUU).

2.3 DETERMINACIÓN DE LA EDAD DE LAS ACEITUNAS Y TOMA DE MUESTRAS

Uno de los factores que se deben tener en cuenta al estudiar el proceso de biosíntesis y acumulación de lípidos de reserva es el grado de madurez del material biológico. Para la determinación del grado de desarrollo del fruto se toma como referencia un momento característico en la fisiología de la planta que coincida con las etapas iniciales de la formación del fruto. En nuestro estudio se utilizó como referencia cronológica el momento de la floración por lo que la edad se expresó en semanas después de la floración (SDF). Se eligió un grupo de 20 olivos de donde se tomaron semanalmente muestras durante varias temporadas consecutivas. La recogida se realizó al azar y las aceitunas se tomaron del exterior y a la altura de una persona normal.

2.4 ENSAYOS CON PRECURSORES RADIOACTIVOS

2.4.1 Precursores

A excepción de los ácidos grasos, todos los precursores radioactivos utilizados son solubles en agua. Para su uso en los diferentes ensayos se tomaron de la solución acuosa original y se añadieron al medio de ensayo a las concentraciones indicadas en el apartado 2.4.3 y 2.4.4.

Los ácidos grasos marcados, por ser insolubles en agua, debieron ser convertidos en sales amónicas para su posterior utilización en los ensayos. Para ello se hizo reaccionar el ácido graso (0.1-0.2 μmol) con hidróxido amónico 2 N (250 μL) a 60°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el hidróxido amónico se eliminó bajo corriente de nitrógeno y la sal amónica, así preparada, se disolvió en tampón 10 mM Tris, pH 7.5, a la concentración apropiada (2-4 mM) (Stobart y Stymne, 1990).

2.4.2 Preparación del tejido

Las aceitunas se recogieron rutinariamente a primera hora de la mañana. De vuelta al laboratorio, los frutos se lavaron varias veces con agua corriente y finalmente con agua destilada. En las etapas iniciales del desarrollo, cuando los huesos no se encontraban lignificados, los frutos se cortaron por la mitad, de forma

transversal, con un bisturí. De los discos resultantes, se separó el tejido endocárpico, claramente distinguible, usando un taladra-tapones de diámetro apropiado; tras la lignificación del endocarpo, que se produjo unas 12 SDF, fue necesario el uso de un deshuesador para separar la pulpa del hueso. Posteriormente se procedió a cortar transversalmente la pulpa en anillos de aproximadamente 1 mm de espesor, los cuales se cortaron en pequeños trozos que fueron inmediatamente sumergidos en tampón 50 mM fosfato potásico, pH 6.0, conteniendo 0.5% ácido ascórbico. Para la separación de epicarpo y mesocarpo se utilizó, así mismo, un taladra-tapones de calibre adecuado (Fig. 7).

2.4.3 Ensayos *in vivo* de trozos de pulpa de aceituna

Los ensayos de marcaje *in vivo* se realizaron utilizando los diferentes precursores citados en el apartado 2.2 a las siguientes concentraciones: ^{14}C -acetato 1.18 mM (5 μCi), ^{14}C -bicarbonato 0.89 mM (25 μCi), ^{14}C -piruvato 0.45 mM (5 μCi), ^{14}C -sacarosa 18.4 μM (5 μCi), ^{14}C -glucosa 40.6 μM (5 μCi), ^{14}C -malonato 0.37 mM (5 μCi), ^{14}C -ácido oleico 0.075 mM (2 μCi) y ^{14}C -ácido palmítico 0.143 mM (4 μCi).

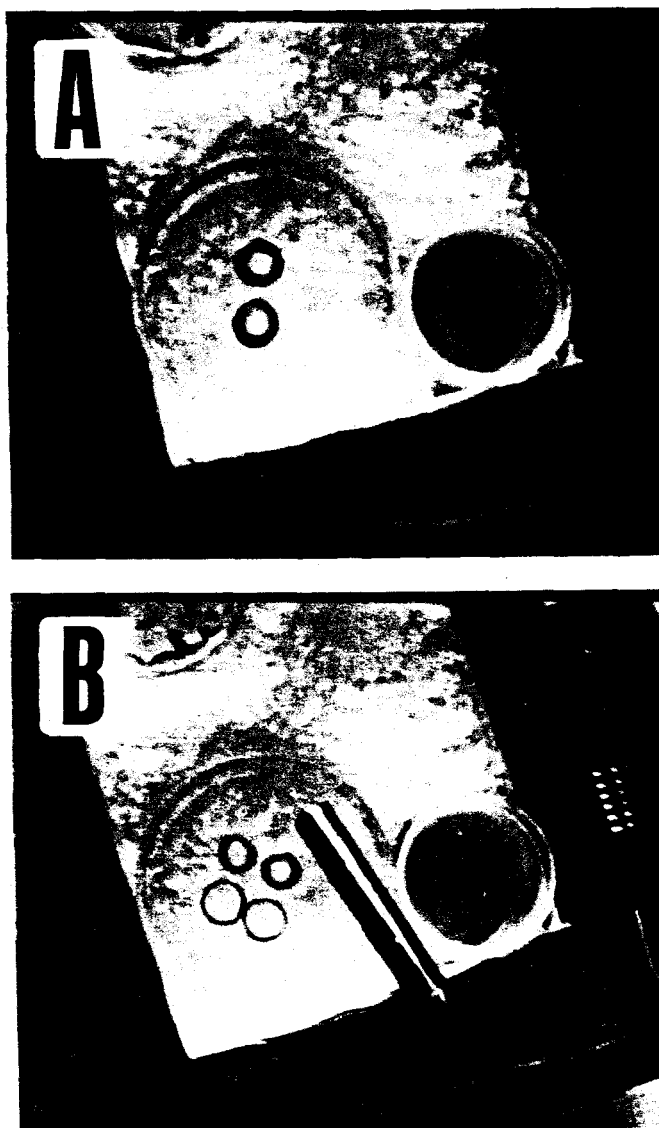


FIGURA 7. Preparación del tejido. (A) Anillos compuestos de mesocarpo y epicarpo; (B) separación de ambos tejidos.

Los ensayos se realizaron en viales de vidrio de fondo plano conteniendo 6 o 7 trozos de tejido preparados como se indicó en el apartado 2.4.2, equivalentes a 200-300 mg de peso fresco, y tomados al azar de todos los preparados, en 0.5 mL del mismo tampón fosfato, pH 6.0, citado en el apartado anterior y en presencia del precursor radioactivo. Los ensayos se realizaron por duplicado en baño de agitación a 30°C y salvo en los casos en que se indica lo contrario, durante tres horas y con iluminación (aproximadamente 10000 lux). En los ensayos con ^{14}C -bicarbonato, los viales se taparon para evitar desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$.

Al final del ensayo, el tampón de incubación, conteniendo el precursor marcado no incorporado al tejido, se eliminó por aspiración a vacío, y el tejido se lavó 3 veces con agua destilada. Seguidamente, los viales se sumergieron en nitrógeno líquido hasta que se procedió a la extracción de los lípidos del tejido, como se describe en el apartado 2.5.1.

2.4.4 Ensayos *in vivo* de aceitunas enteras

Se seleccionaron frutos de tamaño similar (entre 2 y 2.5 gramos), y se dispusieron en un disco de metacrilato taladrado distribuidos en 2 líneas concéntricas de 8 y 16 frutos. El conjunto se introdujo en un pequeño desecador de vidrio (2.5 L) dotado de un agitador magnético en el fondo del mismo y tapa de cierre hermética. Los frutos se ensayaron en presencia de $^{14}\text{CO}_2$, el cual se generó por la adición, a través de un septo, de 0.5 mL de HCl 1N a 50 μL (100 μCi) de

^{14}C -bicarbonato contenidos en un pocillo dentro del desecador. La exposición se realizó con iluminación (4000 lux), durante 18 horas.

Al final de la exposición se eliminaron los restos de $^{14}\text{CO}_2$ mediante aspiración a través de una solución concentrada de KOH y se tomaron muestras por duplicado de 6 frutos (posiciones alternativas). Después de deshuesarlos, se cortaron transversalmente por la mitad y se obtuvieron dos anillos de pulpa de aproximadamente 1 mm de espesor. Uno de ellos se utilizó para determinar la incorporación total de CO_2 radioactivo en frutos y el otro, previa separación de mesocarpo y epicarpo con un taladra-tapones de diámetro adecuado, para determinar la incorporación en ambos tejidos.

2.5 MÉTODOS

En la figura 8 se resume el procedimiento analítico seguido para la separación de las distintas fracciones acílicas e hidrosolubles.

2.5.1 Extracción de lípidos

La extracción de lípidos de pulpa de aceituna se realizó según el procedimiento descrito por Hara y Radin (1978). Este método, que utiliza una mezcla de hexano-isopropanol, presenta una serie de ventajas respecto a los clásicos, y ampliamente utilizados, basados en mezclas de cloroformo y metanol, tal como el ideado por el catalán Joaquín Folch (Folch y col., 1957).

La extracción se realizó en un homogeneizador de vidrio, tipo Potter-Elvehjem, provisto de émbolo de teflón acoplado al eje rotor de un motor eléctrico. En primer lugar el tejido se sometió a una extracción con 5 mL de una mezcla de hexano-isopropanol (3:2 v/v) que contenía un 0.01% de butilhidroxitolueno como antioxidante. El extracto obtenido se filtró a través de papel. Los restos de tejido fueron reextraídos dos veces más con 3 mL de la misma mezcla, y así mismo filtrado. Una vez reunidos los extractos, se ajustó el volumen a 10 mL con la misma mezcla de hexano-isopropanol (3:2 v/v). A continuación se añadió un volumen de una solución de sulfato amónico al 6.7% (p/v) equivalente a la mitad

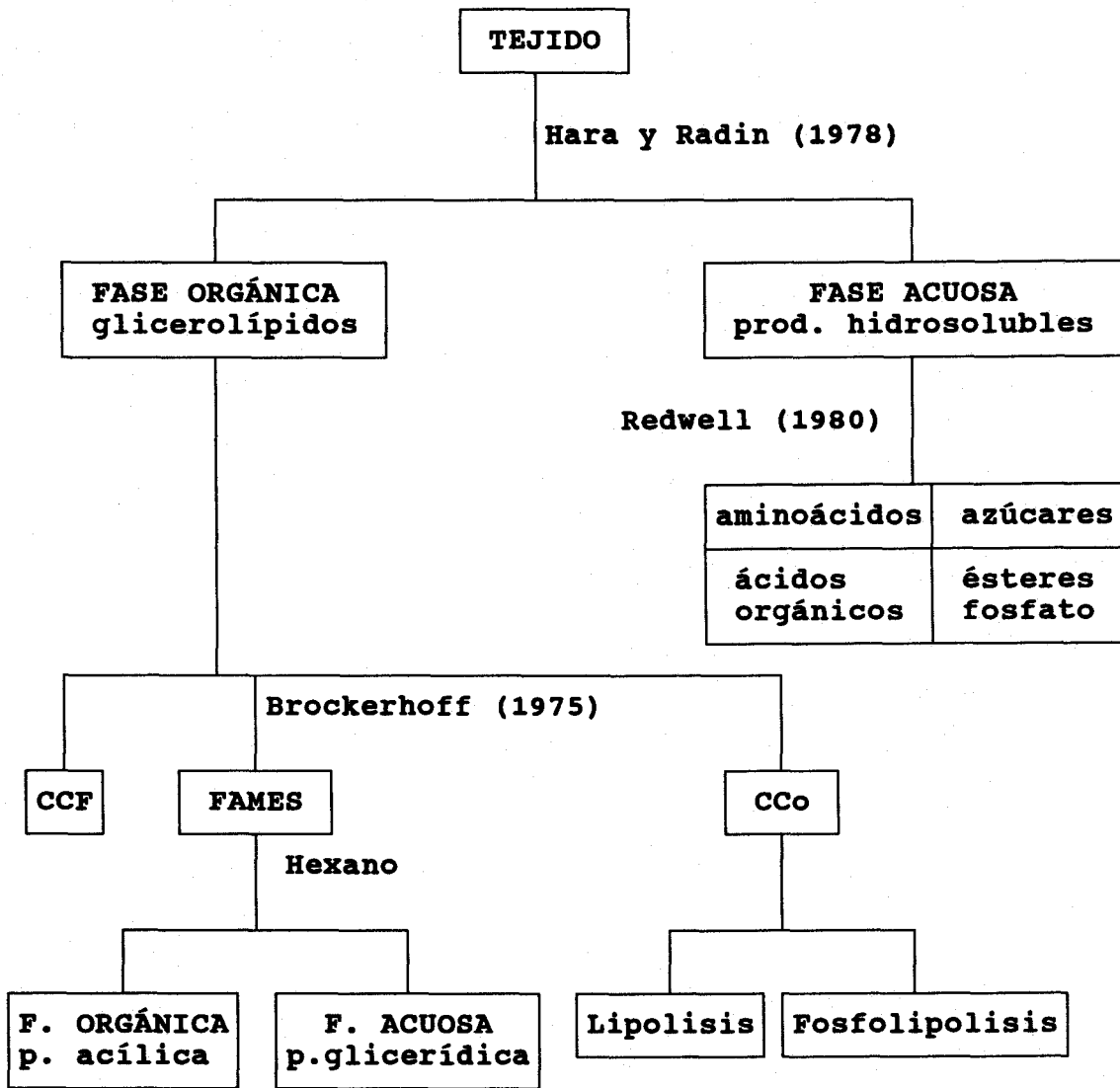


FIGURA 8. Diagrama de flujo que resume el procedimiento analítico para la separación de las distintas fracciones acílicas y polares de la aceituna. Abreviaturas usadas: CCF, cromatografía en capa fina; CCo, cromatografía en columna; FAMES, ésteres metílicos de los ácidos grasos.

del extracto obtenido (5 mL). Tras agitación y posterior reposo, las dos fases, una orgánica y otra acuosa, se separaron quedando la mitad del volumen en cada una de ellas. La fase orgánica superior, conteniendo los lípidos, se retiró con una pipeta Pasteur, procediéndose a evaporar el disolvente bajo corriente de nitrógeno; posteriormente el extracto se redisolvió en 0.2 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Se obtuvieron así los lípidos totales presentes en la muestra de origen. La capa hidroalcohólica inferior, conteniendo los componentes hidrofílicos de la muestra, se evaporó a vacío hasta desaparición de los restos de alcohol y se guardó a -20°C hasta que se procedió a su análisis según el procedimiento descrito en el apartado 2.5.3.

2.5.2 Fraccionamiento de lípidos

Para la separación de lípidos a escala preparativa se utilizó cromatografía en columna de sílice. El análisis de la incorporación de precursor radioactivo en las distintas clases de lípidos se realizó mediante cromatografía en capa fina.

2.5.2.1 Cromatografía en columna de los extractos lipídicos

Preparación de la columna. Se utilizaron columnas de vidrio de 160 x 25 mm, dotadas de placa filtrante y llave de teflón. En ellas se depositaron 5 gramos de sílice (Merck, sílica gel 60) suspendida en hexano. La suspensión se agitó suavemente con una varilla de vidrio para evitar la formación de burbujas de aire.

Tras unos minutos de reposo, la sílice sedimentó para formar un lecho uniforme de unos 5 cm. Se evacuó entonces el disolvente sobrenadante cuidando de no dejar secar el lecho de sílice.

Procedimiento. La muestra, disuelta en 2 mL de una mezcla de hexano-éter etílico (87:13 v/v), se depositó, con ayuda de una pipeta Pasteur y evitando posibles turbulencias, sobre la superficie del lecho de sílice. La elución de las distintas clases de lípidos se llevó a cabo mediante mezclas de disolventes de polaridad creciente. En primer lugar, los triacilgliceroles, menos polares, se eluyeron de la columna con 50 mL de hexano-éter etílico (87:13 v/v) y a continuación, el resto de los lípidos neutros (incluyendo diacilgliceroles) con 50 mL de una mezcla de hexano:éter etílico:ácido fórmico (50:50:1 v/v/v). Posteriormente se eluyeron los galactolípidos con 50 mL de acetona. Finalmente la fracción de lípidos más polares, incluyendo fosfolípidos, se eluyó mediante la adición sucesiva de 50 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v), 50 mL de cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v) y 50 mL de cloroformo-metanol (1:2 v/v).

Las diferentes fracciones se concentraron mediante evaporación a vacío del disolvente y se cromatografiaron sobre placas preparativas de gel de sílice (Merck, silica gel 60 H) de 0.5 mm de espesor. Para lípidos neutros se utilizó como fase móvil la mezcla hexano-éter etílico-ácido fórmico (60:40:1 v/v/v) y para los lípidos polares la mezcla cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v). Las bandas de triacilglicerol, diacilglicerol y fosfatidilcolina se identificaron por comparación con

los correspondientes patrones, se rasparon y se montaron en sus respectivas columnas de elución. Los triacilgliceroles y diacilgliceroles se eluyeron de la sílice con una mezcla de hexano-éter etílico (1:1 v/v) y la fosfatidilcolina con metanol. Los eluatos obtenidos se evaporaron en un evaporador rotatorio y redisolviéron en 0.2 mL de cloroformo.

2.5.2.2 Separación de lípidos radioactivos por cromatografía en capa fina

Generalmente no se realizó el fraccionamiento de la muestra completa, sino que se utilizó una alícuota, de volumen variable, proporcional al grado de incorporación del precursor radioactivo. Para ello, se depositaron en una placa de 0.25 mm de espesor (Whatman, silica gel 60A) alícuotas de los diferentes extractos lipídicos, y patrones de triacilglicerol, ácido oleico, diacilglicerol, monoacilglicerol, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico y fosfatidilcolina.

Las diferentes muestras se situaron en bandas de 2 cm de ancho a unos 15 mm del borde inferior de la placa. Seguidamente se cromatografiaron con dos desarrollos sucesivos en la misma dirección. El primero de ellos, con una mezcla de hexano-éter etílico-ácido fórmico (20:80:1 v/v/v/), con el que se levantaron y separaron los lípidos neutros. Cuando el disolvente recorrió unos 15 cm, se sacó la placa, se eliminó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se expuso el borde de la placa, en donde se aplicó el patrón de diacilglicerol, a la acción de los vapores de yodo. Una vez localizada y marcada la mancha de diacilglicerol, se procedió al

segundo desarrollo en el que se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol-agua (65.25:4 v/v/v), que permite separar los diferentes lípidos polares. Cuando el disolvente alcanzó la altura del patrón diacilglicerol, se sacó la placa y se secó bajo corriente de aire.

Tras la cromatografía, se puso de manifiesto el fraccionamiento de la muestra mediante un revelador no destructivo, situando la placa dentro de una cubeta cerrada con atmósfera de yodo. Éste se fija a los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de forma reversible y marca, con una peculiar tonalidad marrón, la localización de las diversas clases lipídicas a lo largo de la placa.

Los patrones aparecieron como siete bandas perfectamente diferenciadas, desde la zona superior, donde había llegado el frente del primer desarrollo, hasta el origen en que se colocó el extracto de lípidos (Fig. 9). Como se puede observar, el desplazamiento a lo largo de la placa fue inversamente proporcional a la polaridad de cada lípido.

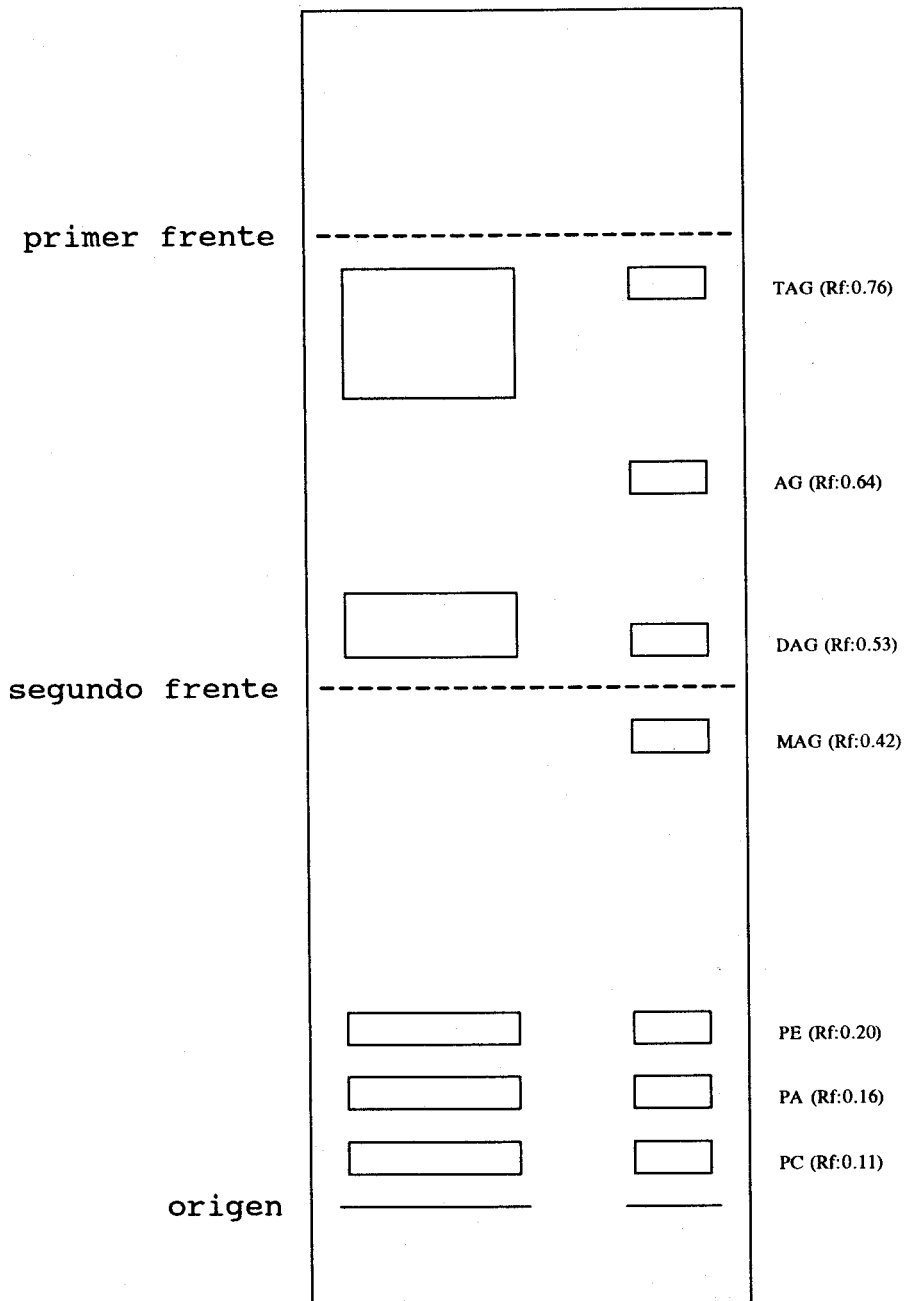


FIGURA 9. Separación por cromatografía en capa fina de los diferentes lípidos de la pulpa de aceituna. Abreviaturas: AG, ácido graso; DAG, diacilglicerol; MAG, monoacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; TAG, triacilglicerol.

2.5.3 Fraccionamiento de productos hidrosolubles

Los productos hidrosolubles formados en las incubaciones con ^{14}C -bicarbonato, y que fueron separados de los lípidos mediante el método de extracción de Hara y Radin (fase acuosa descrita en 2.5.1), se separaron por cromatografía de intercambio iónico según el método descrito por Redwell (1980), que utiliza una combinación de dos resinas cambiadoras una aniónica, QAE Sephadex A-25, y otra catiónica, SP Sephadex C-25.

Preparación de las resinas y tampón de elución. Se pesaron 10 gramos de cada una de las resinas, la aniónica (QAE) se suspendió en 500 mL de solución 0.5 M de formato sódico, y la catiónica (SP) en 500 mL de solución 0.5 M de sulfato amónico. Estas suspensiones se dejaron equilibrar durante dos días a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se procedió a filtrar ambas resinas. La resina QAE se resuspendió en formato sódico 50 mM, conteniendo 0.05% de azida sódica, y se almacenó hasta su utilización a 5°C. La resina SP fue resuspendida en ácido fórmico al 7% (v/v) varias veces en el curso de un día, y finalmente se almacenó en solución 0.5 M de sulfato amónico conteniendo 0.05% de azida sódica.

El tampón de elución se preparó a partir de 50 mL de una solución de ácido fórmico al 10 % (v/v), que se ajustó el pH a 4.0 con piridina (aproximadamente 8 mL), y se completó hasta 100 mL con agua destilada.

Preparación de las columnas. Se utilizaron jeringas hipodérmicas de vidrio de 5 mL dotadas de placas filtrantes. En ellas se depositaron cada una de las resinas suspendidas en las soluciones citadas anteriormente hasta alcanzar 5 mL de lecho. A continuación la columna catiónica (SP) se eluyó con 40 mL de una solución al 7% v/v de ácido fórmico y 20 mL de agua destilada. Simultáneamente la columna aniónica (QAE) se eluyó con 20 mL de agua destilada. Seguidamente, la columna SP se montó en serie sobre la QAE; para ello se conectaron entre si mediante un tapón de silicona, sobre el que se introdujo la aguja de la SP, y se ajustó posteriormente a la parte superior de la QAE.

Procedimiento. La muestra, conteniendo radioactividad equivalente a unas 200.000 dpm, se redisolvió en 0.5 mL de agua destilada y se depositó cuidadosamente sobre la superficie superior de la columna catiónica (SP). A continuación se realizaron dos lavados con 0,5 mL de agua destilada. La elución se continuó con 20 mL de agua destilada, recolectándose la fracción correspondiente a los azúcares. Seguidamente las columnas se desconectaron. La SP, conteniendo los aminoácidos, se eluyó con 30 mL de una solución 0.2 M de hidróxido amónico. Por su parte la QAE, conteniendo los ácidos orgánicos y los ésteres fosfatos, se eluyó en primer lugar con 30 mL de una solución al 4% v/v de ácido fórmico y se obtuvo la fracción correspondiente a los ácidos orgánicos, y finalmente con 15 mL del tampón formato/piridina obteniéndose los ésteres fosfatos.

La eficacia del procedimiento se verificó utilizando extractos no radioactivos de aceituna suplementados con patrones marcados de azúcares (^{14}C -glucosa), ácidos orgánicos (^{14}C -acetato), ésteres de fosfato (^{14}C -glicerol-3-fosfato) y aminoácido (^{14}C -lisina). Terminado el proceso, ambas columnas se regeneraron eluyéndolas con 50 mL de una solución 0.5 M de sulfato amónico en el caso de la SP, y con 50 mL de una solución 0.05 M de formato sódico en el caso de la QAE. Ambas soluciones contenían 0.05% de azida sódica.

2.5.4 Análisis posicional de ácidos grasos en glicerolípidos

La existencia de enzimas que hidrolizan específicamente los enlaces éster situados en determinadas posiciones del esqueleto del glicerol, permite el estudio de la composición de ácidos grasos de dichas posiciones y constituye una herramienta analítica de considerable valor.

Se procedió al análisis de los extractos lipídicos obtenidos de los ensayos *in vivo*, previa separación de las diferentes fracciones acílicas por cromatografía en columna, tal y como se describe en el apartado 2.5.2.1., y su posterior hidrólisis enzimática. Esto nos permitió determinar la distribución de los ácidos grasos radioactivos formados a partir de ^{14}C -acetato en las posiciones α (sn-1 y sn-3) y β (sn-2).

2.5.4.1 Estudio de las posiciones α y β en diacilglicerol y triacilglicerol.

Lipolisis.

El análisis de las posiciones α y β de los triacilglicerol y diacilglicerol, purificados se realizó según el procedimiento descrito en la Propuesta UNE 55079 (1972), utilizando lipasa de *Rhizopus arrhizus* (Boehringer-Mannheim), que libera específicamente a los restos acilos esterificados en los grupos hidroxilos primarios del glicerol. Para ello, las muestras de lípidos se colocaron en tubos Pirex dotados de tapón de rosca, a los que se añadieron sucesivamente: 2 mL de tampón 1 M Tris, pH 8 y 4 μ L o 2 μ L de lipasa (200 y 100 U respectivamente) según sea para triacilglicerol o diacilglicerol. Se agitó suavemente y se añadieron 0.2 mL de disolución acuosa de CaCl_2 al 0.1% y 0.5 mL de disolución acuosa de colato sódico al 0.1%. Se tapó y se agitó vigorosamente en un vibrador tipo Vortex durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1 mL de HCl 6 N y 2 mL de una mezcla de hexano-éter etílico (1:1 v/v); tras agitación manual, se dejó reposar hasta la separación de dos fases. La capa superior, que arrastra los diversos productos de hidrólisis, se retiró con una pipeta Pasteur y la fase inferior acuosa se lavó con otro volumen de 2 mL de hexano-éter etílico (1:1 v/v). Los extractos se reunieron y se evaporaron bajo corriente de nitrógeno, redisolviéndolos a continuación en cantidad suficiente de cloroformo-metanol (2:1 v/v).

Posteriormente, los productos de hidrólisis se separaron mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (Whatman,

silica gel 60A) utilizando como fase móvil una mezcla de hexano-éter etílico-ácido fórmico (60:40:1 v/v/v). La hidrólisis parcial de los triacilgliceroles da lugar a cuatro productos (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol y ácido graso) mientras que la de los diacilgliceroles origina sólo tres (diacilglicerol, monoacilglicerol y ácido graso). La identificación de los distintos productos se realizó por comparación con patrones.

Para su revelado la placa se roció con una solución de 8-anilinaftaleno-1-ácido sulfónico (ANSA) al 1% en etanol y con ayuda de una pequeña espátula, se rasparon las bandas correspondientes a triacilglicerol, diacilglicerol, ácidos grasos y β -monoacilglicerol. Se montaron en respectivas columnas, eluyéndose a continuación con una mezcla de hexano-éter etílico (1:1 v/v). Los eluatos obtenidos se llevaron a sequedad mediante evaporación del disolvente a vacío, y se redisolvieron en cloroformo.

Como la acción de la lipasa es específica de la posición α , la banda de ácidos grasos liberados corresponde a los que ocupaban tal posición, y la banda de β -monoacilglicerol contiene exclusivamente los ácidos grasos que ocupaban la posición sn-2 de la molécula de glicerolípido original.

2.5.4.2 Estudio de las posiciones α y β de fosfatidilcolina. Fosfolipolisis.

La muestra de fosfatidilcolina, colocada en un tubo Pirex provisto de tapón de rosca, se evaporó a sequedad añadiéndole a continuación 1 mL de éter etílico, 28 μ L de tampón 1 M Tris, pH 8, 22 μ L de disolución acuosa de CaCl_2 al 0.1% y finalmente 3 μ L (25 U) de fosfolipasa A_2 de páncreas de cerdo (Boehringer-Mannheim). Se tapó y se sometió a agitación en un Vortex durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se evaporó bajo nitrógeno el éter y seguidamente se añadieron 4 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y 1 mL de KCl al 2% (Folch y col., 1957); tras agitación manual, se centrifugó hasta separación de las dos fases. Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró la fase superior y la fase orgánica inferior, conteniendo los productos de hidrólisis, se llevó a sequedad bajo nitrógeno y se redisolvió en cantidad suficiente de cloroformo-metanol (2:1 v/v). El fraccionamiento de los productos de hidrólisis se realizó por cromatografía en capa fina utilizando el procedimiento de dos desarrollos sucesivos descritos en el apartado 2.5.2.2. Tras revelar la placa con una solución de ANSA, los productos se identificaron por comparación con patrones correspondientes de ácidos grasos, fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina.

La banda de ácidos grasos corresponde a la posición β o sn-2 de la fosfatidilcolina, pues la acción de la fosfolipasa es específica de dicha posición. La banda de lisofosfatidilcolina corresponde a los ácidos grasos esterificados en la posición α o sn-1.

Al igual que el caso anterior, las fracciones obtenidas de lisofosfatidilcolina, ácidos grasos y fosfatidilcolina se rasparon y se eluyeron en una columna con metanol. Los eluatos obtenidos se evaporaron y resuspendieron en cloroformo:metanol (2:1 v/v).

2.5.5 Transesterificación de glicerolípidos

Diferentes alícuotas de los extractos lipídicos obtenidos de los ensayos *in vivo* con bicarbonato y acetato radioactivos se metilaron según el siguiente procedimiento: se dispusieron en tubos Pyrex dotados de tapón de rosca, se les añadió una cantidad ponderada de patrón interno (ácido pentadecanoico, 15:0) y 2 mL de una solución al 2.5% de ácido sulfúrico en metanol-benceno (9:1 v/v), calentándolos a 80°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar los tubos añadiéndoles a continuación 2.5 mL de solución salina (2% KCl). Los ésteres metílicos de ácidos grasos formados en la reacción se extrajeron con hexano mientras que la parte glicerídica de las moléculas de glicerolípidos se reparte en la parte acuosa inferior (Brockerhoff, 1975). De esta forma es posible determinar la distribución de radioactividad en cada parte de la molécula.

2.5.6 Cuantificación de la radioactividad incorporada en lípidos

La determinación de radioactividad en las distintas fracciones obtenidas durante el procedimiento analítico se realizó por centelleo líquido, utilizando Ready-Safe (Beckman) como cóctel de centelleo, y un contador LKB 1215 Rackbeta II.

La detección de las bandas radioactivas correspondientes a los diferentes lípidos fraccionados por cromatografía en capa fina (apartado 2.5.2.2.), se realizó mediante autorradiografía. Las distintas bandas radioactivas, una vez localizadas y raspadas, se vertieron sobre viales de centelleo conteniendo 0.5 mL de hexano-isopropanol (3.2 v/v).

2.5.7 Determinación de actividades de las enzimas carboxilantes

Preparación del extracto enzimático. El procedimiento utilizado ha sido descrito recientemente por Sánchez y Harwood (1992). Los discos de pulpa de aceituna, obtenidos tal y como se describe en el apartado 2.4.2, se sumergieron inmediatamente en tampón 25 mM fosfato potásico, pH 6.0 que contenía 0.1% de ácido ascórbico y 6 mM de β -mercaptoetanol (β -ME). A continuación se tomaron unos 15 gramos de tejido, se lavaron dos veces con agua destilada y se trituraron en un mortero en presencia de 7.5 gramos de polivinilpolipirrolidona (PVPP), en 50 mL de tampón 50 mM HEPES, pH 7.2, 330 mM sorbitol, 2 mM

MgCl₂, 20 mM KCl, 2 mM EDTA, 10 mM metabisulfito sódico, 0.2% ácido ascórbico, 10% glicerol, 5 mM glutation, 12 mM β-ME y 2 mM DTE (los tres últimos reactivos se añadieron justo antes de su uso). El procedimiento se realizó en dos etapas: en una primera, se trituró el tejido con 25 mL de tampón de trituración y aproximadamente la mitad de PVPP filtrándose posteriormente a través de dos capas de Miracloth; en una segunda etapa, los restos de tejido se trituraron con los restantes 25 mL de tampón de trituración y el resto de PVPP, y el homogenado resultante se combinó con el primero. Todo el procedimiento se realizó entre 0-4°C en aproximadamente 5 minutos.

El extracto obtenido se centrifugó a 4.300xg, 10 minutos. La capa grasa flotante se eliminó por filtración a través de lana de vidrio sobre una capa de Miracloth. El filtrado se centrifugó nuevamente a 27.000xg, 20 minutos. El sobrenadante resultante se pasó por una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), previamente equilibrada con tampón 25 mM Hepes, pH 7.0, 330 mM sorbitol, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 10% glicerol y 6 mM β-ME (añadido justo antes de usar), y se ensayó inmediatamente.

Determinación de actividad de la Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco). La

actividad se midió según el procedimiento descrito por Wishnick y Lane (1971).

Para ello, la mezcla de reacción, 200 μL de volumen final, contenía 0.2 M tricina, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 50 mM KH¹⁴CO₃ (1 Ci/mol), 0.5 mM ribulosa 1,5-bifosfato y extracto enzimático equivalente a 25 μg de proteína. La reacción,

llevada a cabo en viales de plástico tipo Eppendorf, se inició, tras una preincubación de 10 minutos a 30°C, mediante adición de ribulosa 1,5-bifosfato (20 μ L de una solución 5 mM) y , después de 5 minutos a la misma temperatura, se detuvo por adición de 50 μ L de HCl al 50%.

Seguidamente, 100 μ L de la mezcla de reacción se depositaron sobre un disco de papel de filtro (aproximadamente 20 mm de diámetro) y se dejó secar durante 15 minutos sobre una placa calefactora a 80-100°C. La radioactividad asociada al disco se midió por centelleo líquido en 9 mL de líquido centelleador.

Determinación de actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa. La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente según el procedimiento descrito por Blanke y col. (1986). En una cubeta de cuarzo de 1 mL se mezclaron 690 μ L de un tampón compuesto de 50 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 5 mM bicarbonato sódico, 0.25 mM EDTA, 2 mM DTE, 12 mM β -ME y 20% glicerol con 50 μ L de extracto enzimático (equivalente a 25 μ g de proteína), 5 μ L de NADH 15 mM (concentración final 0.1 mM) y 3 unidades de malato deshidrogenasa bovina (Sigma). La reacción se inició mediante adición de 5 μ L de fosfoenolpiruvato 0.3 M (concentración final 2 mM). La determinación de actividad se realizó midiendo la disminución de absorvancia a 334 nm, a 30°C, en un espectrofotómetro de doble haz Sigma ZFP 22. La proteína se determinó mediante el método del colorante coomasie (Bradford, 1976).

2.5.8 Determinación de riqueza grasa. Método Soxhlet

El perfil de acumulación de grasa durante el desarrollo del fruto se determinó según siguiente procedimiento (Propuesta UNE, 55030): se pesó entre 12 y 14 gramos de pulpa de aceituna, que habían sido previamente deshuesadas, se les añadió sulfato sódico anhidro, equivalente a 10 veces la masa de pulpa, y se trituraron en un molinillo eléctrico. La pasta seca así formada se introdujo en el cartucho de papel de filtro para proceder a la extracción de grasa con hexano en un aparato Soxhlet. La grasa extraída se recogió en un matraz tarado, y su peso se determinó tras evaporar el disolvente. Los valores de riqueza grasa se expresaron en porcentaje de peso fresco.

2.5.9 Análisis de triacilgliceroles por cromatografía gaseosa

El estudio se realizó utilizando triacilgliceroles sin derivatizar (Geeraert, 1987) según el siguiente procedimiento: a 1 gramo de pulpa de aceituna se añadieron 2 gramos de sulfato sódico y 0.1 gramo de metabisulfito sódico como antioxidante. Seguidamente se realizaron dos extracciones con hexano utilizando una batidora Omni-Mixer; una primera de 5 mL durante 2 minutos, filtrándola sobre papel de filtro, y a continuación una segunda con 4 mL de disolvente procediendo de igual forma. Posteriormente, se reunieron los extractos a los que se les añadió sulfato sódico para clarificar; una vez filtrado, se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno, obteniéndose así un extracto de lípidos neutros. Éstos se

cromatografiaron en placa de gel de sílice preparativa (Merck, silica gel 60H) de 0.5 mm de espesor usando hexano-éter etílico-ácido fórmico (60:40:1 v/v/v) como fase móvil (Mangold, 1961). Tras rociar la placa con una solución de ANSA (al 1% en etanol), la banda de triacilglicerol se identificó por comparación con su correspondiente patrón. A continuación la banda se raspó y se montó en una columna eluyéndose con hexano-éter etílico (1:1 v/v). El eluato obtenido se llevó a sequedad y se pesó. Finalmente la muestra se redisolvió en hexano hasta una concentración final de 12 mg/mL.

Las diferentes muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Chrompack CP 9000 (Middelburg, Holanda) equipado con una columna capilar de sílica fundida revestida con metil-65% fenilsilicona de 0.1 μm de espesor (Quadrex, New Haven CT, EEUU) de aluminio recubierto (0.25mm diámetro x 25 m longitud), y detector de ionización de llama. Temperatura inicial del horno: 350°C, 1 minuto; programación: 0.5°C/min; temperatura final del horno: 360°C, 8 minutos.; temperatura inyector: 360°C; temperatura detector: 365°C. Como gas portador se utilizó helio a 130 kPa. La cromatografía gaseosa ofrece una alta eficiencia y rapidez en el análisis de acilgliceroles de elevada masa molecular. Los triacilgliceroles se separan según el número de carbonos y dentro de esto según el número de insaturaciones (Fig. 10). Los resultados del análisis fueron corregidos atendiendo al factor de respuesta de las distintas especies moleculares (Carelli y Cert, 1993).

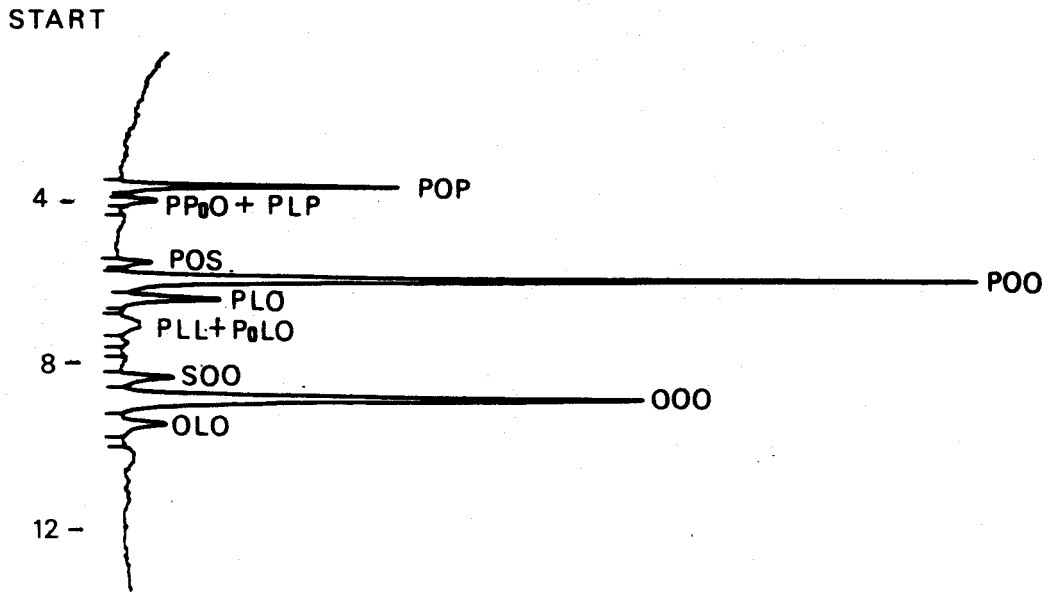


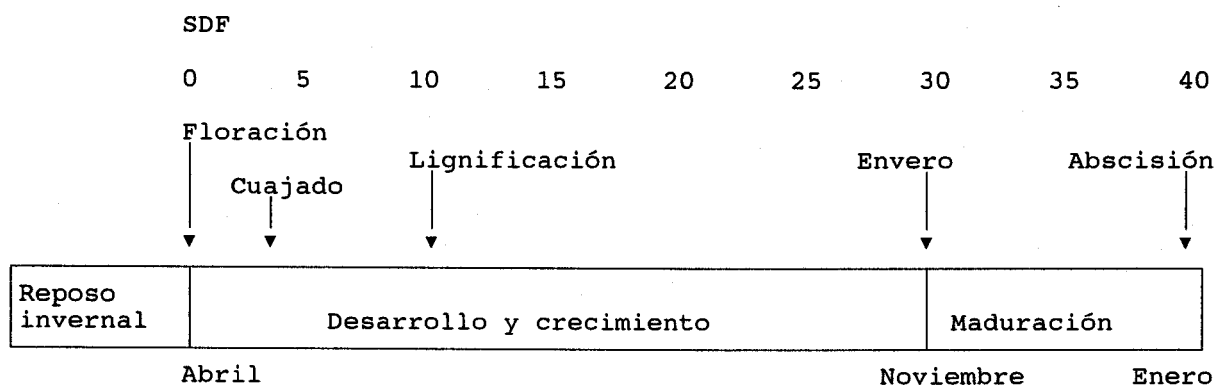
FIGURA 10. Análisis de triacilgliceroles por cromatografía gaseosa. Muestra correspondiente a frutos de 11 SDF. Abreviaturas: L, linoleato; O, oleato; P, palmitato; Po, palmitoleato; S, estearato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DESARROLLO DEL FRUTO

3.1.1 Ciclo vegetativo del olivo

El ciclo vegetativo del olivo guarda relación con las condiciones climáticas de su área de cultivo, y sigue la secuencia de acontecimientos que se resume en el siguiente esquema:



Después del reposo invernal, y tras la aparición de nuevos brotes terminales y yemas axilares, se desarrollan los primordios florales agrupados en racimos; la floración, en el área de Sevilla, tiene lugar hacia comienzo de primavera (Fig. 11a); la fecha exacta viene determinada por las temperaturas medias registradas durante el invierno. Dos o tres semanas después de la floración (SDF) se produce la fecundación del fruto (Fig. 11b). En el crecimiento de la aceituna se puede observar una serie de etapas sucesivas. Después de la fecundación y cuajado, una abundante multiplicación celular provoca un aumento rápido del tamaño del fruto. Tras la lignificación del endocarpo (endurecimiento del hueso), que ocurre entre la

10 y la 12 SDF (Fig. 11c), se inicia la síntesis y acumulación de aceite tanto en la pulpa como en la semilla, lo que resulta en un fuerte aumento del volumen de las células del mesocarpo. Este período de acumulación de grasa se extiende hasta el inicio de la maduración, caracterizado por el cambio de color que sufren las aceitunas, el envero, que tiene lugar unas 30 SDF (Fig. 11d). El período de maduración dura entre 5 y 10 semanas, en que tiene lugar un oscurecimiento del color, produciéndose al final la abscisión del fruto, si es que no ha sido recolectado previamente.

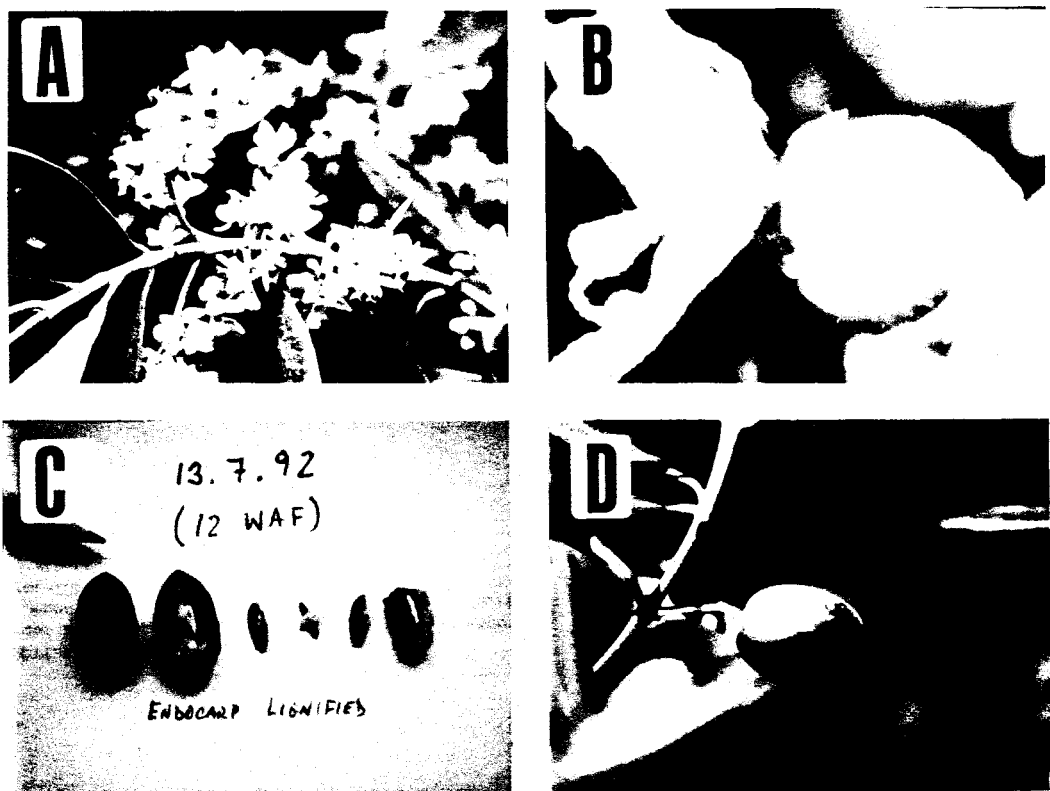


FIGURA 11. Ciclo vegetativo del olivo. (A) Floración; (B) cuajado del fruto; (C) lignificación del hueso; (D) inicio de la maduración.

En general, la maduración se realiza de forma gradual, escalonada y no ocurre de manera simultánea en el conjunto de los árboles y ni siquiera en uno solo. Se trata por tanto de un proceso lento y largo, realmente uno de los más largos de entre los frutos de interés comercial (Bollard, 1970).

El tamaño de la aceituna es un carácter variable influenciado por algunos factores ambientales (temperatura, humedad, plagas, enfermedades...) y características varietales; además se relaciona inversamente al número de frutos que se desarrollan en cada olivo, es decir, a mayor número de aceitunas por olivo el tamaño será menor y viceversa (Barone y col., 1994). En la figura 12a se representa la evolución del peso medio de la aceituna durante su desarrollo. Se observa un aumento lineal del peso medio del fruto hasta la 12 SDF. Posteriormente se estabiliza, alcanzando un valor alrededor de 3 g/aceituna, cuando el fruto inicia la maduración (30 SDF). El contenido graso, que refleja la acumulación de triacilgliceroles (TAG) de reserva en el fruto, presenta unos valores relativamente bajos hasta la 10 SDF, tanto en la semilla como en la pulpa (Fig. 12b). La lignificación del endocarpo marca el inicio de la síntesis de lípidos de reserva y su acumulación en ambos. La acumulación en la semilla es relativamente rápida y tiene lugar en aproximadamente 10 semanas. En la pulpa, por otro lado, se produce un incremento más lento que requiere unas 20 semanas hasta estabilizarse. Éste es, sin embargo, un período de intensa síntesis de TAG: una tasa de aproximadamente 40 mg aceite por fruto por semana se deriva de los datos obtenidos de la figura 12c durante el período de máxima acumulación de aceite.

Similares resultados se han obtenidos anteriormente (Vázquez y Mancha, 1970; Marzouk y Cherif, 1981). Conviene destacar que la mayor parte de la síntesis y acumulación de TAG de reserva en la aceituna se produce antes del comienzo del periodo de maduración, cuando el fruto es verde y fotosintéticamente activo.

Observando las figuras 12a y 12b, en el desarrollo de la aceituna se aprecian tres etapas bien diferenciadas. La primera corresponde a los estadios iniciales del desarrollo del fruto y en ella se produce, tal y como se ha descrito anteriormente, un rápido aumento del tamaño del fruto. En la segunda, una vez se produce la lignificación del endocarpo y el fruto ha alcanzado más de la mitad de su peso final, comienza el aumento del contenido graso en semilla y pulpa. La tercera es la etapa de maduración caracterizada por el cambio de color del fruto. Procesos semejantes ocurren en las semillas oleaginosas (Roughan y Slack, 1982).

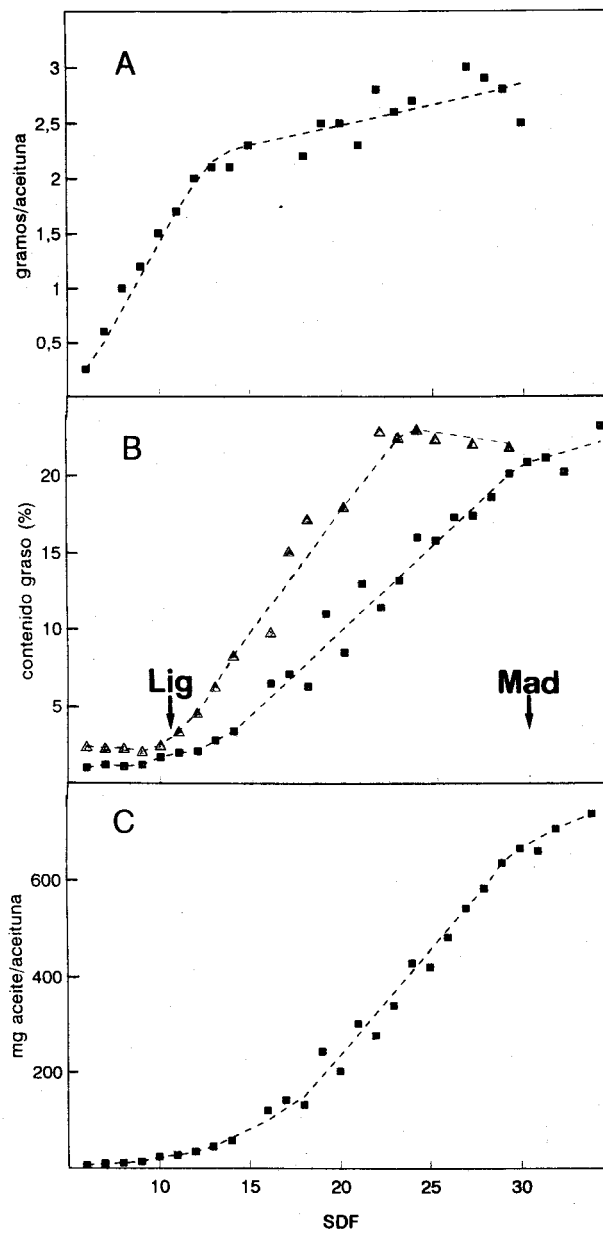


FIGURA 12. Evolución del (A) peso medio del fruto, (B) contenido graso, expresado en porcentaje, de la semilla (▲) y pulpa (■) y (C) contenido graso, expresado en mg de aceite/fruto, de la pulpa durante su desarrollo. (A) Frutos recolectados durante el año 1992; (B) y (C) Frutos recolectados durante 1993. Abreviaturas: Lig, lignificación; Mad, maduración; SDF, semanas después de la floración.

3.1.2 Variación de la composición en triacilgliceroles durante el desarrollo del fruto.

En los estudios realizados sobre transformaciones químicas de la aceituna durante su desarrollo, se ha prestado una particular atención a las variaciones de los componentes liposolubles y, dentro de ellos naturalmente, a los ácidos grasos y sus glicéridos, constituyentes mayoritarios del aceite (Vázquez y Mancha, 1970). Las grasas naturales tienen una composición específica en sus TAG. La combinación de ácidos grasos y su distribución estereoespecífica en la molécula de TAG, determina las propiedades químicas y físicas del aceite y su valor comercial (Gunstone y Norris, 1983).

La composición de ácidos grasos de los acilgliceroles viene determinada tanto por la naturaleza de los ácidos grasos disponibles como por la especificidad de las transferasas implicadas en la ruta de Kennedy (pag.18). Era de interés, por tanto, investigar las posibles variaciones en la composición de TAG a lo largo del periodo de desarrollo. Los resultados obtenidos (Fig. 13) indican que la trioleína es la especie más abundante a lo largo de todo el periodo de desarrollo de las aceitunas, seguida de la palmitildioleína. Estas dos especies moleculares son, efectivamente, las más abundantes en los aceites de oliva de distintos orígenes y variedades (Graciani, 1988). La proporción de ambas se mantuvo prácticamente constante hasta la mitad del periodo de acumulación de TAG; a partir de unas 20

SDF se observó un incremento en la proporción de trioleína a costa, fundamentalmente, de la palmitildioleína.

Estas diferencias sugieren cambios importantes ya sea en la especificidad de las transferasas participantes en la ruta de Kennedy ó en la composición de acil-CoAs disponibles como sustratos. Las aciltransferasas de microsomas de aceituna han mostrado preferencia por el oleil-CoA (Sánchez y col., 1992a), aunque las posibles variaciones de especificidad a lo largo del desarrollo de las aceitunas no han sido estudiadas. Por otra parte, el análisis de la composición acílica de los acil-CoAs de aceitunas mostró un ligero incremento en el porcentaje de oleato durante el desarrollo (Sánchez y Mancha, 1980).

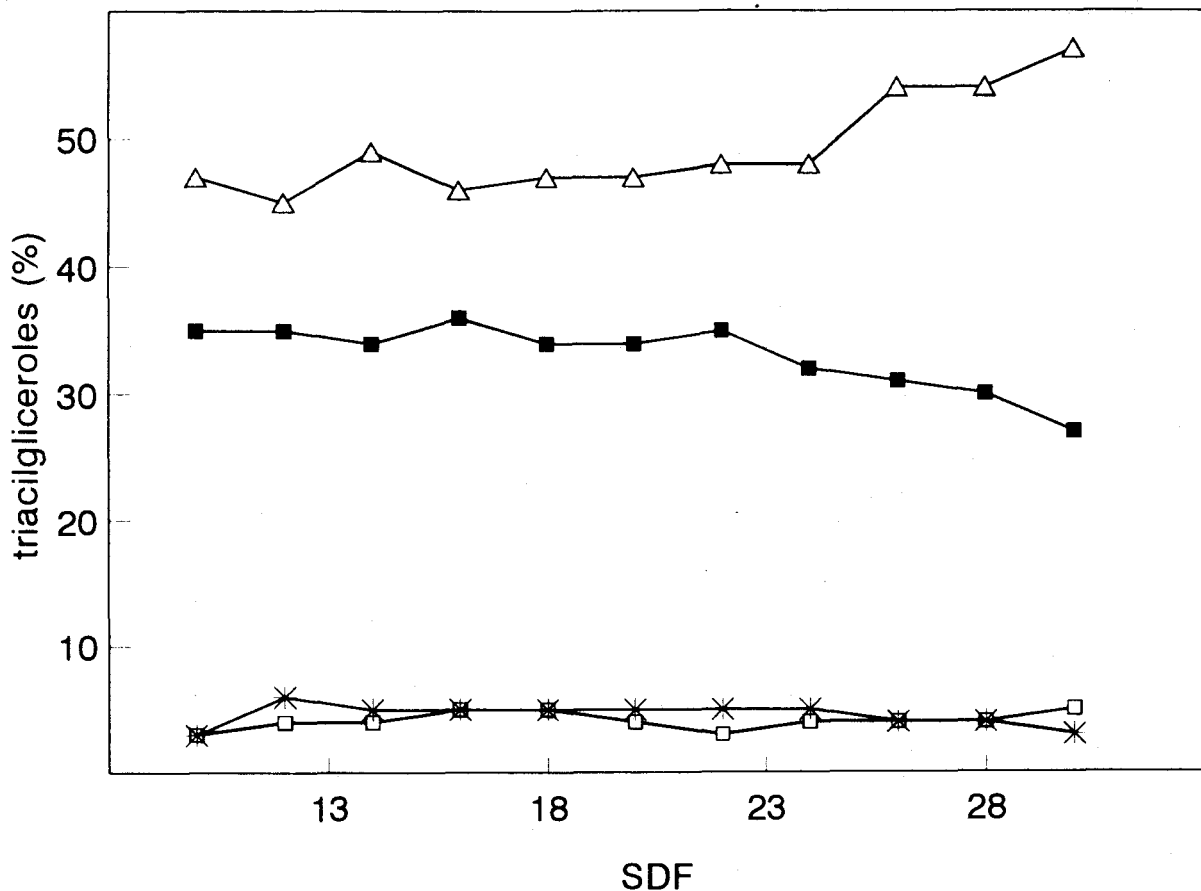


FIGURA 13. Variación de la composición en los principales triacilglicérols de la pulpa de aceituna durante su desarrollo. OOO (Δ), POO (\blacksquare), POP ($*$) y SOO (\square). Muestras recolectadas durante la temporada correspondiente al año 1991. Abreviaturas: OOO, trioleína; POO, palmitildioleína; POP, oleildipalmitina; SOO, estearildioleína; SDF, semanas después de la floración.

3.2 BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN LA PULPA. RUTA NO FOTOSINTÉTICA.

Desde los trabajos pioneros de Newcomb y Stumpf (1953), en los que realizaron incubaciones de cortes de cotiledones de cacahuete con precursores radioactivos, éstos han sido ampliamente utilizados para investigar la formación de TAG de reserva en semillas oleaginosas (Stymne y Stobart, 1987). Actualmente se dispone de un esquema bastante completo sobre su biosíntesis. En lo concerniente a frutos, se han realizados algunos estudios en palma (Oo y col, 1985) y aguacate (Gaydou y col, 1987). Sin embargo, en la literatura se encuentran escasas referencias a la biosíntesis de TAG en aceitunas, mas concretamente en la pulpa, durante su desarrollo. En este trabajo hemos abordado este tipo de estudios mediante el uso de precursores radioactivos y para ello se hizo necesaria la realización de una serie de ensayos previos que determinen las condiciones idóneas para la incorporación del precursor marcado en glicerolípidos.

3.2.1 Utilización de ^{14}C -acetato como precursor más adecuado para la síntesis de ácidos grasos

Tal y como se indicó en el apartado 1.2.2.1.1 de la Introducción, el ^{14}C -acetato sigue siendo el precursor más ampliamente utilizado en los estudios sobre metabolismo lipídico. Varias razones apoyan esto, aparte de ser químicamente

estable y relativamente barato, difunde fácilmente a los tejidos y es incorporado eficientemente en ácidos grasos.

El estudio de la incorporación *in vivo* de ^{14}C -acetato en moléculas lipídicas, específicamente en su parte acílica (Slack y col., 1978), se ha realizado en una gran variedad de tejidos de plantas. La pulpa de aceituna también sintetiza lípidos a partir de este precursor radioactivo (Donaire y López-Gorge, 1978; Marzouk y Cherif, 1984; Mancha, 1978). Sin embargo todos estos estudios fueron realizados utilizando frutos intactos, y no se investigó el efecto de los factores ambientales sobre el proceso. En el presente estudio se han utilizado cortes de pulpa de aceituna como material experimental; este sistema muestra tasas de incorporación de precursor más elevadas, y además permite modificar las condiciones de ensayo.

3.2.1.1 Efecto del pH del medio

La aceituna se caracteriza por presentar un alto contenido de polifenoles y una alta actividad polifenol oxidasa. Estudios realizados con diferentes variedades han mostrado una posible relación entre el grado de oscurecimiento y la actividad de la polifenol oxidasa (Sciancalepore y Longone, 1984). Un problema que se plantea en la realización de los ensayos *in vivo* con cortes de tejido es evitar su oscurecimiento durante el tiempo que dura la experiencia. Un medio con pH ácido y presencia de ácido ascórbico previene el oscurecimiento, siendo éste el inhibidor más efectivo conocido hasta ahora de la actividad polifenol oxidasa (Galeazzi y

Sgarbieri, 1981). Entre los ensayos previos que se deben realizar en este tipo de estudios está el que tiene por objeto estudiar el efecto del pH sobre la actividad biosintética de pulpa de aceituna. Para ello, el tejido se ensayó en tampón Hepes/Mes a diferentes valores de pH, conteniendo 50 mM de fosfato potásico y 0,5% (p/v) de ácido ascórbico.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 14. La incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos disminuyó a medida que aumentó el pH del medio de ensayo, principalmente en el intervalo comprendido entre 5.5 y 6.5. Conociendo que la constante de disociación, pKa, del ácido acético es de 4.75, estos resultados sugieren que es la especie protonada, mejor que el ion acetato, la que difunde dentro del tejido. La incorporación del precursor radioactivo en los diferentes tipos de lípidos mostró la misma tendencia, siendo los TAG los más afectados por las variaciones de pH. Este efecto puede indicar una dependencia respecto al pH de la enzima diacilglicerol aciltransferasa, responsable de la formación de TAG a partir de diacilglicerol (DAG), en línea con los resultados obtenidos, para diferentes tejidos, por otros autores (Martin y Wilson, 1983; Cao y Huang, 1986; Weselake y col., 1991). A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó el tampón fosfato, a pH 6.0, para la realización de los ensayos subsiguientes. A dicho valor de pH, que es moderado desde el punto de vista fisiológico, el fosfato ofrece buena capacidad tampón y permite una elevada incorporación del precursor ^{14}C -acetato en glicerolípidos.

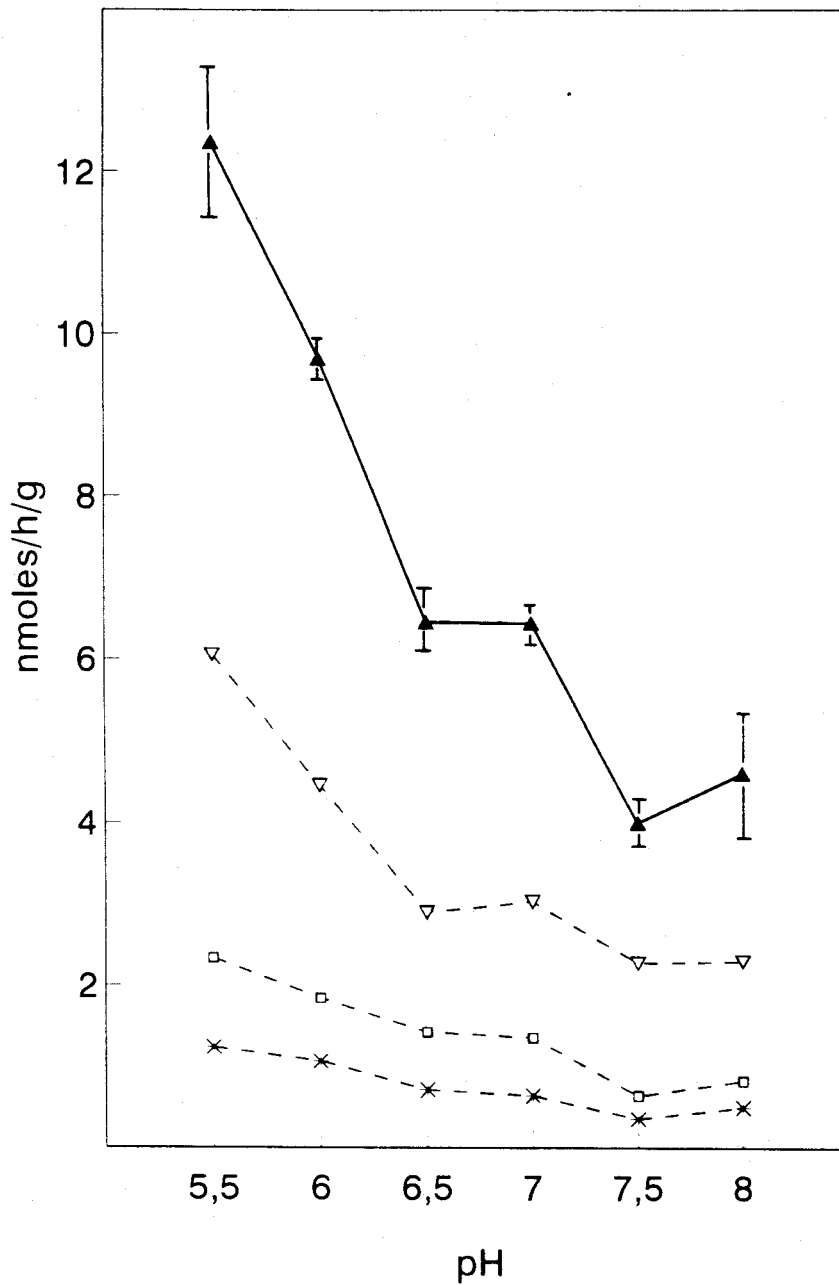


FIGURA 14. Efecto del pH sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos (▲) y , en TAG (▽), DAG (*) y PC (□) de la pulpa de aceituna. Frutos recolectados la 12 SDF. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco).

3.2.1.2 Curva de concentración de precursor

En este tipo de experimentos las distintas concentraciones de acetato en el medio de incubación se ajustaron añadiendo acetato no marcado (sal potásica) a una cantidad fija de ^{14}C -acetato (equivalente a $5 \mu\text{Ci}$) presente en cada tratamiento; así pues, el diseño del experimento implica una disminución progresiva de la radioactividad específica del precursor por dilución con cantidades crecientes de acetato no marcado.

Como se muestra en la figura 15 el aumento de la concentración de acetato en el medio estimuló la síntesis de glicerolípidos siguiendo una curva de saturación hiperbólica. Interesa recalcar que el aumento de incorporación en glicerolípidos es aproximadamente lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 0.1 y 1.0 mM; esto significa que la incorporación neta de radioactividad en glicerolípidos no se ve afectada en gran medida al diluir en 10 veces la radioactividad el precursor marcado. Es por ello que se seleccionó una concentración 1.18 mM de acetato en la puesta a punto del ensayo estándar. Por otra parte, no se observaron diferencias notables en los porcentajes de radioactividad asociados a las distintas fracciones lipídicas.

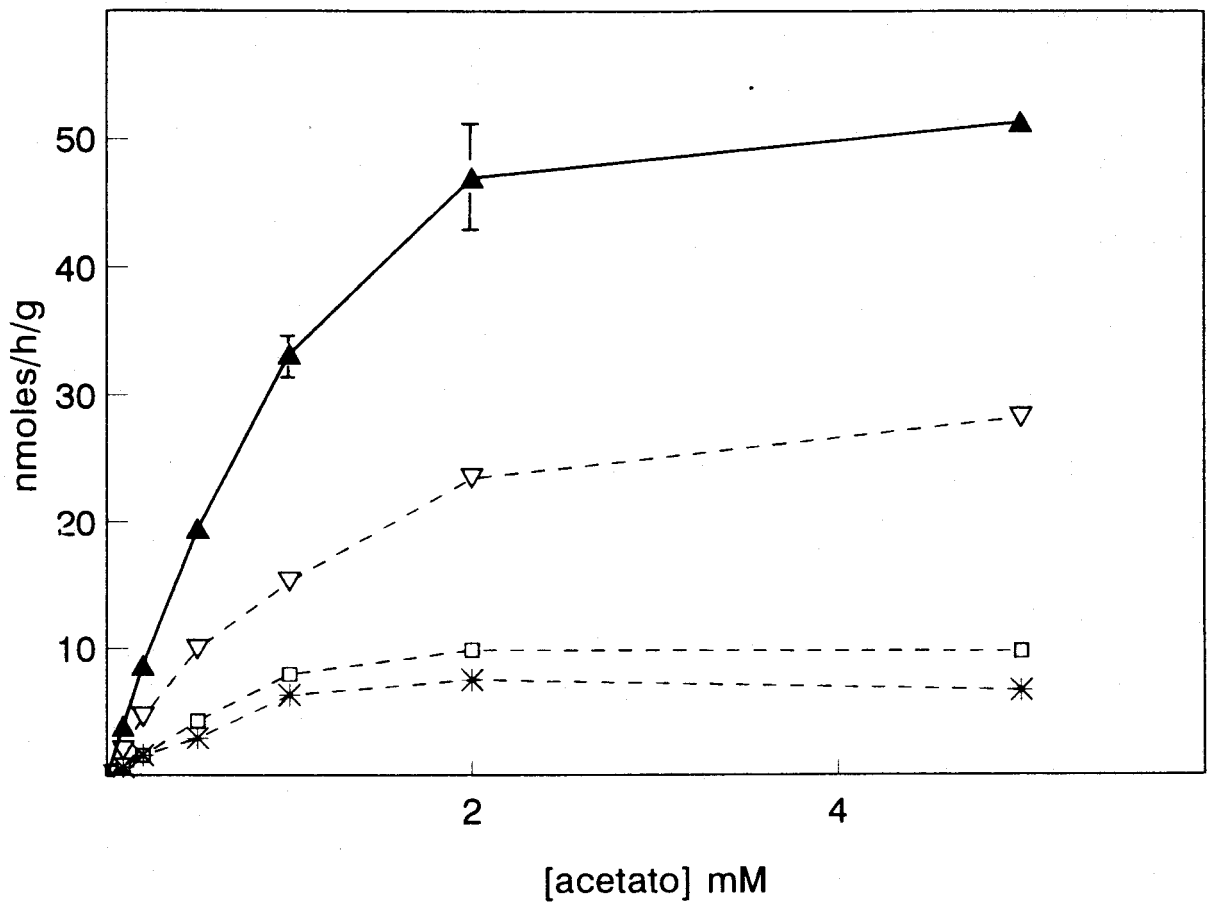


FIGURA 15. Efecto de la concentración de acetato sobre la incorporación en glicerolípidos (▲), TAG (▽), DAG (*) y PC (□) de la pulpa de aceituna. Frutos recolectados la 20 SDF. Incorporación expresada en nmoles ¹⁴C-acetato/h/g tejido (peso fresco).

3.2.1.3 Efecto del tiempo de incubación

Cuando un tejido biológico, o una fracción subcelular, se somete a un ensayo se produce un deterioro de sus actividades enzimáticas en el curso del mismo. Por ello, en experimentos de marcaje isotópico es preciso determinar como varía la incorporación de precursor en el curso del tiempo de incubación. Esto es

particularmente importante para un tejido como la pulpa de aceituna que pasa por diversas etapas en el curso de su dilatado periodo de desarrollo.

Utilizando frutos relativamente jóvenes, colectados en los comienzos del periodo de acumulación de TAG (17 SDF), se observó que la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos mostraba una cinética lineal durante un periodo de incubación de al menos 7 horas (Fig. 16a). En cambio, cuando se utilizaron frutos relativamente maduros, colectados hacia el final del periodo de máxima acumulación de TAG (28 SDF), se observó una cinética no lineal (Fig. 16b), lo que probablemente se relaciona con una relativa inestabilidad del tejido maduro en comparación con el joven. Una conducta similar se observó al comparar la cinética de incorporación de ^{14}C -acetato en cloroplastos aislados de hojas de espinaca jóvenes y maduras (Sánchez y Mancha, 1981). En base a los resultados mostrados en la figura 19a se eligió un tiempo de incubación de 3 horas para el ensayo estándar.

La distribución de radioactividad entre las distintas clases de lípidos no resultó sustancialmente alterada por la edad del tejido utilizado: en ambos casos TAG resultó ser el principal producto a cualquier tiempo de incubación, y la proporción de radioactividad asociada a esta fracción se vio incrementada en el transcurso de la incubación, como corresponde a un tejido especializado durante el periodo de acumulación de TAG de reserva.

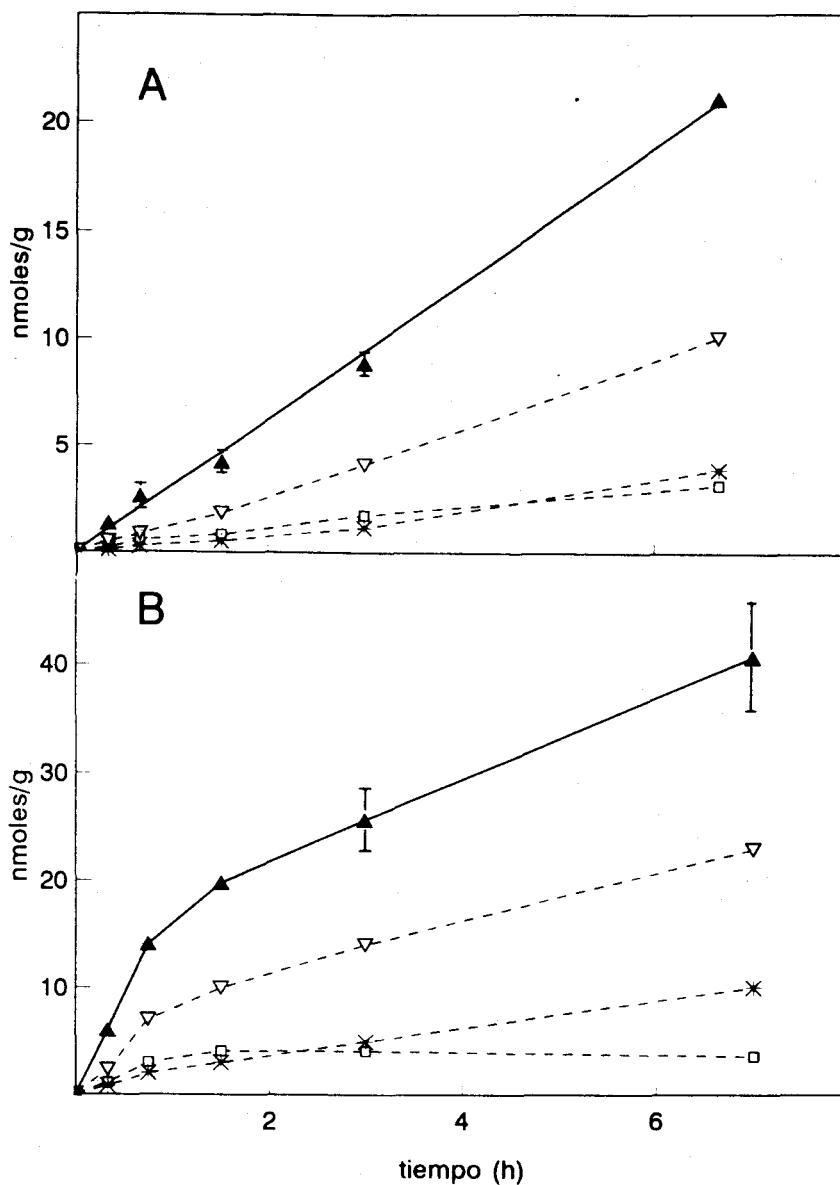


FIGURA 16. Incorporación de ^{14}C -acetato a distintos tiempos de ensayo en glicerolípidos de la pulpa de aceituna. (A) Frutos recolectados la 17 SDF, (B) frutos recolectados la 28 SDF. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco). Glicerolípidos (▲), TAG (▽), DAG (*), PC (□).

Experimentos de este tipo son útiles para establecer relaciones entre los intermediarios de una ruta metabólica. Como se describió en el apartado 1.2.3 la ruta de biosíntesis de glicerolípidos incluye ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico y DAG como intermediarios. Los porcentajes de radioactividad en ácido

lisofosfatídico y ácido fosfatídico fueron relativamente bajos incluso al principio de la incubación (resultados no incluidos), mientras que se observó un aumento constante en la radioactividad asociada a DAG en el curso del ensayo, lo que sugiere, como han indicado otros autores (Griffiths y col., 1988; Rutter y col., 1992), que la última reacción de acilación, catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa, es la etapa limitante en la biosíntesis de TAG.

En preparaciones microsómicas de cotiledones de semillas (Stymne y Stobart, 1984, 1985; Stobart y Stymne, 1985b) se ha puesto de manifiesto la formación de fosfatidilcolina (PC) a partir de DAG por la enzima CDPcolina:1,2 diacilglicerol colina fosfotransferasa, así como que la enzima puede operar de forma reversible (Slack y col., 1985). Nuestros resultados muestran que la PC actúa como intermediario de rutas metabólicas, acumulándose notoriamente al principio para luego disminuir paulatinamente su concentración.

3.2.1.4 Efecto de la luz y temperatura

Los árboles y consecuentemente sus frutos, están expuestos a cambios ambientales de luz y temperatura que condicionan su desarrollo fisiológico. En frutos fotosintéticos, como es el caso de la aceituna, la síntesis de TAG de reserva puede tener lugar a partir de los precursores sintetizados *in situ* o a partir de aquellos que provienen de la hoja y llegan al fruto vía floema. Como quiera que la fotosíntesis del fruto podría contribuir significativamente a la formación de TAG de reserva en el mismo, era de interés investigar el efecto de la luz sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos.

En todos los experimentos realizados a lo largo del desarrollo del fruto, la luz mostró un efecto estimulador sobre la incorporación total de ^{14}C -acetato en los glicerolípidos de la pulpa de aceituna (Fig. 17). Los porcentajes máximos de estimulación se produjeron durante el mes de agosto, que alcanzó el 240 % en la 18 SDF. Así mismo, se observó una alta estimulación de la luz en las etapas iniciales del proceso, posiblemente relacionado con el elevado contenido clorofílico que presenta el epicarpo del fruto en esa etapa del desarrollo. En las etapas finales, coincidiendo con el cambio de color (envero) de las aceitunas, la estimulación por la luz disminuyó considerablemente; todo ello puede ser debido a la degradación que se produce durante la maduración del fruto de las membranas cloroplásticas (Donaire y col., 1984), así como de ciertos polipéptidos implicados en el proceso

fotosintético (Piechulla y col., 1987), lo que se traduce en una disminución de la capacidad fotosintética del fruto.

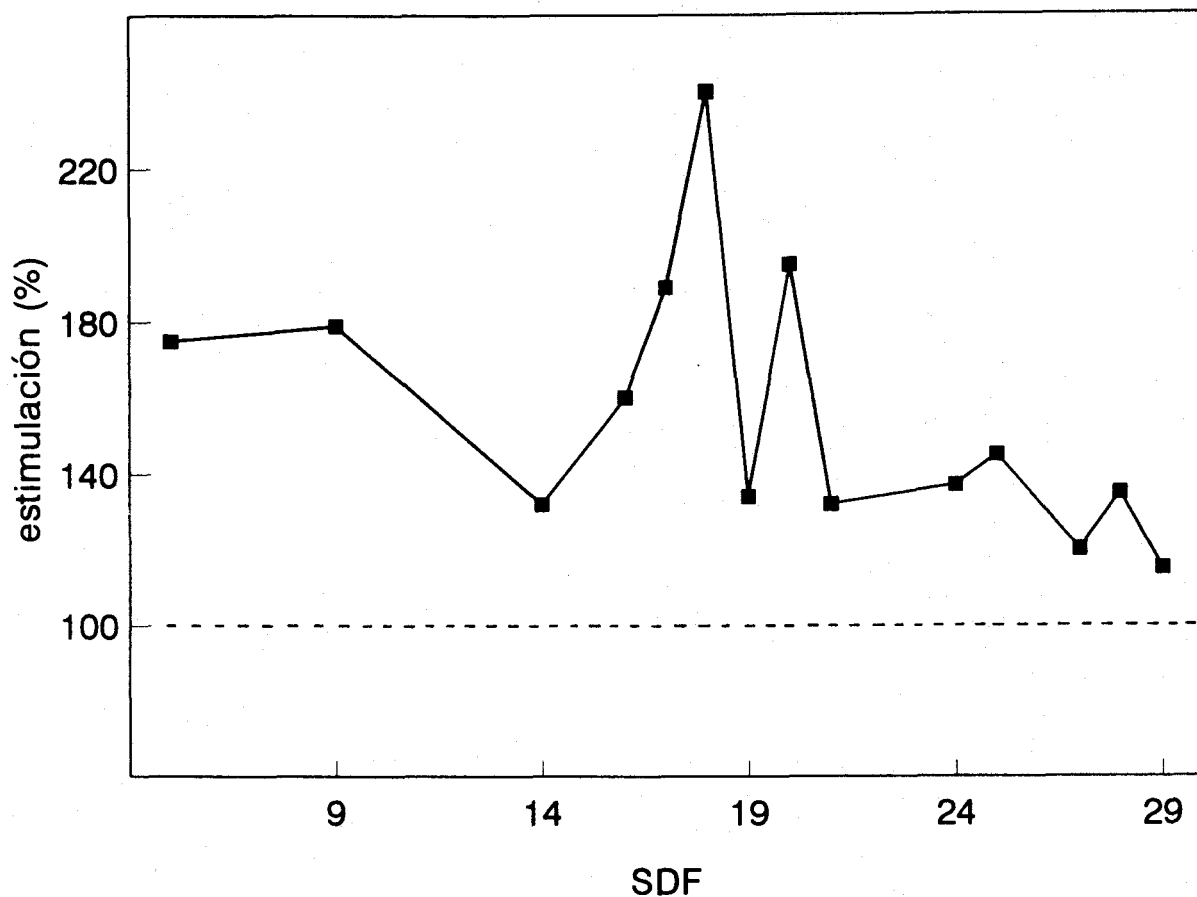


FIGURA 17. Estimulación de la luz sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos de pulpa de aceituna durante el desarrollo del fruto.

Estudios previos realizados con semillas oleaginosas muestran que la biosíntesis *in vivo* de TAG a partir de precursores radioactivos puede afectarse, cualitativa y cuantitativamente, por fluctuaciones de temperatura (Roughan y Slack, 1982; Ichihara y Noda, 1982). En nuestras experiencias se apreciaron claras diferencias en la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos cuando la pulpa de aceituna se ensayó a diferentes temperaturas, en condiciones de luz y oscuridad

(Fig. 18a). La observación más inmediata de los resultados nos muestra que la incorporación de precursor en glicerolípidos resultó ser superior en la luz que en la oscuridad, para todo el rango de temperaturas ensayadas, lo que ratifica el carácter fotosintético del proceso. El máximo de incorporación se obtuvo a 30°C con iluminación. Los resultados del análisis de los lípidos formados se muestran en la figura 18b. En línea con los resultados discutidos en los apartados precedentes, TAG y DAG resultaron ser los principales productos de incubación. Es de destacar el brusco descenso en la proporción de radioactividad asociada a TAG que se observa a temperaturas superiores a 40°C, tanto en la luz como en oscuridad, lo que sugiere que la actividad DAG aciltransferasa es especialmente sensible a la temperatura, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores en otras especies (Martin y Wilson, 1983; Weselake y col., 1991).

Estos resultados demuestran que la aceituna es capaz de sintetizar TAG tanto en presencia de luz como en la oscuridad. La energía química necesaria para la síntesis de ácidos grasos en la oscuridad la suministraría la oxidación mitocondrial de fotosintatos importados de la hoja, o sintetizados en el fruto durante el periodo de iluminación. En este punto cabe preguntarse acerca de la proporción de TAG que son formados durante los periodos de luz y oscuridad a los que está sometida la aceituna durante su desarrollo. De lo discutido hasta ahora acerca del efecto estimulador de la luz, todo indicaría que la formación de TAG en la aceituna tiene lugar principalmente durante el día. Sin embargo, un examen más detenido de los resultados de la figura 18B indican que la respuesta a la cuestión

está condicionada por la temperatura. Así, puede comprobarse que en las condiciones del ensayo la síntesis de TAG en la oscuridad es más elevada a 20°C que en la luz a 48°C, y estas temperaturas son comunes durante la noche y el día, respectivamente, en el área geográfica en la que prospera el olivo.

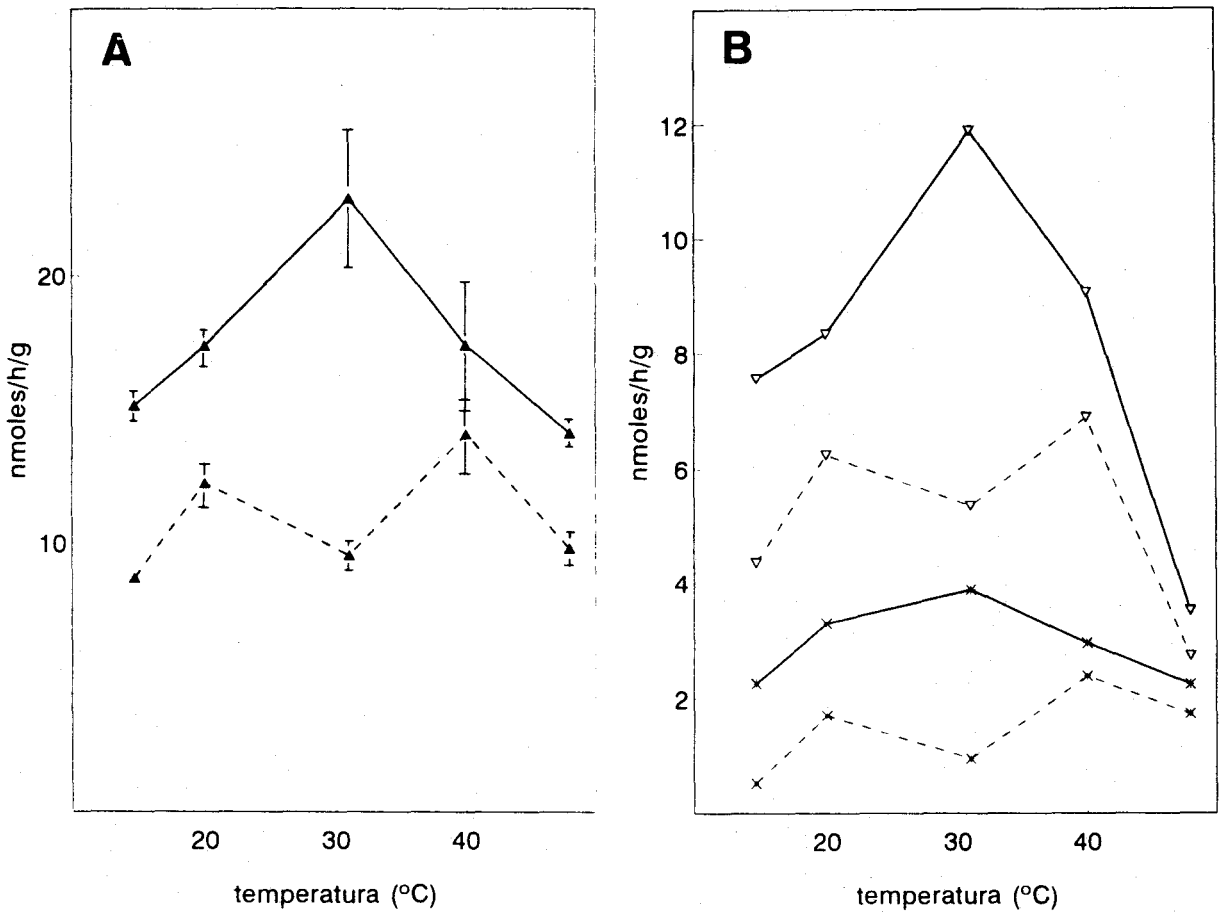


FIGURA 18. Efecto de la temperatura sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en (A) glicerolípidos y (B) TAG (∇) y DAG ($*$) de pulpa de aceituna, en la luz (—) y oscuridad (---). Frutos recolectados la 18 SDF. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco).

3.2.2 Perfil de actividad biosintética durante el desarrollo

La biosíntesis lipídica es un proceso condicionado al desarrollo de la planta. La variación de las condiciones externas (humedad, nutrientes, luz, temperatura...) o internas (edad) deben influir en el desarrollo del proceso. Es por ello de interés estudiar la evolución de la capacidad de síntesis de lípidos a medida que avanza la formación de la aceituna. Así, podremos conocer en qué momento del desarrollo del fruto se produce un incremento de la actividad de las enzimas implicados en la biosíntesis de TAG. Un dato de interés cuando se trata de escoger el material idóneo para el estudio de dichas enzimas.

En la figura 19 se muestra la evolución de la capacidad de síntesis de lípidos, en pulpa de aceituna en desarrollo, expresada como incorporación de ^{14}C -acetato, cuando se ensaya en las condiciones establecidas anteriormente, es decir, a pH 6.0, con una concentración de acetato 1.18 mM, en la luz y a 30°C. Los resultados obtenidos en dos campañas de seguimiento consecutivas muestran que la actividad biosintética de glicerolípidos en pulpa de aceituna discurrió durante en período de tiempo no inferior a 20 semanas, esencialmente durante el período comprendido entre la 10 y la 30 SDF. Un proceso similar se ha descrito para el aguacate (Gaydou y col., 1987). Se trata en ambos casos de procesos lentos si se comparan con el que tiene lugar en semillas oleaginosas (Ichihara y Noda, 1980; Slack y Browse, 1984) que se produce en pocos días.

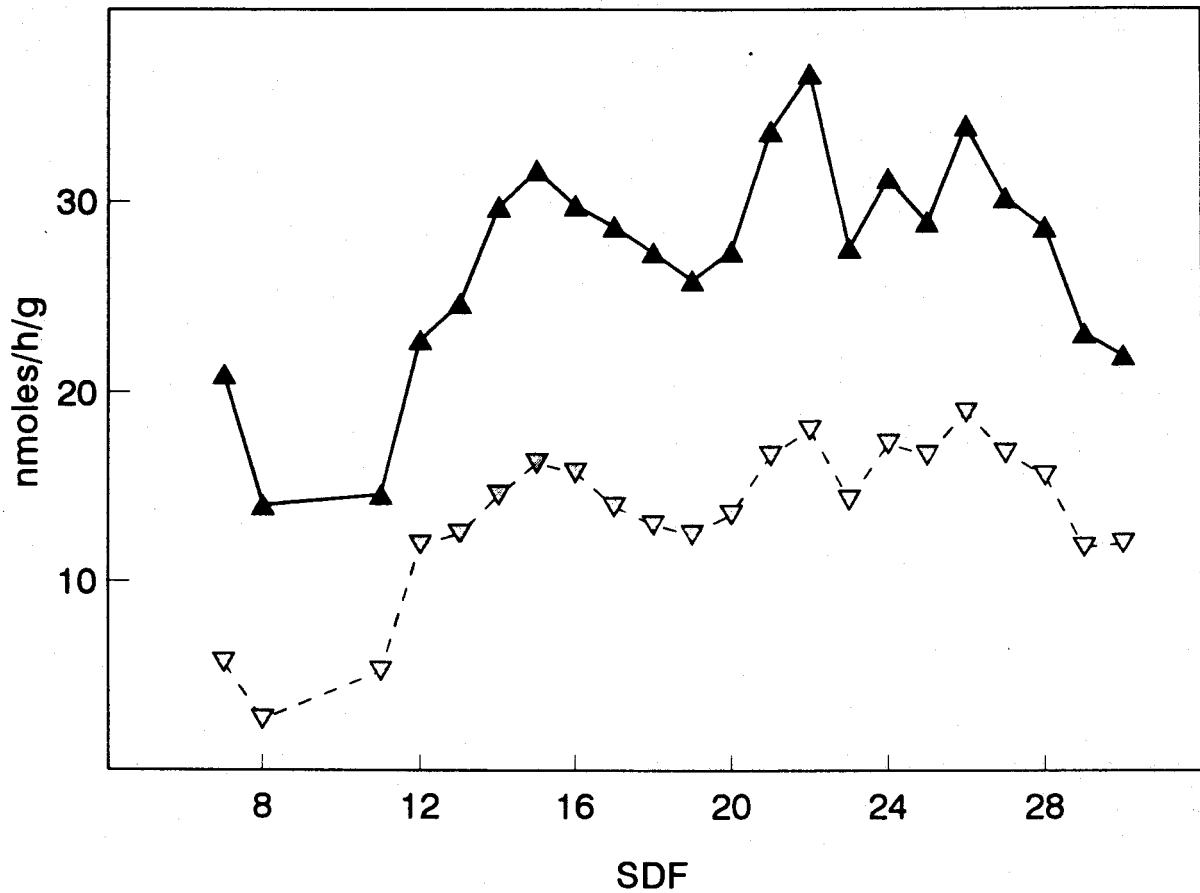


FIGURA 19. Perfil de incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos (▲) y TAG (▽) de pulpa de aceituna a lo largo de su desarrollo. Los datos reseñados son medias de dos campañas consecutivas de seguimiento de la actividad. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco).

Entre la 5 y la 10 SDF se produjo una alta incorporación del precursor radioactivo en lípidos totales (Fig. 19). Según Donaire y López-Gorge (1978) este hecho se explica por el elevado contenido clorofílico que presenta la aceituna al principio de su desarrollo. En esta etapa, la pulpa de aceituna se encuentra constituida fundamentalmente de epicarpo, tejido altamente activo en la síntesis de glicerolípidos tal y como se mostrará posteriormente. A partir de la 10 SDF, y

coincidiendo con la lignificación del endocarpo, se observa un incremento en la incorporación de ^{14}C -acetato, que se mantiene elevada a lo largo de todo el periodo de acumulación de TAG, y declina con el inicio de la maduración, unas 30 SDF.

La incorporación de radioactividad en TAG y PC a partir de un precursor radioactivo es un indicador del reparto de ácidos grasos entre lípidos de reserva y de membrana. Todavía se desconoce el mecanismo preciso responsable de la partición de ácidos grasos entre lípidos polares y TAG (Browse y Somerville, 1991). En la figura 20 se representa la incorporación relativa del precursor en TAG y PC de la pulpa de aceituna durante el desarrollo del fruto y correspondiente a las dos campañas de seguimiento citadas anteriormente. Se observa una notable modificación de la naturaleza de los lípidos sintetizados a expensas del acetato. En las etapas iniciales del desarrollo, la incorporación se produjo principalmente en PC, lo cual indica que en estas etapas tempranas del desarrollo de la aceituna predomina la biogénesis de membranas celulares. Sin embargo, a partir de la 10 SDF, coincidiendo nuevamente con la lignificación del endocarpo, se inició un aumento progresivo de incorporación en lípidos neutros, principalmente TAG, que alcanzó hasta un 61 % de la incorporación total en las etapas finales (25 SDF). Estos resultados confirman y extienden los obtenidos por Marzouk y Cherif (1981, 1984) y Mancha (1978). Entre la 25 y la 30 SDF (semanas previas al inicio de la maduración) se observó un ligero descenso en el porcentaje de incorporación en ambas fracciones, en paralelo con un aumento en la proporción de otros lípidos polares (resultados no mostrados).

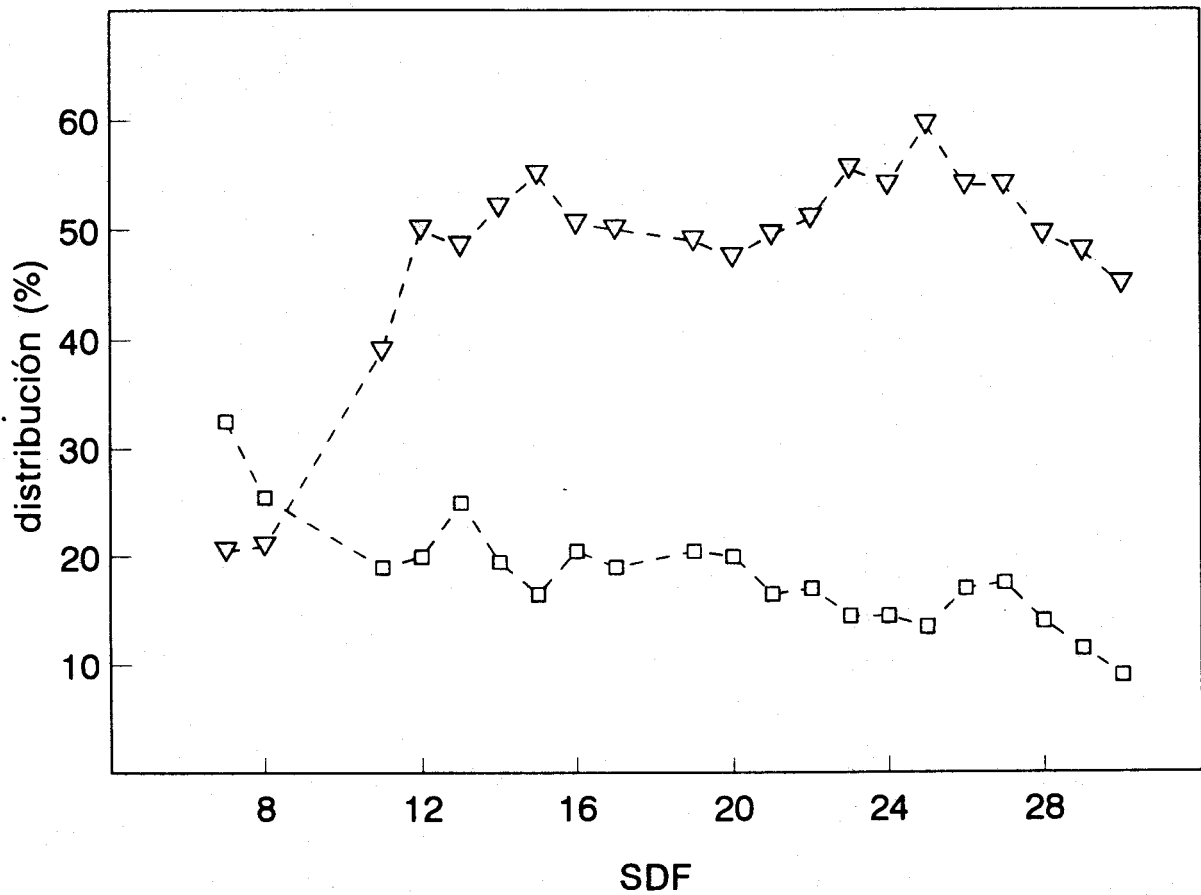


FIGURA 20. Incorporación relativa de ^{14}C -acetato en TAG (∇) y PC (\square) de pulpa de aceituna durante su desarrollo. Los datos reseñados son medias de dos campañas consecutivas de seguimiento de la actividad.

Aunque en menor grado, también se observó incorporación en otros lípidos polares, tales como ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina (datos no mostrados). Su formación a partir del precursor fue importante en las primeras semanas

después de la floración, pero no se detectó en las etapas avanzadas del desarrollo. Según Wilson y Rinne (1976), el ácido fosfatídico está presente generalmente en trazas en el tejido fresco, pero puede ser generado por la congelación del tejido previo a su análisis, por lo que su presencia entre los productos de nuestras incubaciones bien pudiera ser artificial, toda vez que todas las muestras fueron siempre congeladas en N₂ líquido previo a la extracción de lípidos (ver Materiales y Métodos).

En ningún momento se observó acumulación de ácidos grasos libres, lo que nos permite descartar la posibilidad de que los DAG puedan ser formados por lipólisis durante el período de ensayo o extracción, al igual que ocurre en algunas semillas (Ichihara y Noda, 1980).

3.2.3 Distribución estereoespecífica de los ácidos grasos formados en las moléculas de glicerolípidos

Según se describió en el apartado 1.2.3 de la Introducción, la biosíntesis de glicerolípidos tiene lugar por acilación secuencial de la molécula de glicerofosfato (ruta de Kennedy). Por tanto, los ácidos grasos marcados formados a partir de ¹⁴C-acetato, en forma de acil-CoAs, se utilizan en las reacciones de acilación implicadas en dicha ruta. El análisis de los ácidos grasos presentes en cada una de las posiciones estereoespecíficas de la molécula de glicerol sirve para establecer relaciones metabólicas entre los distintos glicerolípidos. Así, cualquier glicerolípidos

sintetizado enteramente *de novo*, a partir de ácidos grasos marcados formados a partir de ^{14}C -acetato, debería mostrar la misma radioactividad en cada una de las posiciones de su molécula.

Las lipasas y fosfolipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres de TAG y fosfolípidos respectivamente, y se caracterizan por su especificidad. La lipasa pancreática sólo actúa sobre ésteres en posiciones primarias de las moléculas de TAG, denominadas posiciones α (sn-1 y sn-3), liberando dos ácidos grasos y una molécula de 2-monoacilglicerol (2-MAG). [También es activa sobre moléculas de 1,2-DAG, sobre las que presenta la misma especificidad]. La fosfolipasa A_2 hidroliza enlaces ésteres en posición sn-2, denominada posición β , de las moléculas de fosfolípidos, liberando el ácido graso esterificado a dicha posición y una molécula del ácido lisofosfatídico correspondiente. La especificidad de estas enzimas ha sido explotada para determinar la distribución de ácidos grasos marcados entre las distintas posiciones de los glicerolípidos formados en el curso de las incubaciones llevadas a cabo.

Se observó que la distribución relativa de ácidos grasos marcados, entre las posiciones estereoespecíficas de las moléculas de TAG, DAG y PC, varía a lo largo del periodo de desarrollo de la aceituna (tabla 1). En las etapas tempranas del desarrollo, la mayor parte de los ácidos grasos marcados aparecían esterificados a las posiciones α de los TAG; en el curso del desarrollo, la proporción de radioactividad en posición β muestra una tendencia ascendente. Si los TAG fueron

sintetizados enteramente *de novo* en el curso de la incubación con ^{14}C -acetato, entonces la razón entre la radioactividad asociada a las posiciones α y β debería ser 2, pues cada molécula posee dos ácidos grasos en posición α (sn-1 y sn-3) y uno sólo en posición β (sn-2). Sólo en un caso se encontró una relación α/β próxima a 2, lo que indica que, en general, la síntesis de TAG a partir de ^{14}C -acetato no es enteramente *de novo*. El predominio de ácidos grasos radioactivos en posiciones α sugiere que parte de los TAG se forman por acilación de DAG no marcados presentes en el tejido. La existencia de DAG en extractos lipídicos de aceitunas en desarrollo ha sido demostrada (Vázquez y Mancha, 1970); igualmente se demostró que la proporción de DAG era relativamente elevada en las etapas tempranas del desarrollo, antes del inicio de la acumulación de TAG de reserva, lo que concuerda con la elevada proporción de ácidos grasos radioactivos en posiciones α al principio del desarrollo, e indican que estos TAG se forman por acilación en posición sn-3 de los DAG preexistentes.

Tanto DAG como los fosfolípidos de membranas contienen sólo dos ácidos grasos. Por tanto, si su formación se realiza enteramente *de novo* en el curso de la incubación con ^{14}C -acetato, los ácidos grasos radioactivos se distribuirían al 50% entre las dos posiciones. En los datos de la Tabla 1 se muestra como la relación de radioactividad en posiciones α y β es próxima a la unidad en DAG y PC, excepto en las etapas muy tempranas del desarrollo, lo que indica que estos glicerolípidos son sintetizados *de novo* en el curso de la incubación. Es decir, los ácidos grasos formados a partir del marcador radioactivo y previa formación de los acil-CoAs

correspondientes, acilaron sucesivamente la molécula de glicerol-3-fosfato, según la ruta de Kennedy, hasta la formación de DAG. Los resultados obtenidos para PC podrían indicar que la entrada de ácidos grasos marcados en PC tiene lugar mediante la acción de la enzima CDP-colina:1,2 diacilglicerol colinafosfotransferasa, que cataliza la conversión reversible de la molécula de DAG en PC (Slack y col., 1983).

TABLA 1. Evolución con el desarrollo de la incorporación de ^{14}C -acetato en posición α y en posición β de los principales glicerolípidos de la pulpa de aceituna.

Edad fruto	Distribución (%)					
	TAG		DAG		PC	
	α	β (α/β)	α	β (α/β)	α	β (α/β)
6	92	8 (11.5)	80	20 (4.0)	80	20 (4.0)
10	89	11 (8.1)	58	42 (1.4)	39	61 (0.6)
13	82	18 (4.5)	55	45 (1.2)	55	45 (1.2)
16	84	16 (5.2)	53	47 (1.1)	46	54 (0.8)
19	82	18 (4.5)	51	49 (1.0)	56	44 (1.2)
22	64	36 (1.7)	58	42 (1.4)	42	58 (0.7)
25	77	23 (3.3)	61	39 (1.5)	53	47 (1.1)
28	77	23 (3.3)	58	42 (1.4)	62	38 (1.6)

Abreviaturas: α , posición sn-1 y sn-3 ; β , posición sn-2 ; DAG, diacilglicerol; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

Stymne y col. (1983) demostraron la existencia de un rápido intercambio acílico entre la posición sn-2 de la PC y acilos insaturados, principalmente oleil-CoA, por la acción de la enzima acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa. Sin embargo, este enzima no ha sido detectado en el mesocarpo de frutos como el aguacate y palma, ambos ricos en ácido oleico (Stymne y Stobart, 1984; Oo y col., 1985). En el caso de la pulpa aceituna, caracterizada también por contener un alto porcentaje de dicho ácido graso, los resultados obtenidos sugieren la no existencia del intercambio acílico dado que si el enzima actuara, la proporción de radioactividad en β sería mayor y como consecuencia, el valor de la relación α/β menor.

3.2.4 Utilización de sustratos alternativos

A pesar de ser el ^{14}C -acetato el precursor más ampliamente utilizado en los estudios sobre metabolismo lipídico, también se han realizado estudios utilizando otros sustratos radioactivos, lo que permite, en cierto grado, elucidar la participación de distintas vías, catalizadas así mismo por diferentes enzimas, en la biosíntesis de TAG. A tal respecto se han realizado distintos ensayos *in vivo* en pulpa de aceituna con precursores tales como ^{14}C -piruvato, ^{14}C -malonato, ^{14}C -glucosa, ^{14}C -sacarosa, ^{14}C -palmitato y ^{14}C -oleato, en las condiciones establecidas, tal y como se describe en el apartado 2.4.3 de materiales y métodos, salvo que en esta ocasión el tiempo de ensayo fue de 6 horas.

El origen del acetyl-CoA, precursor en la biosíntesis de ácidos grasos, en plantas permanece sin aclarar (Roughan y Ohlrogge, 1994). Se ha demostrado que en su formación participan dos enzimas diferentes (Sauer y Heise, 1984; Camp y Randall, 1985; Treede y Heise, 1985, 1986 y Treede y col., 1986): la acetyl-CoA sintetasa y el complejo piruvato deshidrogenasa. La contribución relativa de estos dos enzimas puede desempeñar un papel regulatorio en la síntesis de TAG. A este respecto, se ha investigado la capacidad de síntesis de glicerolípidos en la pulpa de aceituna a partir de ^{14}C -acetato y ^{14}C -piruvato. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. La incorporación total en glicerolípidos, expresada en nmoles de sustrato/h/g tejido (peso fresco), fue similar en ambos casos. Así mismo, la distribución de radioactividad entre los diferentes lípidos fue semejante para ambos precursores. Por tanto, la capacidad por parte de la pulpa de aceituna de incorporar ^{14}C -piruvato en glicerolípidos, sugiere la existencia del complejo piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión del piruvato en acetyl-CoA, que se añade a la presencia de la acetyl-CoA sintetasa indicada por todos los experimentos de marcaje con ^{14}C -acetato descritos. (Experimentos diseñados para establecer la participación relativa de estas dos enzimas se describen en el apartado 3.2.5).

TABLA 2. Incorporación de diferentes sustratos radioactivos en glicerolípidos de pulpa de aceituna.

Precursor	Incorporación total		Distribución (%)			
	(nmol/h/g)	%	TAG	DAG	PC	Otros LP
acetato	33.8 ± 3.4	100	58	13	19	10
piruvato	27.1 ± 3.0	80	56	17	15	14
malonato	2.1 ± 0.05	6	66	15	9	10
glucosa	0.2 ± 0.03	0.6	no determinado			
sacarosa	0.0					

Frutos recolectados la 12 SDF. Incorporación total en glicerolípidos expresada en nmoles ¹⁴C-sustrato/h/g tejido (peso fresco). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; LP, lípidos polares; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

Otro de los precursores utilizados en nuestras experiencias fue el ¹⁴C-malonato. En los ensayos realizados con dicho precursor los valores de incorporación en lípidos fueron inferiores al 6 % de los obtenidos con el acetato en idénticas condiciones (tabla 2). Estos resultados coinciden con los publicados por Roughan y col. (1979b) en sus experiencias realizadas en cloroplastos de espinaca. La baja incorporación en lípidos podría estar relacionado con la dificultad de difusión del sustrato ó con la baja permeabilidad del tejido, mucho menor que para el acetato. Otro dato a tener en cuenta, es la posible contaminación del precursor radioactivo con ¹⁴C-acetato, consecuencia de la descarboxilación espontánea del malonato radioactivo (Von Korff, 1969). En el experimento aquí descrito se utilizó ¹⁴C-malonato adquirido en forma sólida y disuelto inmediatamente antes de su uso, para evitar en lo posible su descarboxilación.

El metabolismo del malonato tras su incorporación al tejido se presenta controvertida, ya que pondría de manifiesto la existencia de la enzima malonil-CoA sintetasa, que lo transformaría en malonil-CoA para la posterior formación de ácidos grasos. La presencia de esta enzima ha sido descrita en *Pseudomonas fluorescens* (Bang y Sam, 1990) y purificada recientemente en *Rhizobium japonicum* (Kim y Chae, 1991). Así mismo, Ohlrogge y col. (1978) y posteriormente Mukherjee (1986), en experiencias con diferentes semillas, describen la incorporación de dicho precursor esencialmente en los mismos productos que se originan a partir del acetato, es decir ácidos grasos. Otra posibilidad sería la transformación de malonato en acetato mediante una descarboxilasa. Hasta el momento no se ha demostrado la existencia de un enzima capaz de catalizar esta reacción en plantas.

En definitiva el [2¹⁴C]-malonato es un sustrato poco efectivo para la síntesis de ácidos grasos y glicerolípidos en pulpa de aceituna, de acuerdo con lo descrito por Roughan y col. (1979b) en cloroplastos de espinaca.

Considerando que los frutos son órganos sumideros, capaces de importar fotosintatos de las hojas y utilizarlos para la síntesis de sus sustancias de reserva, se investigó la capacidad de síntesis de TAG a partir de carbohidratos marcados. En este sentido se han realizado toda una serie de ensayos, utilizando ¹⁴C-glucosa o ¹⁴C-sacarosa como precursores, a distintas condiciones experimentales (infiltración a vacío del precursor, distintos tiempos de incubación), y en ninguno

de ellos se han obtenido tasas significativas de incorporación en lípidos en comparación a las obtenida con ^{14}C -acetato (tabla 2); resultados que se asimilan a los obtenidos por otros autores en semillas en desarrollo de jjoba (Ohlrogge y col., 1978) o de girasol (Luthra y col., 1991). La ineficacia de estos sustratos podría radicar en la impermeabilidad del tejido o su incapacidad para metabolizarlos por vía glucolítica (ver Fig. 6).

Finalmente, se ha ensayado la incorporación de ácidos grasos marcados (en forma de sales amónicas) en glicerolípidos de aceituna. Estudios de este tipo realizados con hojas de espinaca (Roughan y col., 1987) y células de *Chlamydomonas reinhardtii* (Giroud y Eichenberger, 1989) demostraron que los ácidos grasos eran incorporados en glicerolípidos. Así mismo, la aceituna ha demostrado una apreciable capacidad de síntesis de glicerolípidos a partir de ^{14}C -palmitato (Mancha, 1978). Para su utilización en las reacciones de acilación de la ruta de Kennedy, los ácidos grasos sintetizados en los plastidios, en forma de acil-ACPs, han de ser convertidos en los correspondientes acil-CoAs. En el proceso participan una acil-ACP hidrolasa, que libera el ácido graso, y una acil-CoA sintetasa que activa los ácidos grasos libres a sus correspondientes acil-CoAs (Roughan y Slack, 1982). Por tanto, la utilización de ácidos grasos exógenos por parte de un tejido requiere la participación de la acil-CoA sintetasa, una enzima dependiente de CoA y ATP, que se localiza en la envuelta de los cloroplastos (Joyard y Stumpf, 1981; Sánchez y Mancha, 1981).

Los experimentos realizados con ^{14}C -oleato o ^{14}C -palmitato (sales amónicas) indicaron que estos precursores podían permear el tejido y pasar a su interior, pero no eran incorporados apreciablemente a sus glicerolípidos (resultados no mostrados), lo que sugiere incapacidad del tejido para activar los ácidos grasos en las condiciones de ensayo. Mancha (1978) en sus estudios realizados en aceituna, describe unos valores bajos de incorporación de ^{14}C -palmitato en glicerolípidos debido a que su dificultad de acceso al lugar de localización de síntesis en el interior de la célula.

3.2.5 Implicación relativa de acetato y piruvato en la biosíntesis de ácidos grasos

En el apartado anterior ha quedado establecido que tanto acetato como piruvato pueden ser utilizados como precursores de la síntesis de ácidos grasos por la pulpa de aceituna, lo que indica la existencia de acetil-CoA sintetasa y piruvato deshidrogenasa en el tejido. Como se discutió en el apartado 1.2.2.1.1 la controversia acerca de la participación de una u otra reacción en la formación de acetil-CoA está todavía vigente: no existe acuerdo general acerca de cual es el origen de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos (Harwood, 1988).

Ya que ambos sustratos pueden ser utilizados para la formación de ácidos grasos, presumiblemente vía acetil-CoA, cabría esperar que la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos se viera disminuida por la adición de piruvato no marcado

al medio de incubación, ya que la radioactividad específica del ^{14}C -acetil-CoA formado a partir de acetato radioactivo, disminuiría por dilución con acetil-CoA no marcado formado a partir de piruvato. Por el mismo razonamiento la tasa de incorporación de ^{14}C -piruvato debería disminuir en presencia de acetato. Los resultados de este experimento (tabla 3) demuestran que tanto acetato como piruvato inhiben la incorporación de ^{14}C -piruvato y ^{14}C -acetato respectivamente, lo que indica que ambos precursores convergen en un punto de la misma ruta metabólica, presupuestamente acetil-CoA. Además, se observa que la incorporación de ^{14}C -piruvato se inhibe por adición de acetato en una extensión mayor que la de ^{14}C -acetato por piruvato, lo que prueba que, en las condiciones experimentales del ensayo, la pulpa de aceituna utiliza más eficazmente el acetato como precursor de los ácidos grasos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores utilizando cloroplastos aislados de espinaca (Roughan y col., 1979a; Springer y Heise, 1989).

Conviene, sin embargo, añadir una nota de cautela a la interpretación de estos resultados. En el apartado 3.2.1.1 se describió el efecto del pH sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos, y los resultados se interpretaron en el sentido de que apuntan a que es la especie protonada (CH_3COOH), mejor que la disociada (CH_3COO^-), la que difunde dentro del tejido. Las constantes de disociación (pKa) de acetato y piruvato son muy diferentes (4.8 y 2.4 respectivamente), por lo que al pH del medio de incubación (6.0) las concentraciones de las especies protonadas de los ácidos acético y pirúvico, a

concentraciones totales de 1 mM, son de aproximadamente 50 y 0.25 μM respectivamente. Así pues, si realmente son las especies protonadas las que permean al tejido, las concentraciones efectivas de uno y otro precursor no son comparables.

TABLA 3. Efecto de la adición de piruvato y acetato no marcados sobre la incorporación de ^{14}C -acetato y ^{14}C -piruvato en glicerolípidos de pulpa de aceituna.

Tratamiento	Incorporación total (nmol/h/g)	%
^{14}C -acetato	38.0 \pm 4.1	100
^{14}C -piruvato	29.2 \pm 3.6	100
^{14}C -acetato + piruvato	32.7 \pm 0.01	86
^{14}C -piruvato + acetato	21.6 \pm 0.7	74

Frutos recolectados la 13 SDF. Incorporación total en glicerolípidos en nmoles de ^{14}C -acetato o ^{14}C -piruvato/h/g tejido (peso fresco). Concentración de acetato y piruvato no marcado 1 mM.

3.2.6 Localización histológica de la actividad biosintética

Estudios histológicos realizados en aceitunas (Duran Grande y Tamayo, 1964; Romano y col., 1980), han puesto de manifiesto que, a semejanza de lo que ocurre en semillas oleaginosas, los TAG de reserva se acumulan en estructuras celulares discretas llamadas oleosomas, preferentemente en el mesocarpo (Stymne y Stobart, 1987; Wodner y col., 1988). Estas estructuras celulares parecen derivar del retículo endoplasmático (Wanner y col., 1981) y en ellas tienen lugar al menos las etapas finales de la biosíntesis de lípidos (Stymne y Stobart, 1987).

Como se explicó en el inicio de este trabajo, la aceituna consta de tres tejidos bien diferenciados: epicarpo, mesocarpo y endocarpo. Durante el desarrollo de la misma, el tamaño de la pulpa va aumentando progresivamente respecto al endocarpo como consecuencia de la acumulación de TAG. A partir de un cierto grado de desarrollo, es posible visualizar en la pulpa los dos tejidos que la constituyen: el epicarpo exterior, de color verde, y el mesocarpo, que presenta una coloración más pálida (Fig. 21). Ambos tejidos pueden separarse, como se describió en el apartado 2.4.2, para investigar su capacidad de biosíntesis de lípidos.

En la tabla 4 se muestra la distribución de actividad biosintética entre epicarpo y mesocarpo, determinada como incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos y el efecto de la luz sobre la actividad en ambos tejidos. Cuando el

tejido ensayado fue el epicarpo, la incorporación total del precursor radioactivo en glicerolípidos y en presencia de luz fue muy superior a la obtenida cuando se ensayó en la oscuridad. La distribución relativa de radioactividad en los diferentes glicerolípidos mostró algunas diferencias significativas. Así, en la oscuridad se observó una mayor incorporación relativa en ácido fosfatídico y otros lípidos polares, y consecuentemente una ligera disminución en TAG, DAG y PC, con respecto a los valores registrados en condiciones de iluminación. Cuando se ensayó el mesocarpo, la incorporación total del precursor en glicerolípidos resultó ser la misma en la luz y en la oscuridad. Sin embargo, en condiciones de oscuridad se observó una ligera disminución de la incorporación relativa en TAG y un aumento en DAG.

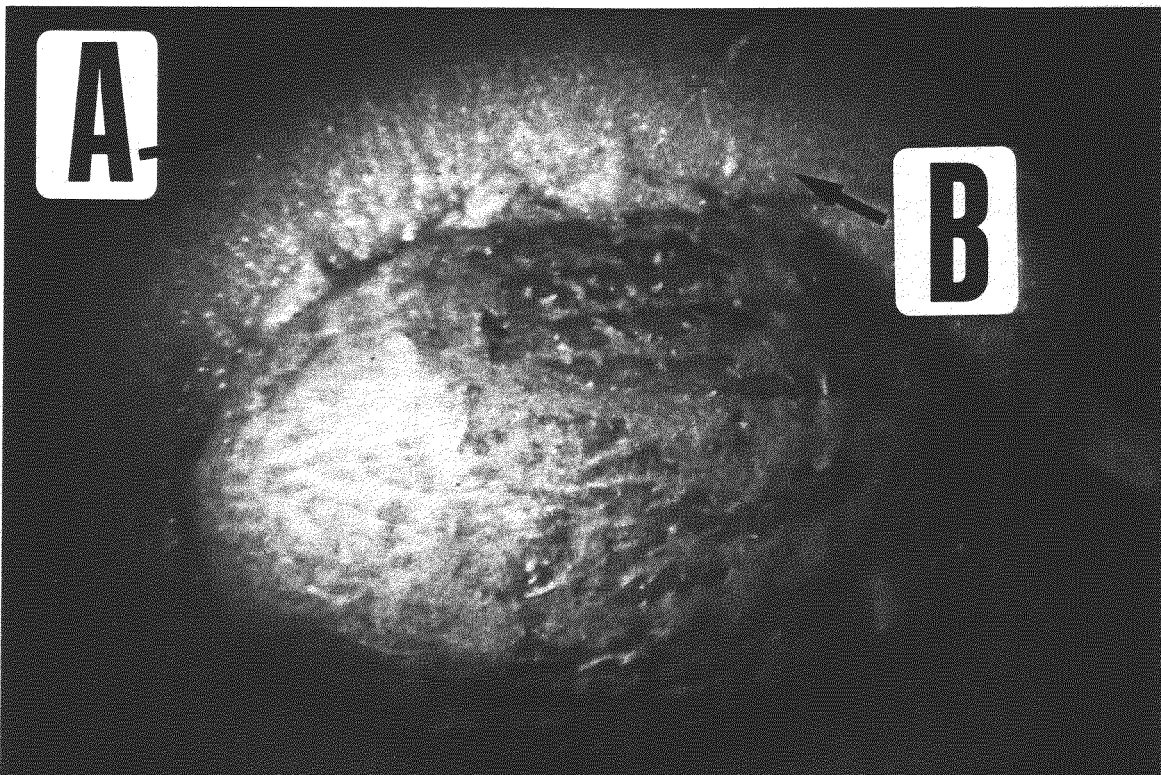


FIGURA 21. Tejidos constituyentes de la pulpa de aceituna, (A) epicarpo y (B) mesocarpo. Fruto recolectado la 23 SDF.

Estos resultados demuestran la existencia en la pulpa de aceituna de dos tejidos claramente diferenciados desde el punto de vista bioquímico. Ambos tejidos son capaces de sintetizar TAG de reserva a partir de ^{14}C -acetato, pero en el epicarpo esta actividad es claramente dependiente de la luz, lo que demuestra su carácter fotosintético. Así pues, el doble carácter autotrófico y heterotrófico de la aceituna puede ascribirse a la existencia de estos dos tejidos en la pulpa. [Otros resultados experimentales que se discuten más adelante, vendrán a ratificar esta observaciones].

TABLA 4. Distribución de la actividad biosintética, como medida de ^{14}C -acetato, entre epicarpo y mesocarpo de pulpa de aceituna. Efecto de la luz.

Tejido	Tratamiento	Incorporación total (nmol/h/g)	Distribución (%)			
			TAG	DAG	PC	Otros LP
Pulpa	luz	35.9 ± 1.9	58	18	13	11
	oscuridad	22.9 ± 2.3	59	9	20	12
Epicarpo	luz	52.6 ± 7.5	59	18	13	10
	oscuridad	20.2 ± 0.9	56	14	10	20
Mesocarpo	luz	29.5 ± 2.5	50	15	8	27
	oscuridad	30.1 ± 0.5	46	21	8	25

Frutos recolectados la 25 SDF. Incorporación total en glicerolípidos expresada en nmoles de ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; LP, lípidos polares; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

3.2.7 Influencia del estado de maduración sobre la actividad biosintética

La característica más evidente que define el proceso de maduración de un fruto es la pérdida de color verde, típico de los frutos inmaduros, y el desarrollo de una tonalidad característica. Esta pérdida de color se debe a la degradación de clorofila presente en el fruto. La coloración negra típica de las aceitunas maduras es debida a la formación de una antocianina denominada oleocianina (Vázquez, 1965). Todo esto implica una disminución de la capacidad fotosintética del fruto (Piechulla y col., 1987). Con objeto de conocer la influencia que sobre la actividad biosintética ejerce este proceso, se han realizado diferentes ensayos con trozos de pulpa procedentes de aceitunas verdes y moradas en condiciones de luz y oscuridad.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. En aceitunas verdes, la incorporación total de ^{14}C -acetato en glicerolípidos fue superior cuando se ensayaron en presencia de luz. Teniendo en cuenta que las aceitunas se encontraban en un estado avanzado de maduración (28 SDF), la estimulación por la luz resultó ser menor a la obtenida con aceitunas más jóvenes (ver Fig. 17). La distribución de radioactividad entre los diferentes lípidos fue semejante en ambos casos. Por el contrario, las aceitunas maduras, en las que se ha producido el cambio de color del epicarpo (tejido fotosintético del fruto tal y como se describe en este trabajo), presentaron una actividad biosintética similar a la de los frutos

verdes en la oscuridad y no dependiente de la luz. Todo indica que la pulpa de aceituna pierde su carácter fotosintético cuando se produce el cambio de color que acompaña a la maduración.

TABLA 5. Efecto del estado de maduración sobre la incorporación de ^{14}C -acetato en glicerolípidos de pulpa de aceituna.

Color	Tratamiento	Incorporación total (nmol/h/g)	Distribución (%)			
			TAG	DAG	PC	Otros LP
Verdes	luz	20.1 ± 1.4	43	18	12	38
	oscuridad	15.5 ± 1.2	42	20	11	27
Moradas	luz	13.2 ± 1.2	38	20	4	38
	oscuridad	14.6 ± 2.1	28	22	3	47

Frutos recolectados la 28 SDF. Incorporación total en glicerolípidos en nmoles de ^{14}C -acetato/h/g tejido (peso fresco). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; LP, lípidos polares; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

3.3 FOTOSÍNTESIS DE LÍPIDOS

Murphy y Leech (1981), aluden al término "fotosíntesis lipídica" para definir el proceso por el que el bicarbonato radioactivo se incorpora fotosintéticamente en los productos lipídicos de la hoja de espinaca. Estudios similares fueron realizados por Beck y Levine (1977) en células de *Chlamydomonas reinhardtii*. Sin embargo ningún estudio de este tipo se ha realizado en frutos oleaginosos como la aceituna. Al tratarse de un fruto fotosintético, la capacidad del tejido de incorporar bicarbonato radioactivo, puede jugar un papel significativo en el proceso de formación de TAG de reserva.

3.3.1 Biosíntesis de lípidos a partir de ^{14}C -bicarbonato en la pulpa de aceituna

La pulpa de aceituna mostró capacidad de fijar ^{14}C -bicarbonato del medio de incubación e incorporarlo en glicerolípidos, una actividad que resultó ser esencialmente dependiente de la luz (Tabla 6), lo que demuestra la naturaleza fotosintética del proceso. La tasa de incorporación de ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos ha sido calculada a partir del dato de radioactividad específica del precursor en el medio de incubación; sin embargo, y como se indicó en el apartado 1.3.2, los frutos en desarrollo acumulan altos niveles de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ como consecuencia de la respiración mitocondrial: niveles de CO_2 del orden de 1-2% han sido medidos en la atmósfera interna de las aceitunas en desarrollo (datos no

mostrados), resultados que concuerdan con los obtenidos para otros frutos (Blanke y Lenz, 1989). Hay que considerar, por lo tanto, que las medidas de incorporación de ^{14}C -bicarbonato en los experimentos que se describen en esta memoria están subestimados, toda vez que no se ha tenido en consideración la dilución de la radioactividad específica del precursor por el $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ existente en la pulpa.

Tabla 6. Efecto de la luz sobre la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos.

Tratamiento	Incorporación glicerolípidos (nmol/h/g)	Distribución (%)			
		TAG	DAG	PC	Otros LP
Luz	3.7 ± 0.05	44	23	17	16
Oscuridad	0.1 ± 0.02	no determinado			

Frutos recolectados la 16 SDF. Incorporación en glicerolípidos en nmoles de ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; LP, lípidos polares; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

La distribución de la radiocatividad entre los distintos glicerolípidos formados en el curso de la incubación nos muestra a TAG como el principal producto de síntesis, seguido de DAG y PC, resultados similares a los obtenidos utilizando ^{14}C -acetato o ^{14}C -piruvato como precursores (ver Tabla 2), lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente con cloroplastos aislados de espinaca (Murphy y Leech, 1977, 1978).

3.3.1.1 Naturaleza de los productos de fijación fotosintética de ^{14}C -bicarbonato

Acetato y piruvato son precursores inmediatos de acetyl-CoA, por lo que resultan eficazmente canalizados hacia la síntesis de ácidos grasos en tejidos oleaginosos (ver Fig. 2). El bicarbonato, por el contrario, puede ser metabolizado en los tejidos fotosintéticos a través de distintas rutas.

En forma de CO_2 puede ser fijado en triosasfosfato, mediante las reacciones del ciclo de Calvin, y abastecer las rutas de síntesis de lípidos (ver Fig. 6), carbohidratos, aminoácidos. Además puede ser incorporado en malato por la acción sucesiva de la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa y la malato deshidrogenasa, según se discutió en el apartado 1.3.2. Como consecuencia, en los experimentos de marcaje de tejidos fotosintéticos con ^{14}C -bicarbonato es de esperar que la radioactividad se incorpore a una amplia gama de productos, tanto lipídicos como hidrosolubles.

Cuando trozos de tejido de pulpa de aceituna se incubaron con ^{14}C -bicarbonato con iluminación, se observó que la radioactividad se incorporaba tanto en lípidos como en productos hidrosolubles (Tabla 7). Interesa resaltar que la proporción de radioactividad en lípidos resultó ser baja en frutos jóvenes, en los que no se había iniciado la etapa de acumulación de TAG de reserva, pero aumentaba en el curso del desarrollo de la aceituna, como era de esperar en un fruto oleaginoso.

TABLA 7. Incorporación relativa de ^{14}C -bicarbonato en productos hidrosolubles y glicerolípidos de pulpa de aceituna en diferentes estados de desarrollo.

Edad fruto	Incorporación total (nmol/h/g)	Distribución (%)	
		Lípidos	Productos hidrosolubles
8	8.0	21	79
16	18.5	20	80
19	21.1	35	65
26	65.0	60	40

Incorporación total en glicerolípidos y productos hidrosolubles en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco).

3.3.1.2 Distribución de la radioactividad en las moléculas de glicerolípidos

En presencia de luz, los tejidos fotosintéticos incorporan la radioactividad del ^{14}C -bicarbonato en DHAP. Éste es un intermediario central en la ruta de biosíntesis de glicerolípidos, pues de él se generan tanto el glicerofosfato, por reducción catalizada por la glicerofosfato deshidrogenasa, como acetyl-CoA, a través de la ruta glucolítica y la participación final de la piruvato deshidrogenasa (ver Fig. 6). Por tanto, a diferencia del ^{14}C -acetato que se incorpora a la parte acílica de los glicerolípidos, en los experimentos de marcaje con ^{14}C -bicarbonato la radioactividad puede en teoría incorporarse tanto a la parte acílica como a la glicerídica de las moléculas de los glicerolípidos sintetizados. Los resultados de la Tabla 8 muestran que éste es realmente el caso: la radioactividad del ^{14}C -bicarbonato se distribuye entre la parte acílica y la glicerídica de los glicerolípidos formados por la pulpa de

aceituna durante la incubación. Es interesante resaltar que la proporción de radioactividad en una y otra parte de la molécula varía a lo largo del desarrollo: en frutos recogidos en etapas tempranas, antes de que inicien el periodo de acumulación de aceite, la proporción de radioactividad asociada a la parte acílica hidrófoba es similar a la determinada en la parte glicerídica polar de la molécula, mientras que en los frutos más desarrollados, en los que tienen lugar una síntesis activa de TAG, la radioactividad asociada a la parte acílica es claramente superior, lo que indica que la biosíntesis de ácidos grasos a partir de los productos de fijación del ^{14}C -bicarbonato se intensifica durante el periodo de síntesis y acumulación de TAG.

TABLA 8. Incorporación relativa de ^{14}C -bicarbonato en diferentes subfracciones de glicerolípidos de pulpa de aceituna en diferentes estados de desarrollo.

Edad fruto	Incorporación glicerolípidos (nmol/h/g)	Distribución (%)	
		parte acílica	parte glicerídica
8	1.7	58	42
16	3.7	78	22
19	7.4	77	23
26	39.0	85	15

Incorporación en glicerolípidos en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco).

3.3.1.3 Cinética de incorporación de ^{14}C -bicarbonato

Utilizando ^{14}C -acetato como sustrato se observó una incorporación inmediata de radioactividad en glicerolípidos de aceituna (ver Fig. 16); esto indica que el acetato es eficazmente canalizado hacia la biosíntesis de ácidos grasos, pues es precursor inmediato de acetil-CoA. La cinética de incorporación de ^{14}C -bicarbonato por cortes de pulpa de aceituna incubados en la luz es más compleja (Fig. 22). Como se ha descrito en el apartado 3.3.1.1, el bicarbonato es fijado fotosintéticamente por la pulpa de aceituna y se incorpora en productos lipídicos e hidrosolubles. La figura 22a nos muestra que la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos se produce según una cinética sigmoideal. Se aprecia que a tiempos cortos de incubación (hasta 20 minutos), la mayor parte de la radioactividad del ^{14}C -bicarbonato aparecía asociada a productos hidrosolubles; después de un retraso apreciable se observó que la incorporación en glicerolípidos aumentaba según una cinética hiperbólica parecida a la registrada utilizando ^{14}C -acetato (ver Fig. 16). Un retraso similar en la formación de glicerolípidos se detectó en experimentos de marcaje de hojas de espinaca con $^{14}\text{CO}_2$ (Murphy y Leech, 1981), y puede interpretarse como el lapso de tiempo necesario para que la radioactividad del ^{14}C -bicarbonato, fijado fotosintéticamente en los cloroplastos de la pulpa de aceituna a través del ciclo de Calvin, se incorpore y sature a los precursores hidrosolubles de la síntesis de glicerolípidos, glicerol-3-fosfato y acetil-CoA.

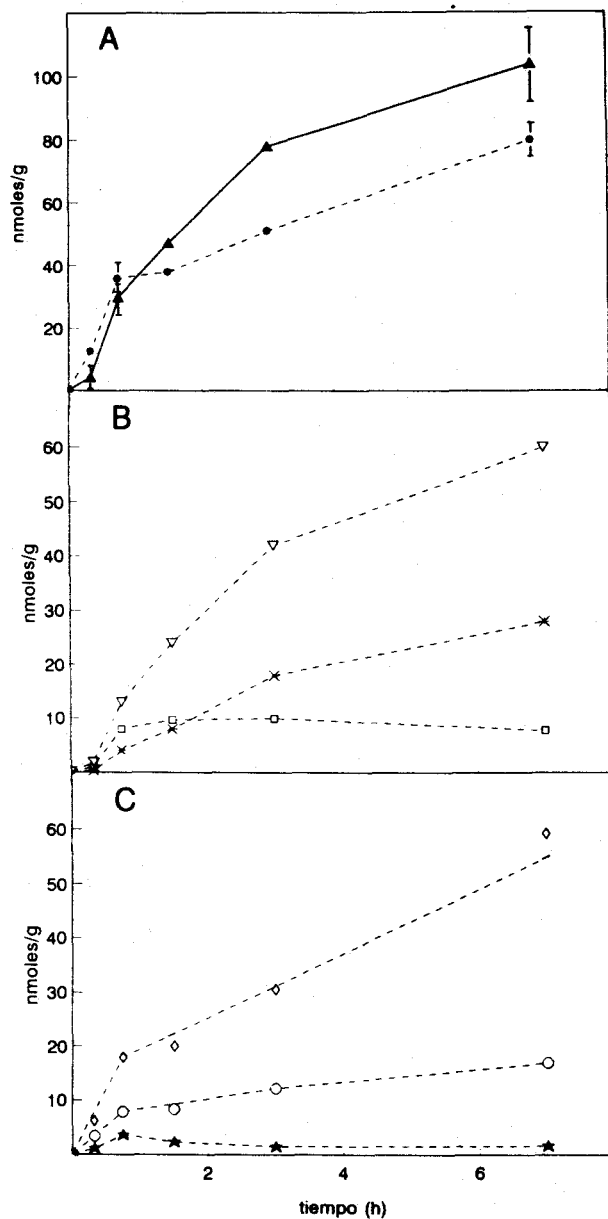


FIGURA 22. Incorporación de ^{14}C -bicarbonato a distintos tiempos de ensayo en (A) glicerolípidos (▲) y productos hidrosolubles (*), (B) TAG (▽), DAG (*) y PC (□), (C) azúcares (◇), aminoácidos (★) y ácidos orgánicos (O) de pulpa de aceituna. Frutos recolectados la 26 SDF. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco).

La cinética de incorporación de ^{14}C -bicarbonato en las distintas clases de glicerolípidos (Fig. 22b) fue, así mismo, similar a la obtenida con ^{14}C -acetato si se ignora el lapso inicial de 20 minutos antes comentado. La radioactividad se incorporó principalmente en TAG, que acumulaba más del 50% de la radioactividad asociada a productos lipídicos a partir de los 90 minutos de incubación. La incorporación en PC fue alta a tiempos de incubación cortos, pero a partir de los 90 minutos se observó una disminución de la radioactividad asociada a este fosfolípido, al tiempo que se incrementaba la incorporación en DAG y TAG. Esta cinética concuerda con la observada en incubaciones con ^{14}C -acetato y parece reflejar la participación de PC en la ruta de biosíntesis de TAG, según se discutió en el apartado 3.2.1.3. Todo indica, por tanto, que el bicarbonato, una vez fijado en triosafosfato a través del ciclo de Calvin y metabolizado a través de la ruta glucolítica, se incorpora en TAG siguiendo la misma ruta biosintética que el acetato.

Los productos hidrosolubles formados a partir de ^{14}C -bicarbonato fueron analizados según el procedimiento de Regwell (1980) descrito en el apartado 2.5.3, y los resultados se muestran en la figura 22c. A cualquier tiempo de incubación la fracción de carbohidratos acumulaba más radioactividad que las fracciones de aminoácidos y ácidos orgánicos, mientras que la incorporación en fosfoésteres resultó insignificante. Según se ha demostrado, las aceitunas en desarrollo presentan elevados contenidos de azúcares totales (Rodríguez de la Borbolla y col., 1955; Fernández, 1971; Wodner y col., 1988); aunque estos resultados fueron

interpretados en el sentido de que las aceitunas, como órganos sumideros, importan activamente fotosintatos, principalmente en forma de azúcares, de las hojas, nuestros resultados sugieren que la aceituna en desarrollo posee una elevada capacidad de fotosíntesis de carbohidratos, en realidad comparable a la capacidad de síntesis de TAG en las condiciones experimentales empleadas. Por otra parte, la incorporación de radioactividad en ácidos orgánicos aumentó al principio de la incubación para alcanzar un máximo a los 40 minutos, a partir del cual se produjo una disminución de la radioactividad asociada a esta fracción. La acumulación de radioactividad en ácidos orgánicos al principio de la incubación, un periodo que corresponde con el lapso de tiempo previo a la formación de glicerolípidos, quizás sea reflejo de la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en piruvato y/o acetato, que son los precursores de ácidos grasos, según se discutió anteriormente.

3.3.1.4 Curva de concentración de bicarbonato

Estudios realizados con cloroplastos aislados de hojas de espinaca mostraron que la incorporación de ^{14}C -bicarbonato en lípidos era linealmente dependiente de la concentración de sustrato hasta 60 mM (McKee y Hawke, 1978), un valor ciertamente elevado si se considera que la K_m de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa es del orden de 10 μM (Woodrow y Berry, 1988). En nuestros experimentos con trozos de pulpa en desarrollo, por el contrario, se observó una cinética de saturación en relación con la concentración de bicarbonato (Fig. 23). La semisaturación del sistema se obtuvo a una concentración de 12 mM de

bicarbonato. Estos resultados, no obstante, deben interpretarse teniendo en cuenta que en las condiciones de ensayo (30°C de temperatura y pH 6.0) menos de la mitad del bicarbonato se encontraba en solución, mientras que el resto estaba en forma de CO₂ en la atmósfera del vial de incubación. En todo caso, y aunque desconocemos la constante de afinidad de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de aceituna, o la de algún otro fruto, la concentración semisaturante de bicarbonato deducida de nuestros experimentos parece excesivamente elevada, y posiblemente se debe a la elevada concentración de CO₂ en la atmósfera intercelular de la aceituna en desarrollo, según se indicó en el apartado 3.3.1. Por otra parte, la distribución de radioactividad entre productos hidrosolubles y lipídicos no se vió significativamente afectada por la variación de la concentración de bicarbonato, ni tampoco la distribución de radioactividad en los distintos glicerolípidos (datos no mostrados).

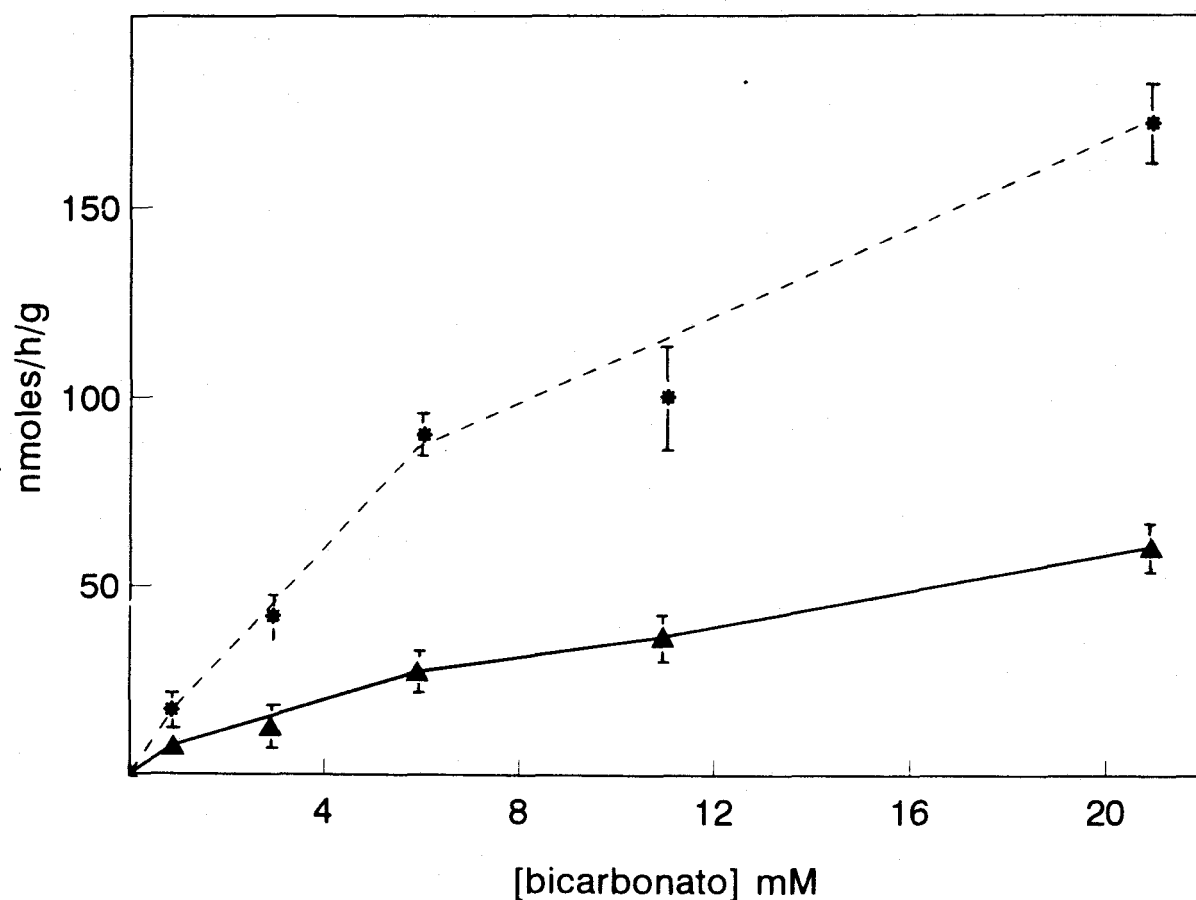


FIGURA 23. Efecto de la concentración de bicarbonato sobre la incorporación en glicerolípidos (▲) y productos hidrosolubles (*) de pulpa de aceituna. Frutos recolectados la 18 SDF. Incorporación expresada en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco).

3.3.1.5 La fotosíntesis de glicerolípidos se localiza en el epicarpo

En los experimentos realizados con ^{14}C -acetato quedó demostrado que la biosíntesis de glicerolípidos dependiente de la luz se concentra en el epicarpo de la aceituna (Tabla 4). El acetato es un precursor que se incorpora a los glicerolípidos a través de una ruta metabólica, la ácido graso sintasa, que aunque de localización plastidial, no está directamente ligada a la fotosíntesis. De hecho

ha quedado demostrado que cloroplastos aislados de espinaca son capaces de sintetizar ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetato en la oscuridad, siempre que se les suministre la energía química, en forma de ATP y NAD(P)H, necesaria para el proceso (Sauer y Heise, 1983). La fijación de CO_2 , por el contrario, es un proceso genuinamente fotosintético, de ahí que la síntesis de lípidos a partir de ^{14}C -bicarbonato en la aceituna sea absolutamente dependiente de la luz, según hemos visto (Tabla 6). Cuando se investigó la distribución histológica de la biosíntesis de glicerolípidos a partir de ^{14}C -bicarbonato se encontró que la actividad aparecía localizada casi exclusivamente en las células verdes del epicarpo (Tabla 9). La capacidad de fijación fotosintética del tejido epicárpico demostró ser unas 20 veces superior a la del mesocarpo, mientras que en la oscuridad ambos tejidos mostraron baja actividad. Además, la incorporación relativa de radioactividad en glicerolípidos resultó claramente afectada por la luz: el porcentaje de incorporación en glicerolípidos en la luz es 4 veces mayor que en la oscuridad en el caso del epicarpo, y 3 veces mayor en el mesocarpo.

TABLA 9. Distribución de la actividad biosintética, como medida de ^{14}C -bicarbonato, entre epicarpo y mesocarpo de pulpa de aceituna. Efecto de la luz.

Tejido	Tratamiento	Incorporación total (nmol/h/g)	Distribución (%)	
			Lípidos	Productos hidrosolubles
Epicarpo	luz	62.6 ± 4.4	38	62
	oscuridad	2.5 ± 0.8	9	91
Mesocarpo	luz	3.6 ± 0.3	15	85
	oscuridad	1.2 ± 0.0	5	95

Frutos recolectados la 17 SDF. Incorporación total en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco).

En este punto era de interés conocer la distribución histológica de las enzimas carboxilantes potencialmente implicadas en la fijación de ^{14}C -bicarbonato. Para ello se determinó actividades ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco) y fosfoenolpiruvato carboxilasa en extractos subcelulares preparados de tejido epicárpico y mesocárpico, encontrándose que la primera se concentra en el epicarpo, mientras que la PEP carboxilasa se distribuye por igual entre epicarpo y mesocarpo (Tabla 10). Como la actividad ácido graso sintasa está, igualmente, concentrada en el epicarpo (Sánchez y col., 1992b), estos resultados justifican la diferencia en la tasa de síntesis de glicerolípidos entre epicarpo y mesocarpo cuando se incubaba en la luz (Tabla 9). Efectivamente, el análisis de las diferentes subfracciones de los glicerolípidos formados en ambos tejidos a partir de ^{14}C -bicarbonato mostraron que el porcentaje de radioactividad asociado a la parte

acíclica de la molécula glicerídica en el epicarpo fué superior que en el mesocarpo (datos no mostrados).

TABLA 10. Localización histológica de enzimas carboxilantes en la pulpa de aceituna.

Enzima	Tejido	Actividad ($\mu\text{mol CO}_2/\text{h}/\text{mg prot}$)
Rubisco	Epicarpo	0.69
	Mesocarpo	0.16
PEP carboxilasa	Epicarpo	4.04
	Mesocarpo	3.74

Los extractos se prepararon de aceitunas 24 SDF. Actividad enzimática expresada en $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{g}$ proteínas del epicarpo y mesocarpo. Abreviaturas: Rubisco, Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa; PEP, fosfoenolpiruvato.

Como verificación adicional de la participación del ciclo de Calvin en la síntesis de glicerolípidos a partir de ^{14}C -bicarbonato, se investigó la influencia de ciertos efectores sobre el proceso. Los cationes Mg^{++} son activadores de la Rubisco (Keys y Parry, 1990), mientras que el gliceraldehido es un conocido inhibidor del ciclo de Calvin (Stokes y Walker, 1972). Como se muestra en la tabla 11, la adición de Mg^{++} al medio de incubación produjo una estimulación significativa de la fijación total de ^{14}C -bicarbonato, sin que se observara variación en la distribución de la radioactividad incorporada entre lípidos y productos hidrosolubles. La adición de gliceraldehido, por el contrario, no indujo variación significativa en la incorporación total de ^{14}C -bicarbonato, aunque resultó en una

disminución de la incorporación en glicerolípidos. Por lo demás, no se observaron diferencias representativas en la distribución de radioactividad entre las distintas clases de lípidos, ni entre las partes acílicas y glicerídicas de las moléculas de glicerolípidos (resultados no mostrados), lo que indica que estas adiciones alteran la tasa de incorporación del precursor radioactivo en glicerolípidos sin afectar el metabolismo lipídico de la aceituna.

TABLA 11. Efecto de la adición de diversos compuestos sobre la incorporación de ^{14}C -bicarbonato y su reparto, expresado en porcentaje, entre glicerolípidos y productos hidrosolubles extraídos de la pulpa de aceituna incubada *in vivo* con dicho precursor radioactivo.

Tratamiento	Incorporación total (nmol/h/g)	%	Distribución (%)	
			Lípidos	Productos hidrosolubles
Control	21.8 ± 4.5	100	35	65
+ Mg ⁺⁺	35.1 ± 0.6	161	34	66
+ gliceraldehido	24.7 ± 5.3	113	25	75

Frutos recolectados la 19 SDF. Incorporación total en nmoles ^{14}C -bicarbonato/h/g tejido (peso fresco). Concentración de Mg⁺⁺ y gliceraldehido, 10 mM.

Todo sucede como si en presencia de luz, el bicarbonato se fijara fundamentalmente a través del ciclo de Calvin, para dar triosas fosfato que, según hemos visto, son utilizados en la síntesis de glicerolípidos (Fig.6); mientras que en la oscuridad, la fijación de bicarbonato tiene lugar principalmente a través de PEP carboxilasa, para producir ácidos orgánicos que no son eficientemente canalizados hacia la síntesis de glicerolípidos. Así, sólo el epicarpo, que contiene altos niveles

de actividad ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, muestra elevada actividad de síntesis de glicerolípidos a partir de ^{14}C -bicarbonato cuando se incubaba en presencia de luz (Tabla 9).

3.3.2 Biosíntesis de lípidos a partir de $^{14}\text{CO}_2$ en aceitunas

Todos los experimentos descritos hasta este punto han sido realizados utilizando trozos de tejido de pulpa de aceituna preparados como se detalla en materiales y métodos (apartado 2.4.2). El uso de trozos de tejidos para el estudio del metabolismo lipídico ofrece ciertas ventajas metodológicas, pues permite manipular en cierta medida las condiciones del ensayo, según hemos visto. Sin embargo, el procedimiento de preparación de los cortes de tejido puede inducir una serie de respuestas metabólicas, colectivamente denominadas "metabolismo de herida o traumatismo" (Davies, 1987) que podría originar la aparición de artefactos que falsearan la interpretación de los resultados. Para comprobar este punto se llevaron a cabo incubaciones de aceitunas enteras utilizando $^{14}\text{CO}_2$ como precursor. En estas condiciones es posible determinar la capacidad de fotosíntesis de las aceitunas en desarrollo utilizando el sustrato fisiológico: CO_2 atmosférico.

Aceitunas en desarrollo incubadas en atmósfera de $^{14}\text{CO}_2$ según se describe en el apartado 2.4.4 fueron capaces de incorporar la radioactividad en glicerolípidos (Tabla 12). Es de interés observar que la distribución de radioactividad entre los distintos glicerolípidos resultó ser similar a la obtenida utilizando trozos de tejido

incubados con ^{14}C -acetato (Tabla 4) o ^{14}C -bicarbonato (Tabla 6): en todos los casos TAG resultó ser el principal producto seguido de DAG y PC, lo que nos indica que el material experimental utilizado rutinariamente en este trabajo, cortes de tejido, reproduce el metabolismo lipídico del órgano intacto.

TABLA 12. Distribución de la actividad biosintética, como medida de $^{14}\text{CO}_2$, entre epicarpo y mesocarpo de aceitunas enteras.

Tejido	Incorporación (nmol/g)	Distribución (%)			
		TAG	DAG	PC	Otros LP
Fruto entero	25.4 ± 1.4	62	20	5	13
Epicarpo	65.3 ± 6.9	60	20	6	14
Mesocarpo	8.5 ± 1.2	50	27	7	16

Frutos recolectados la 21 SDF, expuestos a $^{14}\text{CO}_2$, 18 h, bajo iluminación (4000lux). Incorporación en glicerolípidos en nmoles de $^{14}\text{CO}_2$ /g tejido (peso fresco). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol; LP, lípidos polares; PC, fosfatidilcolina; TAG, triacilglicerol.

Las tasas de incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en glicerolípidos reseñados en la tabla 13 han sido calculadas sobre la base de la radioactividad específica del ^{14}C -bicarbonato utilizado para su formación. Sin embargo, y debido a que las incubaciones se realizaron en sistemas cerrados (ver apartado 2.4.2), la radioactividad específica del precursor se vió diluida por el CO_2 desprendido como consecuencia de la respiración de los frutos. Como se muestra en la figura 24, el porcentaje de CO_2 en la atmósfera de la cámara de incubación aumenta progresivamente hasta alcanzar un punto de compensación de 3.7% a las 10 horas del inicio de la exposición, lo que representa un aumento en dos órdenes de

magnitud de la concentración de CO_2 . Debe entenderse, por tanto, que las tasa de incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ están altamente subestimadas.

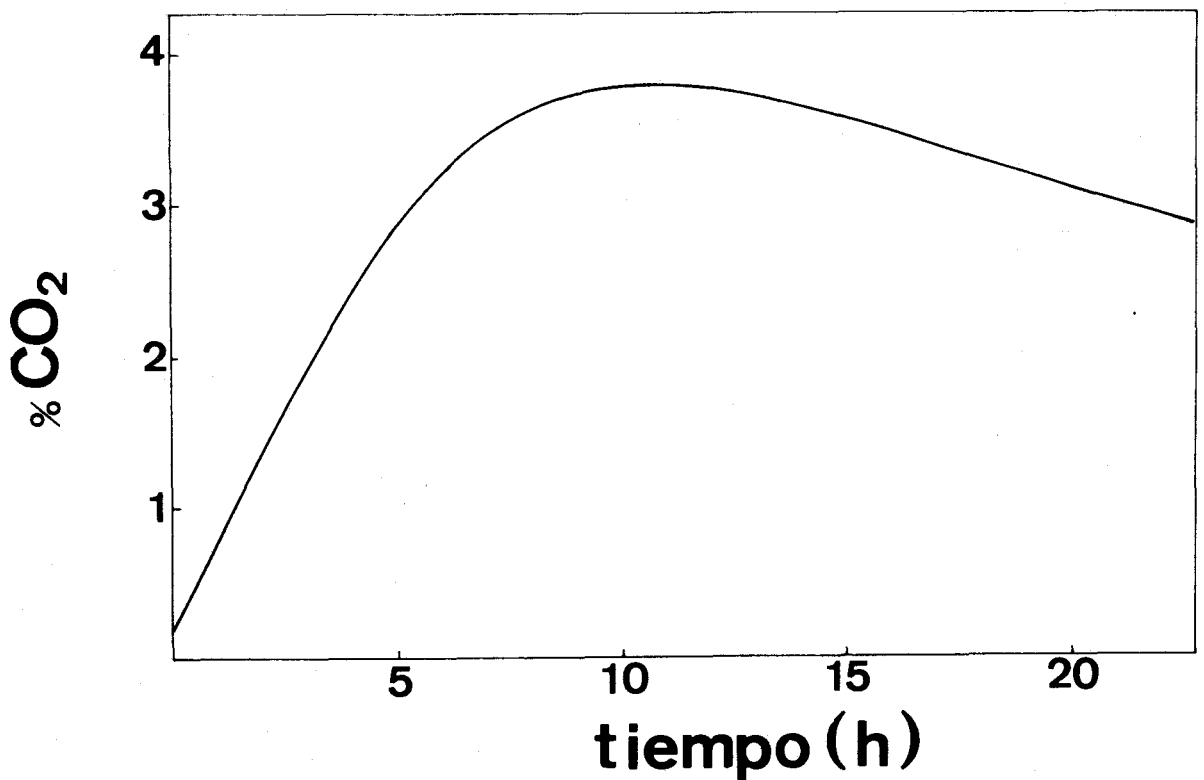


FIGURA 24. Variación con el tiempo del nivel de CO_2 presente en la cámara de incubación.

Por otra parte, cuando frutos incubados con $^{14}\text{CO}_2$ fueron sometidos a la separación de tejidos se encontró que, en concordancia con los resultados anteriores, el epicarpo acumulaba la mayor parte de la radioactividad incorporada en glicerolípidos (Tabla 12).

3.3.3 Sobre la participación relativa de Rubisco y PEP carboxilasa en la fijación de ^{14}C -bicarbonato

Los resultados obtenidos en nuestras experiencias demuestran que la aceituna en desarrollo es capaz de fijar CO_2 atmosférico, una actividad que ha sido demostrada en otros frutos tales como naranja (Bean y Todd, 1960) o manzana (Hansen, 1970), e incorporarlo en glicerolípidos, actividad que no había sido descrita con anterioridad en frutos.

La formación de lípidos y productos hidrosolubles a partir de bicarbonato radioactivo requiere la acción de enzimas carboxilantes. La acetil-CoA carboxilasa cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato. Sin embargo, el mismo átomo de carbono fijado en esta reacción es subsecuentemente liberado en la reacción de condensación catalizada por las β -cetoacil sintasas (Fig.3); no se produce por tanto fijación neta de CO_2 en lípidos a través de esta enzima. Las otras dos enzimas carboxilantes posibles participantes de la fijación de CO_2 son la Rubisco y la PEP carboxilasa, ambas puestas de manifiesto en tejido de pulpa de aceituna (Tabla 10).

Así en la luz, el CO_2 es fijado en los cloroplastos del fruto a través del ciclo de Calvin por acción de la Rubisco (Fig.25a). Esto traerá consigo la formación de los precursores hidrosolubles básicos de la formación de glicerolípidos, acetil-CoA y glicerol-3-fosfato. Por otro lado, los azúcares importado por el fruto vía floema

suministran esqueletos carbonados para rutas de biosíntesis, como es el caso del glicerol-3-fosfato, y combustible para la respiración. El CO_2 liberado como consecuencia de la respiración mitocondrial, es fijado por la PEP carboxilasa hacia la formación de oxalacetato. Pero este CO_2 fijado es liberado posteriormente por la enzima málica. Por lo tanto no existe fijación neta de CO_2 a través de la acción de la PEP carboxilasa, aunque el CO_2 desprendido en la respiración mitocondrial puede ser reciclado a través del ciclo de Calvin. En definitiva, la fotosíntesis lipídica en pulpa de aceituna tiene lugar a través del ciclo de Calvin, debido a la alta actividad del tejido exterior, epicarpo, el cual es el único expuesto a altas radiaciones y en donde se concentra la Rubisco (Tabla 10) y la síntesis de glicerolípidos es dependiente de la luz (Tabla 9).

Sin embargo, aunque la capacidad de la pulpa de aceituna de fijar ^{14}C -bicarbonato en glicerolípidos es una actividad esencialmente dependiente de la luz (Tabla 6), nuestros resultados muestran así mismo que cierta incorporación se produjo en glicerolípidos de ambos tejidos de la pulpa de aceituna en condiciones de oscuridad (Tabla 9). Como se muestra en la figura 25b, en la oscuridad el bicarbonato radioactivo puede ser fijado en oxalacetato por la acción de la PEP carboxilasa. Hace tiempo algunos autores pusieron de manifiesto en plantas la formación de malonato a partir de oxalacetato (Huffaker y Wallace, 1961; de Vellis y col., 1963; Shannon y col., 1963). Una vez formado el malonato, podría ser convertido en malonil-CoA, por la acción de la malonil-CoA sintetasa (Kim y Chae, 1991). La incorporación de ^{14}C -malonato en glicerolípidos se ha mostrado

anteriormente (Tabla 2). Esto implicaría la participación de la PEP carboxilasa en la fijación neta de CO₂ en glicerolípidos de pulpa de aceituna, más concretamente en su parte acílica que explicaría los datos obtenidos, aunque bajos, en el epicarpo y mesocarpo cuando se incuban con ¹⁴C-bicarbonato en la oscuridad (Tabla 9), teniendo en cuenta que esta enzima está repartida por igual en ambos tejidos (Tabla 10).

En cualquier caso, los resultados en su conjunto demuestran la naturaleza fotosintética de la aceituna en desarrollo, aunque no informan acerca de la contribución relativa de la fotosíntesis del fruto en comparación con la fotosíntesis de la hoja en la formación de TAG.

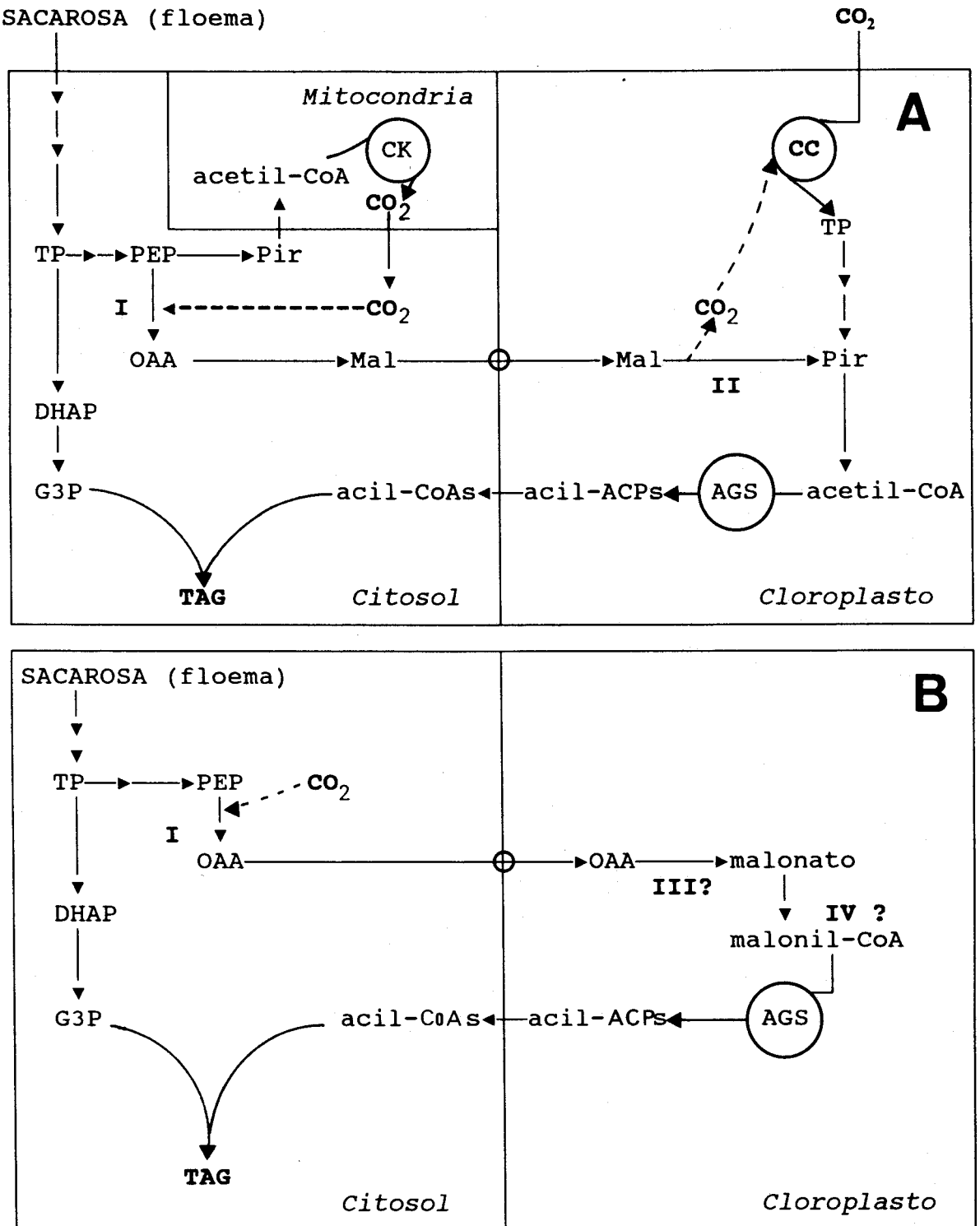


FIGURA 25. Participación relativa de Rubisco y PEP carboxilasa en la fijación de CO₂ en glicerolípidos. (A) Luz, (B) oscuridad. I, PEP carboxilasa; II, Enzima málico; III, peroxidasa?; IV, malonil-CoA sintetasa. Abreviaturas usadas: AGS, ácido graso sintasa; CC, ciclo de Calvin; CK, ciclo de Krebs; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; G3P, glicerol-3-fosfato; Mal, malato; OAA, oxalacetato; PEP, fosfoenilpiruvato; Pir, piruvato; TAG, triacilglicerol.

CONCLUSIONES

1. En el desarrollo de la aceituna se distinguen tres etapas. La primera, que comprende las 10-12 primeras SDF, se caracteriza por un aumento lineal del tamaño del fruto, que llega a alcanzar casi la mitad de su peso final. La segunda, que se inicia con la lignificación del endocarpo, se extiende unas 20 semanas y en ella tiene lugar la síntesis y acumulación de TAG de reserva. La tercera es la etapa de maduración, caracterizada por el cambio de color de las aceitunas.

2. Durante la etapa de acumulación de TAG, la pulpa de aceituna muestra una elevada capacidad de síntesis de lípidos, principalmente TAG, a partir de precursores radioactivos tales como acetato, piruvato, bicarbonato y CO_2 .

3. La biosíntesis de lípidos a partir de acetato en aceitunas en desarrollo es estimulada por la luz, pero el efecto no se produce en frutos maduros una vez que tiene lugar el cambio de color. Esto indica que la formación de lípidos en aceituna tiene relación con la fotosíntesis del fruto.

4. La aceituna en desarrollo es capaz de fijar bicarbonato e incorporarlo en glicerolípidos, incluyendo TAG, y compuestos hidrosolubles, principalmente azúcares. Esta actividad es esencialmente dependiente de la luz, lo que demuestra su carácter fotosintético.

5. En la pulpa de aceituna se reconocen dos capas de células bien diferenciadas: el epicarpo, constituido por células ricas en cloroplastos, y el mesocarpo, formado por células parenquimatosas que acumulan lípidos. En las células del epicarpo, la biosíntesis de ácidos grasos (incorporación de ^{14}C -acetato) es estimulada por la luz, mientras que en el mesocarpo dicha actividad no se ve afectada por la luz. La fijación de ^{14}C -bicarbonato, así como la actividad ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, se concentra en el epicarpo y es dependiente de la luz. El doble carácter, autotrófico y heterotrófico, de la aceituna parece ascribirse a la existencia de estos dos tejidos.

6. Se demuestra que las aceitunas en desarrollo son capaces de fijar CO_2 atmosférico y utilizarlo en la biosíntesis de TAG de reserva. Estos resultados sugieren que la fotosíntesis del fruto puede que participe significativamente en la biogénesis de aceite de oliva.

BIBLIOGRAFÍA

- Bang SK y Sam KY (1990) Chemical modification of *Pseudomonas fluorescens* malonyl-CoA synthetase with pyridoxal-5'-phosphate. Han'guk Saenghwa Hakhoechi 23, 276-280.
- Barone E Gullo G Zappia R y Inglese P (1994) Effect of crop load on fruit ripening and oil (*Olea europea* L) quality. J. Hort. Sci. 69, 67-73.
- Bean RC y Todd GW (1960) Photosynthesis and respiration in developing fruits. I. $^{14}\text{CO}_2$ uptake by young oranges in light and dark. Plant Physiol. 35, 425-429.
- Beck JC y Levine RP (1977) Synthesis of chloroplast membrane lipids and chlorophyll in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta 489, 360-369.
- Bertrans M y Heinz E (1981) Positional specificity and fatty acid selectivity of purified sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases from chloroplasts. Plant Physiol. 68, 653-657.
- Blanke MM Notton BA y Hucklesby DP (1986) Physical and kinetic properties of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase in developing apple fruit. Phytochem. 25, 601- 606.
- Blanke MM y Lenz F (1989) Fruit photosynthesis. Plant Cell Environ 12, 31-46.
- Bollard EG (1970) The physiology and nutrition of developing fruits En: The Biochemistry of Fruits and their products, vol.1 (Hulmes AC, ed.). Academic Press. London, pp 387-425.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Bravdo BA Lurie S y Frenkel C (1977) Changing ribulose diphosphate carboxylase/oxygenase activity in ripening tomato fruit. Plant Physiol. 60, 309-312.
- Brockhoff H (1975) Determination of the positional distribution of fatty acids in glycerolipids En: Methods of Enzymology, vol.35 (Lowenstein JM, ed.). Academic Press. Nueva York, pp 315-325.
- Browse JA y Slack CR (1981) Catalase stimulates linoleate desaturation in microsomes preparations from developing linseed cotyledons. FEBS Lett. 131, 111-114.

- Browse JA y Slack CR (1983) The effects of temperature and oxygen on the rates of fatty acid synthesis and oleate desaturation in safflower (*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochim. Biophys. Acta* 753, 145-152.
- Browse JA y Somerville M (1991) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42, 467-506.
- Camp PJ y Randall DD (1985) Purification and characterization of the pea chloroplast pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* 77, 571-577.
- Cao Y-Z y Huang AHC (1986) Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and others species. *Plant Physiol.* 82, 813-820.
- Carelli AA y Cert A (1993) Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. *J. Chromatog.* 630, 213-222.
- Caughey I y Kekwick RGO (1982) The characteristics of some components of the fatty acid synthetase system in the plastid from the mesocarp of avocado (*Persea americana*) fruit. *Eur. J. Biochem.* 123, 553-561.
- Cheerbrough TM (1989) Changes in the enzymes for fatty acid synthesis and desaturation during acclimation of developing soybean seeds to altered growth temperature. *Plant Physiol.* 90, 760-764.
- Chuman L y Brody S (1989) Acyl carrier protein is present in the mitochondria of plants and eukaryotic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* 184, 643-649.
- Coombe BG (1976) The development of fleshy fruits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 507-528.
- Davies E (1987) Plant responses to wounding. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 12 (Davies DD, ed.). Academic Press. San Diego, pp 243-264.
- De Vellis J Shannon LM y Lew JY (1963) Malonic acid biosynthesis in bush bean roots I Evidence for oxalacetate as intermediate precursor. *Plant Physiol.* 38, 689-690.
- Demandre C Trémolières A Justin AM y Mazliak P (1986) Oleate desaturation in six phosphatidylcholine molecular species from potato tuber microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 877, 380-386.
- Dennis DT y Miernyk JA (1982) Compartmentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 27-50.

- Denger K y Smith AM (1988) The capacity of plastids from developing pea cotyledons to synthesise acetyl-CoA. *Planta* 173, 172-182.
- Donaire JP y López-Gorgé J (1978) Lipid synthesis in leaf and fruit of olive. *J. Exp. Bot.* 29, 49-54.
- Donaire JP Belver A Rodríguez-García MI y Mejías L (1984) Lipid biosynthesis, oxidative enzymes activities and cellular changes in growing olive fruit. *Rev. Esp. Fisiol.* 40, 191-204.
- Duran-Grande M y Tamayo AI (1964) Estudios sobre la estructura histológica del fruto *Olea europea* L. Variedad zorzaleña. *Grasas y Aceites* 15, 72-86.
- Fernández JM (1971) The Olive En: The Biochemistry of Fruits and their products, vol.2 (Hulmes AC, ed.). Academic Press. London, pp 255-279.
- Finlayson SA y Dennis DT (1980) NAD⁺-specific glycerol-3-phosphate dehydrogenase from developing castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 179-185.
- Finlayson SA y Dennis DT (1983) Acetyl-CoA carboxylase from the developing endosperm of *Ricinus communis*. Isolation and characterisation. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 576-581.
- Folch J Lee M y Sloane-Slanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Frenztzen M Heinz E McKeon TA y Stumpf PK (1983) Specificities and selectivities of glycerol 3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol 3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 129, 629-636.
- Galeazzi M y Sgarbieri VC (1981) Substrate specificity and inhibition of PPO from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L). *J. Food Sci.* 46, 1404-1406.
- Gaydou EM Lozano Y y Ratovohery J (1987) Triglyceride and fatty acid composition in the mesocarp of *Persea americana* during fruit development. *Phytochem.* 26, 1595-1597.
- Gee RW Byerrum RU Gerber DW y Tolbert NE (1988) Dihydroxyacetone phosphate reductase in plants. *Plant Physiol.* 86, 98-103.
- Geeraert E (1987) Chromatography of lipids in biomedical research and clinical diagnosis En: *Journal of Chromatography Library*, vol.37 (Kukus A, ed.). Elsevier. Amsterdam, pp 48-75.

- Gennity JM y Stumpf PK (1985) Studies on the $\Delta 12$ desaturase of *Carthamus tinctorius* L. Arch. Biochem. Biophys. 239, 444-454.
- Giroud C y Eichenberger W (1989) Lipids of *Clamydomonas reinhardtii*. Incorporation of [^{14}C] acetate, [^{14}C] palmitate and [^{14}C] oleate into different lipids and evidence for lipid-linked desaturation of fatty acids. Plant Cell Physiol. 30, 121-128.
- Graciani E (1988) Caracterización del aceite de oliva virgen español. III Posibilidad de caracterización por variedades de aceituna o por zonas de producción de acuerdo con su contenido en triacilglicérol. Grasas y Aceites 39, 105-110.
- Griffiths G Stobart AK y Stymne S (1985) The acylation of *sn*-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. Biochem. J. 230, 379-388.
- Griffiths G (1986) "Aspects of triacylglycerol biosynthesis in developing oilseeds". PhD Thesis, University of Bristol. Inglaterra.
- Griffiths G Stymne S y Stobart AK (1988) The utilization of fatty acid substrates in triacylglycerol biosynthesis by tissue-slices of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons. Planta 173, 309-316.
- Golz A y Lichtenthaler HK (1993) Isolation and characterization of acetyl-CoA synthetase from etiolated radish seedlings. J. Plant Physiol. 141, 276-280.
- Gunstone FD y Norris FA (1983) "Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology". Pergamon Press-Oxford. U.K., pag. 175.
- Gurr MI (1980) The biosynthesis of triacylglycerols En: The Biochemistry of Plants, vol.4 (Stumpf PK, ed.). Academic Press. Nueva York, pp 205-248.
- Hansen P (1970) ^{14}C -Studies on apple trees V. Translocation of labelled compounds from leaves to fruit and their conversion within the fruit. Physiol. Plant 23, 564-573.
- Hara A y Radin NS (1978) Lipid extraction of tissue with a low-toxicity solvent. Anal. Biochem. 90, 420-426.
- Harwood JL (1979) The synthesis of acyl lipids in the plant tissues. Prog. Lipid Res. 18, 55-86.

- Harwood JL (1988) Fatty acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 101-138.
- Hatch MD y Stumpf PK (1961) Fat metabolism in higher plants. XVI Acetyl coenzyme A carboxylase and acyl coenzyme A-malonyl coenzyme A transcarboxylase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* 262, 2879-2885.
- Haus M y Wegmann K (1984) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) from *Dunaliella tertiolecta*. I. Purification and kinetics properties. *Physiol. Plant* 60, 283-288.
- Hawke JC y Leech RM (1987) Acetyl-CoA carboxilase activity in normally developing wheat leaves. *Planta* 171, 489-495.
- Hippmann H y Heinz E (1976) Glycerol kinase in leaves. *Z. Pflanzenphysiol* 79, 408-418.
- Huang AH (1975) Enzymes of glycerol metabolism in the storage tissues of fatty seedlings. *Plant Physiol.* 55, 555-558.
- Huffaker RC y Wallace A (1961) Malonate synthesis via carbon dioxide fixation in bush bean roots. *Biochim. Biophys. Acta* 46, 403-405.
- Ichihara K y Noda M (1980) Fatty acid composition and lipid synthesis in developing safflower seeds. *Phytochem.* 19, 49-54.
- Ichihara K y Noda M (1982) Some properties of diacylglycerol acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. *Phytochem.* 21, 1895-1901.
- Ichihara K (1984) *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase in a particular fraction from maturing safflower seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 685-698.
- Ichihara K Kakahashi T y Fujii S (1988) Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds; its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 958, 125-129.
- Jackowski S y Rock CO (1987) Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase, a potential regulator of fatty acid biosynthesis in bacteria. *J. Biol. Chem.* 262, 7927-7931.
- Jaworski JG (1987) Biosynthesis of monoenoic and polyenoic fatty acids En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 9 (Stumpf PK, ed.). Academic Press. Nueva York, pp 159-214.

- Jaworski JG Clough RC y Barnum SR (1989) A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* 90, 41-44.
- Joyard J y Stumpf PK (1981) Synthesis of long chain acyl-CoA in chloroplast envelope membranes. *Plant Physiol.* 67, 250-256.
- Kannangara CG y Stumpf PK (1972) Fat metabolism in higher plants. LIV. A procaryotic type acetyl-CoA carboxylase in spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 83-91.
- Kennedy TP (1961) Biosynthesis of complex lipids. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 934-940.
- Keys AJ y Parris MA (1990) Ribulose biphosphate carboxylase /oxygenase and carbonic anhidrase En: *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 3 (Lea PJ, ed.), pp 1-14.
- Kim YS y Chae HZ (1991) Purification and properties of malonyl-CoA synthetase from *Rhizobium japonicum*. *Biochem. J.* 273, 511-516.
- Kirch T Gerber DW Byerrum RU y Tolbert NE (1992) Plant dihydroxyacetone phosphate reductases. Purification, characterization and utilization. *Plant Physiol.* 100, 352-359.
- Kuhn DN Knauf M y Stumpf PK (1981) Subcellular localization of acetyl-CoA synthetase in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 441-450.
- Kwanyven P y Wilson RF (1986) Isolation and purification of diacylglycerol acyltransferase from germinating soybean cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta* 877, 238-245.
- Liedvogel B y Stumpf PK (1982) Origin of acetate in spinach leaf cell. *Plant Physiol.* 69, 897-903.
- Liedvogel B (1985) Acetate concentration and chloroplast pyruvate dehydrogenase complex in *Spinacea oleracea* leaf cells. *Z. Naturforsch* 40c, 188-189.
- Luthra R Munshi SK y Sukhija PS (1991) Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 137, 312-318.
- Mancha M (1978) Lípidos sintetizados por la pulpa de aceitunas a partir de precursores marcados con carbono-14. *Grasas y Aceites* 29, 263-268.

- Mangold HK (1961) Thin-layer chromatography of lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 38, 708-727.
- Marti JT (1990) En: El Olivo, situación y perspectivas en Tarragona IV (Institut d'Estudis Tarraconenses Ramón Berenguer, ed.). Tarragona, pp 20-31.
- Martin BA y Wilson RF (1983) Properties of diacylglycerol acyltransferase from spinach leaves. Lipids 18, 1-6.
- Martin BA y Wilson RF (1984) Subcellular localization of triacylglycerol synthesis in spinach leaves. Lipids 19, 117-121.
- Marzouk B y Cherif A (1981) La lipogenese dans l'olivo. I. Formation des lipides neutres. Oléagineux 36, 77-82.
- Marzouk B y Cherif A (1984) Glycerolipid biosynthesis in olive fruits (*Olea europea* L) En: Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids (Siegenthaler P-A y Eichenberger W, ed.). Elsevier. Amsterdam, pp 157-160.
- McKee JWA y Hawke JC (1978) The incorporation of ^{14}C -bicarbonate and $^{14}\text{CO}_2$ into the constituent fatty acids of monogalactosyldiacylglycerol by spinach chloroplasts and leaves. FEBS Lett. 94, 273-276.
- McKeon TA y Stumpf PK (1982) Purification and characterization of the stearyl-ACP desaturase and the acyl-ACP thioesterase from maturing seeds of safflower. J. Biol. Chem. 257, 2141-12147.
- Mohan SB y Kekwick GO (1980) Acetyl-CoA carboxylase from avocado plastids and spinach chloroplasts. Biochem. J. 187, 667-676.
- Mukherjee KD (1986) Elongation of (n-9) and (n-7) *cis*-monounsaturated and saturated fatty acids in seeds of *Sinapsis alba*. Lipids 21, 347-352.
- Murphy DJ y Leech RM (1977) Lipid biosynthesis from [^{14}C] bicarbonate, [$2\text{-}^{14}\text{C}$] pyruvate and [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetate during photosynthesis by isolated spinach chloroplasts. FEBS Lett. 77, 164-168.
- Murphy DJ y Leech RM (1978) The pathway of [^{14}C] bicarbonate incorporation into lipids in isolated photosynthesizing spinach chloroplasts. FEBS Lett. 88, 192-197.
- Murphy DJ y Leech RM (1981) Photosynthesis of lipids from $^{14}\text{CO}_2$ in *Spinacia oleracea*. Plant Physiol. 68, 762-765.

- Murphy DJ Woodrow IE y Mukherjee KD (1985) Substrate specificities of the enzymes of the oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochem. J.* 225, 267-270.
- Newcomb EH y Stumpf PK (1952) Fat metabolism in higher plants. I. biogenesis of higher fatty acids by slices of peanut cotyledons in vitro. *J. Biol. Chem.* 200, 233-239.
- Nikolau BJ Hawke JC y Slack CR (1981) Acetyl-coenzyme A carboxilase in maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 605-612.
- Ohlrogge JB Pollard MR y Stumpf PK (1978) Studies of biosynthesis of waxes in developing jojoba seed tissue. *Lipids* 13, 203-210.
- Ohlrogge JB Kuhn DN y Stumpf PK (1979) Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1194-1198.
- Oo KC Teh S-K Khor H-T y Augustine SH (1985) Fatty acid synthesis in the oil palm (*Elaeis guineensis*): incorporation of acetate by tissue slices of the developing fruit. *Lipids* 20, 205-210.
- Overath P y Stumpf PK (1964) Properties of a soluble fatty acid synthetase from avocado mesocarp. *J. Biol. Chem.* 239, 4103-4220.
- Piechulla B Glick RE Bahl H Melis A y Grisse W (1987) Changes in photosynthetic capacity and photosynthetic protein pattern during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.* 84, 911-917.
- Propuesta UNE 55079 (1972) Determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos situados en la posición β de los triglicéridos. *Grasas y Aceites* 23, 56-60.
- Propuesta UNE 55030 Determinación del contenido en materia grasa total de la aceituna.
- Redgwell RJ (1980) Fractionation of plant extracts using ion-exchange Sephadex. *Anal. Biochem.* 107, 44-50.
- Rodríguez de la Borbolla JM Fernández MJ y González F (1955) Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. *Grasas y Aceites* 6, 5-22.
- Romano B Frengnelli G Preziosi R y Tamagnini A (1980) Osservazioni citologiche e istologiche delle cellule del mesocarpo della drupa di *Olea europea* durante la maturazione. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 57, 192-197.

- Roughan PG Holland R y Slack CR (1979a) On the control of long chain fatty acid synthesis in isolated intact spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplast. *Biochem. J.* 184, 193-202.
- Roughan PG Holland R Slack CR y Mudd JB (1979b) Acetate is the preferred substrate for long chain fatty acid synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Biochem. J.* 184, 565-569.
- Roughan PG y Slack CR (1982) Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 97-132.
- Roughan PG Thompson GA y Cho SH (1987) Metabolism of exogenous long-chain fatty acids by spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 481-496.
- Roughan PG y Ohlrogge JB (1994) On the assay of acetyl-CoA synthetase activity in chloroplasts and leaf extracts. *Anal. Biochem.* 216, 77-82.
- Rutter AJ Sánchez J y Harwood JL (1992) Triacylglycerol synthesis by microsomal fractions from olive cultures. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 171S.
- Sánchez J y Mancha M (1980) Separation and analysis of acylthioesters from higher plants. *Phytochem.* 19, 817-820.
- Sánchez J y Mancha M (1981) Synthesis of acyl-CoAs by isolated spinach chloroplasts in relation to added CoA and ATP. *Planta* 153, 519-523.
- Sánchez J y Stumpf PK (1984) The effect of the hypolipidemic drugs WY 14643 and DH 990 and lysophospholipids on the metabolism of oleate in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 185-196.
- Sánchez J del Cuvillo MT y Harwood JL (1992a) Glycerolipid biosynthesis by microsomal fractions from olive fruits. *Phytochem.* 31, 129-134.
- Sánchez J del Cuvillo MT y Harwood JL (1992b) Fruit photosynthesis and lipid biosynthesis in olives. En: *Metabolism Structure and Utilization of Plant Lipids* (Cherif A, ed.). Centre National Pédagogique. Tunis, pp 39-42.
- Sánchez J y Harwood JL (1992) Fatty acid synthesis in soluble fractions from olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Plant Physiol.* 140, 402-408.
- Santora GT Gee R y Tolbert NE (1979) Isolation of a *sn*-glycerol-3-phosphate:NAD oxidoreductase from spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 403-411.
- Sauer A y Heise K-P (1983) On the light dependence of fatty acid synthesis in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 73, 11-15.

- Sauer A y Heise K-P (1984) Regulation of acetyl-coenzyme A carboxilase and acetyl-coenzyma A synthetase in spinach chloroplasts. *Z. Naturforsch* **39c**, 268-275.
- Sciancalepore V y Longone V (1984) Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 320-321.
- Shannon LM De Vellis J y Lew JY (1963) Purification and properties of enzyme catalizing oxidative descarboxylation of oxalacetate. *Plant Physiol.* **38**, 691-697.
- Shimakata T y Stumpf PK (1982a) Isolation and function of spinach leaf β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5808-5812.
- Shimakata T y Stumpf PK (1982b) Purification and characterization of β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, β -hidroxy-acyl-[acyl-carrier-protein] dehydrase and enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase from *Spinacia oleracea* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**, 7791-
- Shimakata T y Stumpf PK (1983) Purification and characterization of β -ketoacyl-ACP synthetase 1 from *Spinacea oleracea* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**, 39-45.
- Shine WE Mancha M y Stumpf PK (1976) The function of acyl thioesterases in the metabolism of acyl-CoA's and acyl-acyl carrier proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 110-116.
- Simcox PD Garland W De Luca V Canvin DT y Dennis DT (1979) Respiratory pathways and fat synthesis in the developing castor oil seed. *Can. J. Bot.* **57**, 1008-1014.
- Simoni RD Criddle RS y Stumpf PK (1967) Purification and properties of plant and bacterial acyl carrier proteins. *J. Biol. Chem.* **242**, 573-581.
- Slack CR Roughan PG y Balasingham N (1977) Labelling studies *in vivo* on the metabolism of the acyl and glycerol moieties of the glycerolipids in the developing maize leaf. *Biochem. J.* **162**, 286-289.
- Slack CR Roughan PG y Balasingham N (1978) Labelling of glycerolipids in the cotyledons of developing oil seeds by [1-¹⁴C] acetate and [2-³H] glycerol. *Biochem. J.* **170**, 421-423.

- Slack CR Campbell LC Browse JA y Gardiner SE (1983) Some evidence for the reversibility of the choline-phosphotransferase catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 754, 10-20.
- Slack CR y Browse JA (1984) Synthesis of storage lipids in developing seeds. En: *Seed Physiology*, vol.1 (Murray DR, ed.). Academic Press. Sidney, pp 209-243.
- Slack CR Roughan PG Browse JA y Gardiner SE (1985) Some properties of cholinephosphotransferase from developing safflower cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta* 833, 438-448.
- Springer J y Heise K-P (1989) Comparison of acetate and pyruvate-dependent fatty acid synthesis by spinach chloroplasts. *Planta* 177, 417-421.
- Stobart AK y Stymne S (1985a) The regulation of the fatty acid composition of the triacylglycerol in microsomal preparation from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. *Planta* 163, 119-125.
- Stobart AK y Stymne S (1985b) The interconversion of diacylglycerol and phosphatidylcholine during triacylglycerol production in microsomal preparations of developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L). *Biochem. J.* 232, 217-221.
- Stobart AK y Stymne S (1990) Triacylglycerol biosynthesis. En: *Methods in Plant Biochemistry*, vol.4 (Harwood JL y Bowyer JR, ed.). Academic Press. London, pp 19-46.
- Stokes DM y Walker DA (1972) Photosynthesis by isolated chloroplasts. Inhibition by DL-glyceraldehyde of carbon dioxide assimilation. *Biochem. J.* 128, 1147-1157.
- Stumpf PK (1980) Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids. En: *The Biochemistry of Plants*, vol.4 (Stumpf PK, ed.). Academic Press. Nueva York, pp 177-203.
- Stumpf PK (1984) Fatty acid biosynthesis in higher plants. En: *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation* (Numa S, ed.). Elsevier. Amsterdam, pp 155-199.
- Stymne S y Applegqvist L-A (1980) The biosynthesis of linoleate and linolenate in homogenates from developing soybean cotyledons. *Planta Sci. Lett.* 17, 287-294.

- Stymne S Stobart AK y Glad G (1983) The role of the acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-carbon fatty acids and triacylglycerol production in the microsomes of developing safflower seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 752, 198-208.
- Stymne S y Stobart AK (1984) The biosynthesis of triacylglycerol in the microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower. *Biochem. J.* 220, 481-488.
- Stymne S y Stobart AK (1985) Oil synthesis *in vitro* in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164, 101-104.
- Stymne S y Stobart AK (1986) The effect of temperature on the activity of 2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine desaturated in modified microsomal membranes from the cotyledons of maturing safflower seed. *Physiol. Veg.* 24, 45-57.
- Stymne S y Stobart AK (1987) Triacylglycerol biosynthesis. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 9 (Stumpf PK, ed.). Academic Press. Nueva York, pp 175-214.
- Thorner JW y Paulus H (1971) Composition and subunit structure of glycerol kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246, 3885-3894.
- Treede H-J y Heise K-P (1985) The regulation of acetyl coenzyme A synthesis in chloroplasts. *Z. Naturforsch* 40c, 496-502.
- Treede H-J Riens B y Heise K-P (1986) Species-specific differences in acetyl coenzyme A synthesis of chloroplasts. *Z. Naturforsch* 41c, 733-740.
- Treede H-J y Heise K-P (1986) Purification of the chloroplast pyruvate dehydrogenase complex from spinach and maize mesophyll. *Z. Naturforsch* 41c, 1011-1017.
- Trémolières A Drapier D Dubacq JP y Mazliak P (1980) Oleoyl-Coenzyme A metabolism by subcellular fractions from growing pea leaves. *Plant Sci. Lett.* 8, 157-269.
- Turnham E y Northcote DH (1982) The use of acetyl-CoA carboxylase activity and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Biochem. J.* 208, 323-332.
- Turnham E y Northcote DN (1983) Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rapeseed formation. *Biochem. J.* 212, 223-229.

- Tyson J Stevenson JH y Ozand PT (1976) Mitochondrial glycerol kinase activity in rat brain. *Biochem. J.* 157, 513-516.
- Vázquez A (1965) Química del olivo. III. Los componentes orgánicos. *Grasas y Aceites* 16, 292-303.
- Vázquez A y Mancha M (1970) Transformación de los glicéridos durante la maduración de la aceituna. I. Ácidos grasos totales de los di y triglicéridos. *Grasas y Aceites* 21, 80-86.
- Vijay IK y Stumpf PK (1972) Fat metabolism in higher plants. XLVIII. Properties of oleoyl coenzyme A desaturase of *Carthamus tinctorius*. *J. Biol. Chem.* 247, 360-366.
- Von Korff RW (1969) Purity and stability of pyruvate and α -ketoglutarate. *Methods Enzymol.* 13, 519-523.
- Walsh MC Klopfenstein WE y Harwood JL (1990) The short chain condensing enzyme has a widespread occurrence in the fatty acid synthetases from higher plants. *Phytochem.* 29, 3797-3799.
- Wanner G Formanek H y Theimer RR (1981) The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* 151, 109-123.
- Weselake RJ Taylor DC Pomeroy MK Lawson SL y Underhill EW (1991) Properties of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Phytochem.* 30, 3533-3538.
- Willmer CM y Johnston WR (1976) Carbon dioxide assimilation in some aerial plant organs and tissues. *Planta* 130, 33-37.
- Wilson RF y Rinne RW (1976) Effect of freezing and cold storage on phospholipids in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 70, 270-273.
- Wishnick M y Lane MD (1971) Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Methods Enzymol.* 23, 570-577.
- Wodner M Lavee S y Epstein E (1988) Identification and seasonal changes of glucose, fructose and mannitol in relation to oil accumulation during fruit development in *Olea europaea* (L.). *Sci. Hortic.* 30, 47-54.
- Woodrow IE y Berry JA (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 533-594.

Yamada M y Nakamura Y (1975) Fatty acid synthesis by spinach chloroplasts. II. The path from PGA to fatty acids. *Plant Cell Physiol.* 16, 151-162.

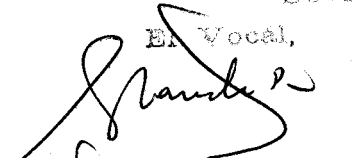
Zeiger CA y Randall DD (1991) Spinach leaf acetyl-coenzyme A synthetase: purification and characterization. *Plant Physiol.* 96, 382-389.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.ª TERESA DEL CUELLO PALOMINO titulada BIOSÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN PULPA DE ACEITUNA EN DESARROLLO: PAPEL DE LA FOTOSÍNTESIS DEL FRUTO. acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

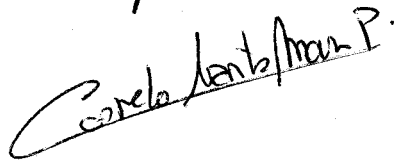
Sevilla, 24 de junio 1994

El Vocal,


El Presidente

El Vocal,


El Secretario,


Carmelo Antón San P.

El Vocal,


El Doctorado,

