

PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES VOLÁTILES DURANTE MADURACIÓN DE LOS FRUTOS

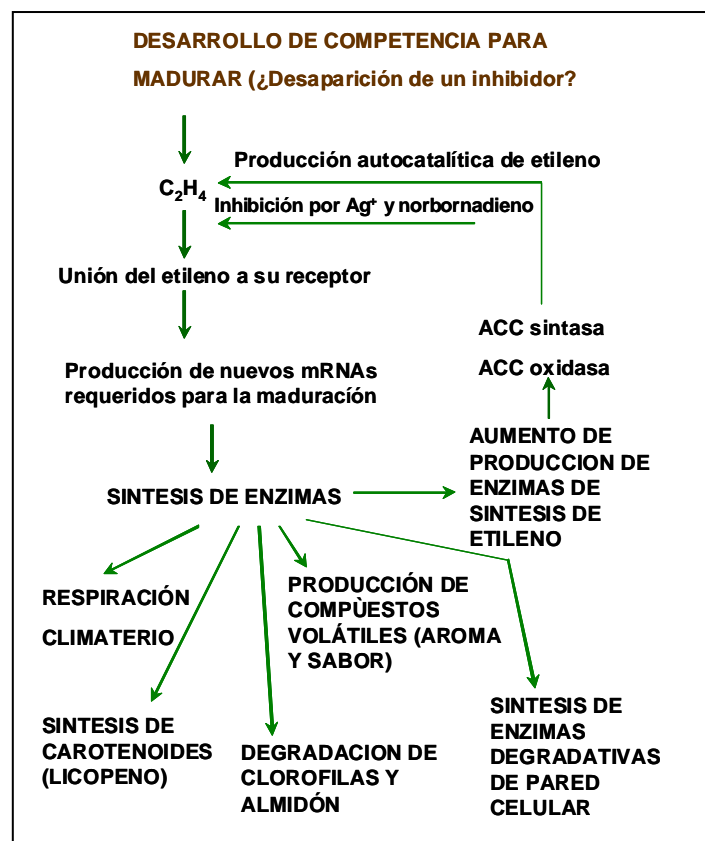
Judit Asenjo Vera
 Laura Morales de los Ríos Martín
 Raquel Sainz Urruela
 Lidia Tapia Hernández

1- Introducción

La maduración de los frutos puede ser definida como la secuencia de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que conducen a la formación de un fruto apto para el consumo humano.

- El fruto alcanza su tamaño potencial máximo
- Se reduce la velocidad de crecimiento
- Disminuye la concentración del inhibidor de la maduración
- Se agotan los promotores de las semillas maduras
- Se trata de un proceso programado genéticamente

Estos cambios se dan a tres niveles: físicos, metabólicos y cambios en la expresión génica.



CAMBIOS FÍSICOS

-Cambios de color: Los cloroplastos de las células del fruto sufren un desmantelamiento, que acaba con las clorofilas. Este fenómeno desenmascara otros pigmentos existentes, como los carotenoides (β -caroteno, licopeno). Además, la maduración implica la síntesis de novo de pigmentos, como las antocianinas. Esto provoca un cambio en el color del fruto, que deja de ser verde.

-**Alteraciones en el sabor:** cambios en la acidez, astringencia y dulzor. En la respiración hay una degradación oxidativa de los materiales de reserva (compuestos carbonados: almidón) del fruto que da lugar a compuestos sencillos como los azúcares y ácidos orgánicos. Por ello los frutos son dulces. También por este proceso de catabolismo se generan compuestos de naturaleza fenólica que son volátiles y les confieren el aroma característico

-**Cambios en la textura del fruto:** las células de los frutos son cada vez más permeables durante la maduración, porque la integridad de los compuestos de las paredes celulares se pierden. Por acción del etileno se activan una serie de enzimas hidrolíticas (poligalacturonasa y celulasa), que rompen los enlaces entre los polisacáridos de la pared.

La infiltración de Ca^{2+} tiene un efecto retardante en la maduración y envejecimiento del fruto, ya que este elemento tiene una función restauradora de la integridad de la membrana y restablece sus propiedades de permeabilidad selectiva.

-**Aumento de la deposición de ceras en la piel.**

CAMBIOS METABÓLICOS

-Se produce un aumento respiratorio

-Síntesis y liberación de etileno

-Metabolismo de almidón y ácidos orgánicos (sabor dulce mencionado arriba)

-Alteración en la regulación de rutas metabólicas.

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

-Desaparición del mRNA y proteínas sintetizadas antes de iniciarse la maduración.

-Aparición de nuevos RNAs específicos para la maduración

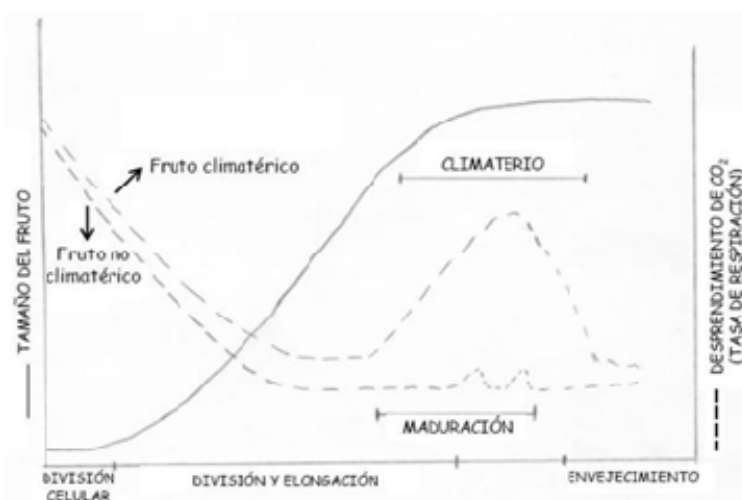
-Síntesis de novo de enzimas que catalizan los cambios que se producen durante la maduración

-En el caso de frutos climatéricos, el etileno induce la expresión de genes específicos para la maduración.

CLIMATERIO

Periodo en el desarrollo de ciertos frutos durante el cual tiene lugar una serie de cambios bioquímicos iniciados por la producción autocatalítica de **etileno** (hormona natural de la maduración), que señala el cambio de crecimiento a envejecimiento, implica un **aumento en la respiración** y conduce de forma irreversible a la maduración del fruto. Todos los frutos liberan etileno, lo que marca la diferencia entre frutos climatéricos y no climatéricos es la forma de liberarlo.

-**Frutos climatéricos:** Son aquellos frutos que muestran un incremento de la maduración como consecuencia de la actuación del etileno. Estos frutos muestran un incremento de su actividad respiratoria antes de la fase de maduración denominada climaterio, y muestran una máxima producción de etileno justo antes de que se incremente esta actividad respiratoria. Estos frutos son capaces de madurar después de haber sido cortados y el inicio de la maduración puede adelantarse mediante la aplicación exógena de etileno. Ejemplos: manzana, albaricoque, aguacate, plátano, chirimoya, higo, melón, melocotón, pera, tomate, sandía.



-Frutos no climatéricos: Son aquellos frutos que maduran gradual y constantemente, sin mostrar un aumento significativo de la actividad respiratoria ni de la producción de etileno al inicio de la maduración. Si se les aplica etileno exógenamente se produce un incremento de su actividad respiratoria pero no se induce la producción endógena de etileno ni se acelera el proceso de maduración. Su crecimiento y maduración se ve frenado si estos frutos son cortados de la planta. Ejemplo: cereza, calabaza, uva, pomelo, piña, limón, naranja, mandarina, fresa.

En frutos no climatéricos parece ser que la maduración se encuentra regulada por auxinas, que actúan como represores de la maduración. Así, mientras la producción de auxinas por los aquenios se mantiene a niveles elevados, los síntomas de maduración no se presentan, pero tan pronto como estos comienzan a disminuir se pone en marcha el proceso que se inicia con la acumulación de antocianinas y la expresión específica de genes de maduración.

¿A QUÉ ES DEBIDO EL AUMENTO RESPIRATORIO QUE TIENE LUGAR ANTES DE LA MADURACIÓN EN FRUTOS CLIMATÉRICOS?

-Presencia de sustratos respiratorios: fructosa-6-fosfato formada a partir del metabolismo del almidón

-Mayor disponibilidad de ADP

-Cambios metabólicos debidos a alteraciones en las estructuras subcelulares (membranas celulares): las células de los frutos son cada vez más permeables durante la maduración. De esta forma pueden ponerse en contacto enzimas y sustratos que antes estaban separados por una membrana con permeabilidad selectiva.

- Aumento de la actividad de la piruvato descarboxilasa. Realizan descarboxilaciones no oxidativas, por eso se produce un gran aumento del cociente respiratorio. Esta piruvato descarboxilasa provoca el aumento del CO₂ liberado en la quema de azúcares, disminuyendo por tanto la cantidad de azúcares en el fruto (propio de la maduración). En este momento en el que el fruto comienza a producir más CO₂ que el O₂ consumido se detiene el crecimiento vegetativo, lo que conlleva al envejecimiento o maduración de los frutos.

REGULACIÓN DE LA MADURACIÓN POR FACTORES EXTERNOS

-La **temperatura**, de modo que la maduración es estimulada en un rango de temperatura muy estrecho (6-30°C). Temperaturas inferiores a 6°C o superiores a 30-35°C inhiben el proceso de maduración.

-La **composición gaseosa de la atmósfera**, de manera que la concentración oxigénica cuanto mayor sea más va a estimular la maduración porque activan la producción de etileno, mientras que una concentración elevada de dióxido de carbono resulta inhibitoria porque retrasan el climaterio.

-La **presión atmosférica**, de modo que una reducción en la misma provoca un retraso en la maduración de los frutos.

-La **luz**, que es necesaria para la biosíntesis de ciertos pigmentos que provocan un cambio en la coloración de los frutos durante la maduración por lo que es necesaria para este proceso.

2- Regulación hormonal y enzimática de la maduración

En la maduración de los frutos están implicadas diversas moléculas, enzimas y hormonas que favorecen o inhiben este proceso. Las fitohormonas pueden promover o inhibir determinados procesos:



Los inhibidores son activos a muy bajas cantidades.

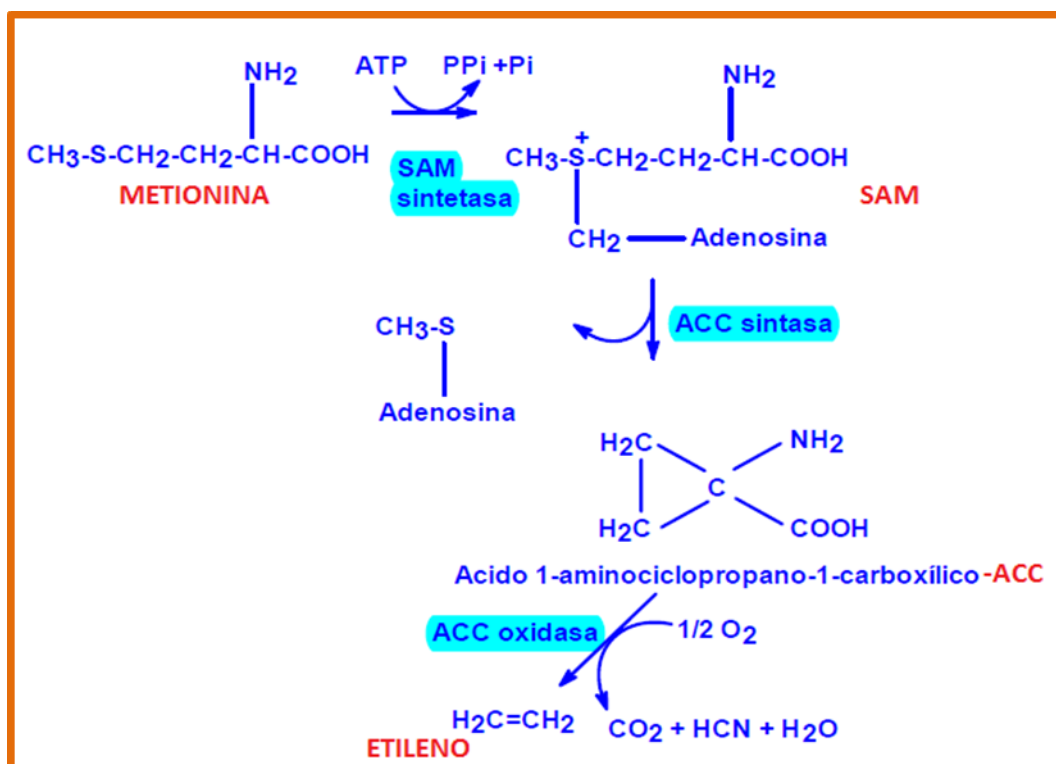
- El **etileno** es una hormona producida por los frutos climatéricos y que actúa como hormona de la maduración (envejecimiento). GAS-> **CH₂=CH₂**

La producción de etileno es uno de los primeros indicadores de la maduración, precediendo a la síntesis de poligalacturonas, el incremento respiratorio u otros acontecimientos.

Se trata de una hormona con actividad autocatalítica (la presencia de etileno activa al gen que codifica para la enzima **ACC oxidasa**, que conduce a la formación etileno).

-En los frutos climatéricos un aumento pequeño de etileno, provoca que se produzca el etileno autocatalítico, por lo que el fruto madura antes.

-En los frutos no climatéricos un pequeño aumento de etileno no afecta al producto, el fruto no madurará antes porque no se produce el etileno autocatalítico.



En condiciones de normoxia se produce un aumento de la síntesis del etileno durante la maduración.

El oxígeno es necesario para la biosíntesis del etileno, por tanto es necesario para la maduración.

Sin el O₂, no podrá producirse etileno y el ACC se acumularía. En consecuencia, se retrasaría la maduración.

Durante los primeros momentos de la maduración, se detecta un fuerte incremento en las actividades ACC sintasa y ACC oxidasa, lo que requiere la producción de nuevos RNAm y la síntesis *de novo* de las dos enzimas.

Se puede regular la formación del etileno:

- mediante la inducción de auxinas: favorece el paso de SAM a ACC (actuando la **ACC sintasa**), provocando mayor formación de etileno.
- AVG (aminoetoxinilglicina): bloquea el paso de SAM a ACC (reducción del etileno).
- debido al estrés aumenta la formación de ACC y con ello aumenta la cantidad de etileno.
- si aumenta la concentración de CO₂, disminuirá la producción de etileno.

MECANISMO DE ACCIÓN DEL ETILENO:

El receptor del etileno se denomina **ETR1**, se trata de proteínas integrales de membrana con actividad histidina quinasa y capacidad de autofosforilarse.

Con la unión del etileno al receptor se produce la autofosforilación del receptor en los residuos de Hys y la transferencia de estos fosfatos hacia residuos de aspartato.

Así se ha producido la activación del receptor, iniciándose una cascada de señalización hacia otras proteínas reguladoras.

La unión del etileno al receptor da como resultado la inactivación de un regulador negativo CTR 1 (que se hallaba inhibiendo a la proteína transmembrana EIN 2) por lo que la proteína EIN 2 cobra actividad, funcionando como un canal de iones (probablemente iones Ca²⁺), lo que se traduce en una posterior activación del factor de transcripción EIN 3, que actúa a nivel genómico induciendo la expresión genética de proteínas efectoras.

• **Auxinas:** son hormonas que intervienen en la maduración.

El ácido indolacético (**IAA**), que es una auxina activa (la forma natural predominante), debe consumirse para que se produzca la maduración.

Dependiendo del tipo de fruto del que estemos tratando, las auxinas provocaran la madurez o la inhibición de ésta.

-En los frutos climatéricos se produce el adelantamiento de la maduración debido al aumento de auxinas.

-En cuanto a los frutos no climatéricos, se retrasa la maduración por el aumento de auxinas.

En los frutos no climatéricos, con las auxinas se retrasa la maduración, pero al aplicar etileno se contrarresta este efecto de las auxinas. Dependiendo del tipo de auxina, se contrarrestará el efecto debido al etileno más o menos rápido (con IAA rápidamente).

Al tratar un fruto con etileno, habrá una degradación del IAA y aumentará la actividad peroxidasa, se producirá la maduración.

• **Giberelinas:** se trata de una fitohormona que retrasa los procesos de maduración.

Existe un efecto antagonico con el etileno. Si a un fruto le tratamos con giberelina y después con etileno, el etileno disminuirá el efecto de la giberelina.

Las giberelinas actúan sobre los cambios de color, retrasando la pérdida de clorofilas y provocando la reverdización (formación de más cloroplastos).

También actúan sobre el ablandamiento de los frutos. Las giberelinas disminuyen la actividad de las poligalacturonasas, provocando que el fruto tarde más en ablandarse.

• **Citoquininas:** son hormonas que retrasan la maduración, promoviendo la división celular (crecimiento vegetativo).

Retrasan la degradación de las clorofilas. Suelen actuar en los primeros estados del fruto.

• **Ácido abscísico (ABA):** se trata de un inhibidor del crecimiento. Se sintetiza en todas las partes de la planta con plastidos. El ABA no afecta a la producción de etileno. Con el estrés se produce un aumento en la cantidad de ABA en los frutos.

- En los frutos climatéricos, ABA provoca en mayor medida el adelantamiento de la maduración.
- En los frutos no climatéricos, el ABA acelera en mayor medida el proceso de desverdización.

- Tras la degradación de las clorofilas se forman nuevos pigmentos como son los **flavonoides**. Estos metabolitos se forman a partir de la L-fenilalanina, gracias a la acción de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa). La PAL cataliza en la L-fenilalanina la liberación del grupo amino, formando ácido cinámico.

- **Etanol y metanol**: son alcoholes que provocan la inhibición de la maduración. Se produce un aumento del etanol debido a elevados niveles endógenos de **acetaldehído (AA)**. Este AA también provoca la inhibición de la maduración. La concentración necesaria para la inhibición de la maduración es menor en AA que en etanol. El etanol y el AA se acumulan en los frutos en maduración. Elevadas concentraciones de etanol inhiben la maduración. Este efecto de inhibición de la maduración por el etanol, se revierte con altas concentraciones de etileno. El etanol actúa inhibiendo la síntesis y actividad del etileno. Por tanto, se produce la acumulación en estos tejidos de ACC. El metanol es emitido por plantas en crecimiento y se acumula en los frutos en maduración.

-EXPERIMENTO: (tomate)

La **enzima Pectin metilesterasa (PME)** regula la producción y acumulación de etanol y metanol durante la maduración de los frutos.

Se relacionó la cantidad de metanol con la actividad de la PME. Esta enzima PME provoca un aumento en las concentraciones de metanol.

Según transcurre la maduración de los frutos, se produce un aumento progresivo en la actividad de la PME (por tanto un aumento del metanol durante la maduración).

Sin embargo, en las cepas de tomate mutantes (insensibles ante PME), la concentración de metanol es baja y no aumenta durante la maduración.

Así podemos deducir que la enzima PME es fundamental en la ruta de biosíntesis del metanol.

En cuanto al etanol, se observa que durante la maduración los niveles son bajos.

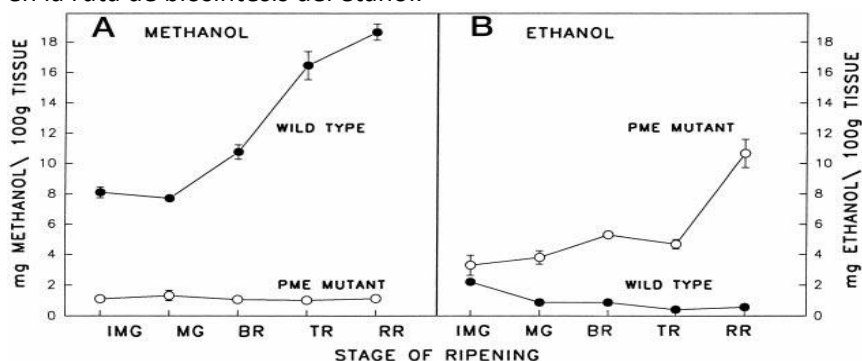
En cambio en el mutante los niveles de etanol aumentan progresivamente a medida que progresa la maduración.

Esto se explica por la acción de la **enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH)**, que cataliza la producción de etanol.

El metanol es un inhibidor competitivo de la ADH. Las acumulaciones de metanol en el fruto provocan la inhibición de la enzima ADH.

En la cepa silvestre, como los niveles de metanol son altos, la enzima ADH se encuentra inhibida y por tanto habrá concentraciones muy bajas de etanol.

En las cepas mutantes, como los niveles de metanol son bajos, la enzima ADH se encuentra activa y actúa en la ruta de biosíntesis del etanol.



Por tanto, deducimos que en los frutos, los niveles de metanol y etanol están inversamente relacionados.

3- Efecto de la anoxia sobre la maduración de los frutos.

Se han realizado diversos experimentos para estudiar el efecto de la anoxia o la hipoxia sobre la maduración de las frutas.

Un primer estudio trata sobre el melocotón (*Prunus persica*), un fruto climatérico. Para conseguir una atmósfera de anoxia se aplicó gas N₂, que desplaza el oxígeno, impidiendo que llegue a las células del melocotón y formando así un ambiente anóxico.

Tras tres días conservados en esta atmósfera se observa un retraso en la maduración de los frutos: no hay reblandecimiento, no se observan cambios de color y hay una inhibición de la producción de etileno. Se observan cambios en la actividad de enzimas envueltas en rutas metabólicas e inducción de vías fermentativas.

En el estudio se analiza:

- Producción de etileno
- Características organolépticas (olor y sabor)
- Niveles de enzimas envueltas en rutas metabólicas
- Productos de estas rutas: azúcares y sorbitol, ácidos orgánicos y productos de fermentación
- Vuelta a la situación de normoxia.

PAPEL DEL OXÍGENO

El oxígeno tiene un papel importante tanto en la respiración como en la síntesis de etileno, hormona de la maduración.

Sobre la tasa de respiración, al disminuir el oxígeno, disminuye la tasa de respiración y disminuye la producción de energía disponible.

Por otro lado, se necesita oxígeno para la síntesis de etileno por lo que una cantidad normal de oxígeno garantiza una maduración adecuada, mientras que la falta de oxígeno ocasiona inhibición de la síntesis de etileno y por tanto, retraso de la maduración.

En el caso de anoxia prolongada se estimulan de gran manera las rutas fermentativas que al final son perjudiciales para la fruta, que se estropea.

CAMBIOS FÍSICOS EN LA RUTA COMO CONSECUENCIA DE LA ANOXIA

La atmósfera anóxica retrasa el reblandecimiento de la fruta y los cambios de la maduración, al inhibirse la síntesis de etileno.

- En normoxia las frutas se reblandecen, mientras que conservadas en un ambiente sin oxígeno mantienen su firmeza.
- En ambiente normal, las frutas cambian de color, típico de la maduración, en anoxia mantienen el color durante más tiempo.
- El contenido en solutos y la acidez no se modifican

Esto se explica por la producción de etileno, que necesita oxígeno para formarse. Cuanto menos oxígeno en el ambiente, menos producción de etileno en la fruta.

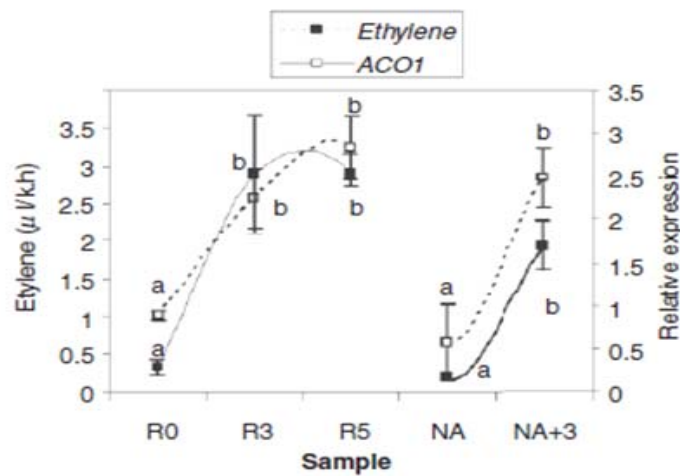
PRODUCCIÓN DE ETILENO

Los niveles de etileno, que son bajos en la fruta recién recogida del árbol (en la gráfica, R0), aumenta en gran cantidad tras tres días de conservación en una atmósfera con cantidad de oxígeno normal (R3) o cinco días en ambiente normal (R5).

En cambio, si se conserva durante tres días en una atmósfera anóxica, de nitrógeno (NA), los niveles de etileno no aumentan, quedan como al inicio.

El valor se restaura si pasa del ambiente anóxico a un ambiente normal durante tres días (NA + 3), recuperan el nivel de etileno que habrían tenido sin haber estado sometidos a anoxia.

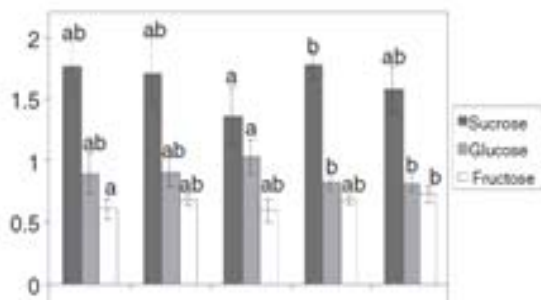
Esto se corresponde con los niveles de la enzima ACO1 (ACC oxidasa), que participa en la síntesis de etileno. Cuanta más actividad de esta enzima, más etileno se sintetiza.



NIVELES DE AZÚCARES

Los niveles de **sacarosa**, **fructosa** y **glucosa** no varían entre el tratamiento con nitrógeno o normal con oxígeno.

- Aunque se espera un aumento de la glucólisis, para mantener los niveles energéticos, no varían los niveles de glucosa y fructosa, se utilizan para la glucólisis otros metabolitos, como pectinas o ácidos grasos.

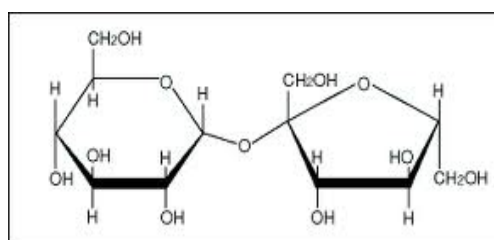
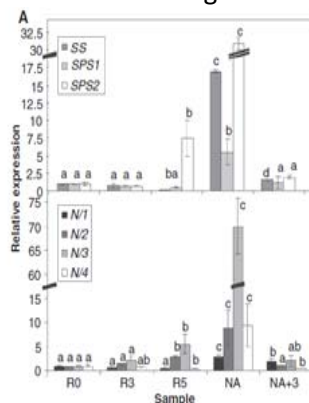


- Respecto a la sacarosa, aumentan los niveles de sacarosa sintasa y sacarosa-P-sintasa, para formación de sacarosa.

Por otra parte, hay un aumento de la invertasa que hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa.

El equilibrio entre los niveles de síntesis y degradación de sacarosa hace que la cantidad de ésta se mantenga estable.

Hay producción de sacarosa, que da sabor dulce a la fruta, y degradación en glucosa y fructosa, para obtener energía.



METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Se modifica la actividad de enzimas limitantes en la glucolisis:

-**Fructoquinasa(FK)** baja en condiciones aeróbicas pero no en anoxia

-**Fosfofructoquinasa (PFK)** dependiente de ATP constante en normoxia, aumenta en anoxia. Se necesita glicolisis para poder llevar a cabo las vías fermentativas, PFK lleva el control, aumento de la glucolisis.

El aumento de la actividad de estas enzimas provoca un aumento de la tasa de glucolisis, se necesita energía y sustratos para la fermentación.

-Todas las enzimas (PFK, NAD-ME, NADP-ME, PDC, ADH y LDH) vuelven a los niveles normales cuando se restaura el oxígeno.

ÁCIDOS ORGÁNICOS

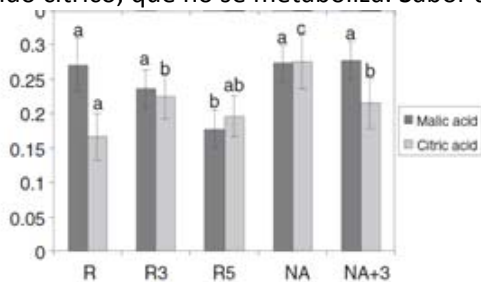
-Aumentan los niveles de citrato respecto a las plantas en atmósfera normal.

-Los niveles de malato se mantienen.

-Aumenta la piruvato ortofosfato quinasa para pasar de PEP a piruvato, para la fermentación.

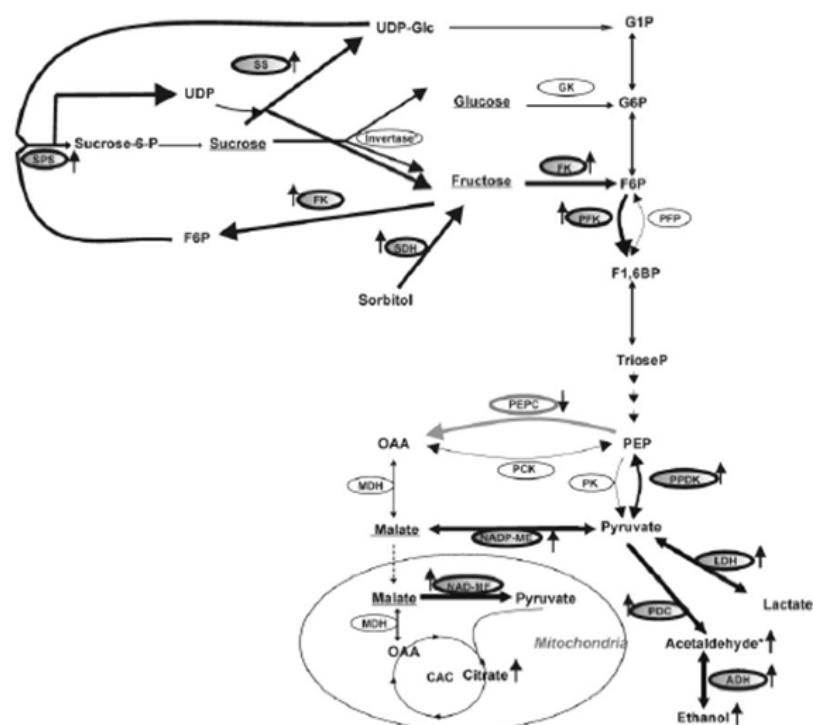
-Hay un equilibrio entre las enzimas que consumen y degradan malato, para regeneración de NADP.

En este ambiente, el ciclo del ácido cítrico está limitado, se limita la reoxidación del NADH, aumenta el ácido cítrico, que no se metaboliza. Sabor ácido.



ESQUEMA DE INTEGRACIÓN DE TODAS LAS RUTAS

Se marcan las enzimas cuya actividad aumenta o disminuye cuando hay falta de oxígeno:



CELULASA Y POLIGALACTURONASA

En otro estudio se establece la relación entre la actividad de enzimas que rompen la pared celular y la presencia de oxígeno; en este caso, sobre el tomate.

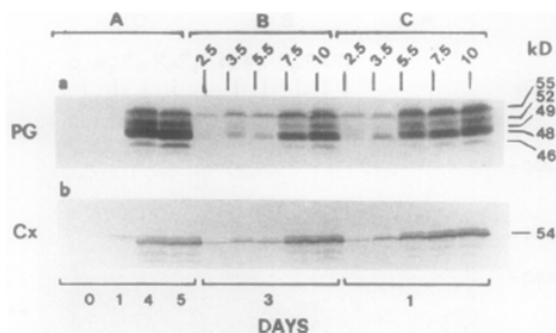


Figure 3. Suppression by low O₂ of PG and cellulase proteins in avocado fruits. Blots of total proteins (30 μg/lane) were probed with polyclonal antibodies raised against PG (a) and cellulase (b). Sampling periods were the same as those described in the legend to Figure 2.

concentraciones de oxígeno.

- Todo esto está regulado en general por el etileno.
- La maduración se retrasa por altas temperaturas y ambiente con baja concentración de O₂ o alta concentración de CO₂.

4. Fermentación

El proceso de fermentación es anaeróbico ya que se produce en ausencia de oxígeno; ello significa que el aceptor final de los electrones del NADH producido en la glucólisis no es el oxígeno, sino un compuesto orgánico que se reducirá para poder reoxidar el NADH a NAD⁺.

En anaerobiosis el ácido pirúvico no puede ser oxidado por falta de oxígeno, pero puede servir como aceptor de protones y electrones que aparecen en la glicólisis bajo forma de NADH₂ (reducido). En este caso, el ácido pirúvico se reduce directamente a ácido láctico (fermentación homoláctica). Si la reducción está precedida por la descarboxilación a acetaldehído, se produce formación de alcohol (fermentación alcohólica).

En la **fermentación alcohólica**, el ácido pirúvico producido en la glicólisis es descarboxilado a acetaldehído, que es reducido a etanol por medio del NADH₂ que se ha formado en la glicólisis

En la **fermentación homoláctica** el ácido pirúvico no puede ser oxidado, por falta de oxígeno, pero puede servir como aceptor del hidrógeno que aparece en la glicólisis bajo forma de NADH₂ (reducido), en este caso se reduce directamente a ácido láctico.

Desde el punto de vista energético, las fermentaciones son muy poco rentables, ya que a partir de una molécula de glucosa sólo se obtienen 2 moléculas de ATP (mientras que en la respiración se producen 36). Esto se debe a la oxidación del NADH, que en lugar de penetrar en la cadena respiratoria, cede sus electrones a compuestos orgánicos con poco poder oxidante.

-En anoxia, aumentan las vías metabólicas de fermentación.

-En un experimento con melocotones, se induce anoxia bajo una atmósfera de N₂.

- La falta de oxígeno induce la vía fermentativa en las células, como se ve por los niveles de PDC (piruvato descarboxilasa), ADH (alcohol deshidrogenasa) y LDH (lactato deshidrogenasa) y de etanol y acetaldehído.

Cuando hay bajas concentraciones de oxígeno (2.5-5.5%) disminuye la expresión y la actividad de las dos enzimas.

Estas enzimas actúan sobre la membrana y la pared celular y provocan el reblandecimiento de las células. En condiciones de anoxia se garantiza la firmeza de la fruta.

Conclusiones:

- Cuando se devuelve a atmósfera de aire, vuelven a cambiar las concentraciones.
- Los resultados indican que la hipoxia interviene positiva o negativamente en la expresión de ciertos genes y que esos efectos se inician con las mismas

-Al restaurar el oxígeno, las actividades fermentativas vuelven a los niveles normales, aunque el contenido en acetaldehído no baja mientras que el etanol disminuye porque:

1. bajan las actividades PDC y ADH
2. se metaboliza a acetaldehído por la ADH
3. se pierde por evaporación

-Los niveles de acetaldehído no caen cuando se vuelve a la atmósfera normal lo que podría ser una ventaja ya que los melocotones con más niveles de etanol y acetaldehído tienen mejor sabor y olor .

-Un exceso de estos productos podría dar un efecto perjudicial, en el caso de la anoxia prolongada.

-El incremento de acetaldehído parece inhibir ACO y baja la poligalacturonasa, reduciendo el reblandecimiento.

-En la maduración de *Arabidopsis*, el ácido láctico se requiere para estimular la fermentación etanólica, probablemente ajustando el pH para la actividad de PDC. -Sin embargo, el tratamiento térmico en melocotón induce la fermentación alcohólica pero no fermentación láctica.

-No ha habido daños, a pesar de la anaerobiosis, por la capacidad de resistencia del fruto a bajos niveles de oxígeno, sobre todo si antes ha habido pretratamiento con hipoxia.