

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE ALMIDÓN, PECTINAS Y HEMICELULOSAS DURANTE LA MADURACIÓN DE MANGO (*Mangifera indica* cv. KENT)

Wendy Guadalupe Cárdenas-Coronel; Rosabel Velez-de la Rocha;
Jorge Humberto Siller-Cepeda; Tomás Osuna-Enciso;
María Dolores Muy-Rangel; J. Adriana Sañudo-Barajas[¶].

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán. Apartado postal 32-A, Culiacán, Sinaloa. MÉXICO. C. P. 80129.
Correo-e: adriana@ciad.edu.mx ([¶]Autor para correspondencia)

RESUMEN

En este estudio se evaluaron los cambios en algunos polisacáridos durante la maduración poscosecha de mango 'Kent'. Se almacenaron frutos en madurez fisiológica a condiciones simuladas de mercadeo (20 ± 2 °C, 85 % de humedad relativa), hasta alcanzar los estados de madurez 2, 3, 4 y 5 (de acuerdo a la norma de Empacadoras de Mango de Exportación, A. C.). Se determinaron los cambios en firmeza, almidón, pectinas, hemicelulosas y celulosa. Los polisacáridos se obtuvieron a partir de la fracción insoluble en alcohol (FIA) de la pulpa. Los frutos presentaron una pérdida total del 93 % de la firmeza desde la madurez 2 a la 5, la cual se redujo progresivamente en 40, 44 y 9 % al alcanzar la madurez 3, 4 y 5, respectivamente. En ese orden, el grado de ablandamiento se definió como inicial, intermedio y tardío. Durante el ablandamiento inicial de los frutos se redujo el contenido de almidón en un 90 % y el contenido de azúcares totales en un 44 %, mientras que los ácidos urónicos totales aumentaron en un 39 %. La concentración total de arabinosa no mostró cambios significativos y se mantuvo en valores cercanos a los 250 mg·100 g⁻¹ peso fresco (pf) en los distintos estados de madurez; sin embargo, la disminución de glucosa y galactosa fue de 50 % durante el ablandamiento inicial. La fracción péctica predominante fue la hidrosoluble, que presentó una relación urónicos:azúcares cercana a 2:1, y el azúcar neutro de mayor concentración fue arabinosa. Durante el ablandamiento de los frutos de mango 'Kent', se presentaron cambios en la solubilidad y grado de polimerización de polisacáridos pécticos y hemicelulósicos.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Ablandamiento, solubilización, despolimerización, azúcares neutros.

CHANGES IN THE COMPOSITION OF STARCH, PECTINS AND HEMICELLULOSES DURING THE RIPENING STAGE OF MANGO (*Mangifera indica* cv. KENT)

ABSTRACT

Changes in some polysaccharides during postharvest ripening of 'Kent' mangoes were evaluated in the present study. Fruit at physiological maturity stage were stored to simulate marketing conditions (20 ± 2 °C, 85 % relative humidity) until reaching the ripening stages 2, 3, 4 and 5 (according to the standards of Empacadoras de Mango de Exportación, A. C.). Changes in firmness, starch, pectin, hemicellulose and cellulose were determined. Polysaccharides were obtained from the alcohol-insoluble fraction of the mango flesh. Fruit showed a total firmness loss of 93 % from the ripening stage 2 to 5, which was progressively reduced in 40, 44 and 9 % when the fruit reached the stages 3, 4, and 5, respectively. In that order, the rate of softening was defined as initial, intermediate, and late. During the initial fruit softening, the content of starch was reduced by 90 % and the total sugars by 44 %, while the total uronic acids increased by 39 %. The total concentration of arabinose was maintained without significant changes in the different ripening stages at levels of 250 mg·100 g⁻¹ fresh weight; however, a reduction of 50 % in glucose and galactose occurred during the initial softening. The water soluble-fraction was the prevalent pectin fraction with a composition near to 2:1 in the uronide:sugar ratio. During the softening of 'Kent' mangoes, changes in solubility and polymerization degree of pectin and hemicellulosic polysaccharides were observed.

ADDITIONAL KEYWORDS: Softening, solubilization, depolymerization, neutral sugars.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica*) es considerado un fruto tropical de importancia comercial por su alta demanda mundial como producto fresco y procesado (Tharanathan *et al.*, 2006). México es el mayor exportador de mango en el mundo y concentra la mayor producción en los estados de Guerrero, Sinaloa, Veracruz, Nayarit y Chiapas. Entre las variedades de mango cultivadas en Sinaloa, el cultivar Kent se considera el mejor del grupo de maduración intermedia, en parte por su alta productividad y su amplia aceptación en mercados nacionales e internacionales (Ireta y Guzmán, 2002).

La maduración del mango se caracteriza por un ablandamiento de la pulpa, el cual se asocia con cambios progresivos en la composición de hemicelulosas, pectinas, celulosa y almidón (Muda *et al.*, 1995; Yashoda *et al.*, 2006). En frutos climatéricos, la pérdida de interconexión de pectinas y hemicelulosas por efectos de solubilización y despolimerización enzimática conduce a una interconversión de polisacáridos altamente interconectados a estructuras de baja asociación fibrilar (Prasanna *et al.*, 2003; Brummell, 2006). Para definir los cambios en solubilidad, los polisacáridos se extraen secuencialmente con agentes químicos. El agua extrae pectinas ligadas o débilmente asociadas a la matriz fibrilar; agentes quelantes como el EDTA solubilizan pectinas quelatadas o ligadas mediante enlace iónico; el Na_2CO_3 extrae pectinas unidas covalentemente; y las soluciones concentradas de álcalis se usan para extraer hemicelulosas de bajo y alto grado de asociación con la celulosa (Brummell y Harpster, 2001). En mangos de diversas variedades se reporta la conversión de protopectina a pectina soluble en agua, así como cambios en la composición de azúcares neutros, solubilización y despolimerización de pectinas y hemicelulosas (Roe y Bruemmer, 1981; Mitcham y McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Ollé *et al.*, 1996; Varayanond *et al.*, 1999; Yashoda *et al.*, 2006). Sin embargo, dichos reportes difieren en el patrón y magnitud de cambios en la pared celular entre variedades de mango, algunas veces por la presencia de gran proporción de almidón en el fruto (Muda *et al.*, 1995; Ollé *et al.*, 1996). En mango 'Keitt' y 'Tommy Atkins' se reportó una reducción en residuos de arabinosa, galactosa, xilosa y ramnosa, lo cual sugiere la participación de hidrolasas como la β -galactosidasa y β -xilosidasa (Mitcham y McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995). Posteriormente, la β -galactosidasa en mango 'Harumanis' y 'Alfonso' se consideró asociada a la degradación de galactanos en las fracciones pécticas (Ali *et al.*, 1995; Prasanna *et al.*, 2005).

El mango 'Alfonso', cultivar de la India catalogado como de alta calidad, ha sido el mayormente explorado en aspectos de la pared celular. Yashoda *et al.* (2006) han estudiado las implicaciones del metabolismo de pectinas y almidón sobre los cambios ultraestructurales del fruto, así como la asociación de la reducción en la concentración de celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón durante la maduración. Sin embargo, en la variedad Kent, que ha

INTRODUCTION

Mango (*Mangifera indica*) is considered a commercially important tropical fruit due to its high global demand as fresh or processed product (Tharanathan *et al.*, 2006). Mexico is the largest exporter of mangoes in the world and it has the highest production in the states of Guerrero, Sinaloa, Veracruz, Nayarit and Chiapas. Among the varieties of mangoes grown in Sinaloa, Kent is considered as the best cultivar in the group of intermediate ripening stage, because of its high productivity and wide acceptance in national and international markets (Ireta and Guzmán, 2002).

Mango ripening process is characterized by the softening of the flesh, which is related with progressive changes in the composition of hemicellulose, pectin, cellulose and starch (Muda *et al.*, 1995; Yashoda *et al.*, 2006). In climacteric fruits, the loss of interconnection of pectins and hemicelluloses due to solubilization and enzymatic depolymerization effects leads to an interconversion of polysaccharides highly interconnected to structures of low fibril association (Prasanna *et al.*, 2003; Brummell, 2006). Polysaccharides are extracted sequentially using chemical agents in order to define changes in solubility. Bounded or weakly associated pectins with the fibrillar matrix are extracted by water; chelated or linked by ionic bonds pectins are solubilized by chelating agents such as EDTA; covalently bound pectins are extracted by Na_2CO_3 ; and concentrated alkaline solutions are used to extract hemicellulose of low and high degree of association with cellulose (Brummell and Harpster, 2001). The conversion of protopectin to water-soluble pectin as well as changes in the neutral sugar composition, solubilization, depolymerization of pectins and hemicelluloses are reported in different varieties of mangoes (Roe and Bruemmer, 1981; Mitcham and McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Ollé *et al.*, 1996; Varayanond *et al.*, 1999; Yashoda *et al.*, 2006). However, those reports differ in pattern and magnitude of changes in the cell wall among mango varieties, in some cases due to the presence of a large proportion of starch in the fruit (Muda *et al.*, 1995; Ollé *et al.*, 1996). A reduction in the residues of arabinose, galactose, xylose and rhamnose was observed in 'Keitt' and 'Tommy Atkins' mangoes, which suggests the participation of hydrolases such as β -galactosidase and β -xilosidase (Mitcham and McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995). Subsequently, β -galactosidase in 'Harumanis' and 'Alfonso' mangoes were related to the degradation of galactans in pectic fractions (Ali *et al.*, 1995; Prasanna *et al.*, 2005).

'Alfonso' mango, India's cultivar classified as the high quality, has been largely explored in aspects of cell wall. Implications of starch and pectin metabolism on fruit ultrastructural changes, as well as the relation of the reduction in the concentration of cellulose, hemicellulose, pectin and starch during ripening has been studied by Yashoda *et al.* (2006). Nevertheless, in the case of the variety 'Kent',

sido referida como aceptable por su exquisito sabor, olor y su bajo contenido de fibras (Galán-Saúco, 1999), los reportes son más limitados. En la presente investigación el objetivo fue evaluar los cambios en la composición de algunos polisacáridos durante la maduración de frutos de mango 'Kent'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Se cosecharon frutos de mango 'Kent' en estado de madurez fisiológica en un huerto de San Pedro, Navolato, Sinaloa. Se seleccionaron frutos sin daño aparente y se almacenaron a condiciones simuladas de mercadeo (20 ± 2 °C y 80 ± 5 % de humedad relativa).

Firmeza

En cuatro puntos de la zona ecuatorial de cada uno de tres frutos, sin cáscara, se registró la fuerza de oposición del tejido a la penetración de un punzón de 8 mm de diámetro, el cual se insertó a una profundidad de 1.5 cm a velocidad de $5.3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Esta variable se evaluó cada tres días con un penetrómetro digital marca Chatillón, modelo DFGS-100, adaptado a una base automática modelo TCD 200.

Obtención de la fracción insoluble en alcohol (FIA)

Se obtuvieron secciones longitudinales de la pulpa de cuatro frutos; se retiró la cáscara y se agruparon las secciones de pulpa en una sola unidad experimental de 100 g para cada estado de madurez. La pulpa se picó finamente y se hirvió por 30 min en 250 ml de etanol al 80 %; se homogeneizó durante 40 s a 13,500 rpm con un procesador Ultra-turrax (modelo T25); se realizaron filtraciones con papel de fibra de vidrio (GF/A) y lavados consecutivos durante 20 min en agitación magnética con etanol al 80 % (dos veces), metanol-cloroformo (1:1) y acetona hasta obtener un polvo de color blanco (Rose *et al.*, 1998). El residuo se secó a peso constante en una estufa a 40 °C, se registró el peso, se redujo el tamaño de partícula a malla 40 (molino Thomas Scientific, modelo 3383-L10) y se almacenó en desecador. Dicho residuo constituyó la FIA y se utilizó para las evaluaciones posteriores.

Contenido de ácidos urónicos, azúcares totales y almidón

El contenido total de ácidos urónicos y azúcares totales en los frutos de mango se determinó a partir de la hidrólisis de 2 mg de FIA con H_2SO_4 concentrado. Se colocaron los tubos con la FIA y se adicionó 1 ml de H_2SO_4 ; a intervalos de 10 min se añadió 1 mL de H_2SO_4 , 1 ml de H_2O y finalmente 7 ml de H_2O . La hidrólisis se condujo en condiciones de agitación constante y baño de hielo. Los ácidos urónicos totales se determinaron por el método simplificado de Ahmed y Labavitch (1977), que consistió en lo siguiente: a 200 μL del hidrolizado se adicionaron 1.2 ml de borato de sodio (12.5 mM) en H_2SO_4 concentrado, y la

which has been referred as an acceptable due to its delicious flavor, smell and low fiber content (Galán-Saúco, 1999), reports are limited. The aim of the present study was to evaluate the changes in the composition of some polysaccharides during the ripening of 'Kent' mango fruits.

MATERIALS AND METHODS

Study material

'Kent' mango fruits were harvested at physiological ripeness in an orchard of San Pedro, Navolato, Sinaloa. Fruits without apparent injury were selected and stored in simulated marketing conditions (20 ± 2 °C, 80 ± 5 % relative humidity).

Firmness

In four peeled points of the equatorial zone of each of three fruits, the opposing force of the tissue to the penetration of an 8 mm-diameter tip inserted to a depth of 1.5 cm at speed of $5.3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ was recorded. This variable was evaluated every three days using an electronic penetrometer, Chatillon model DFGS-100, adapted to an automatic base model TCD 200.

Extraction of alcohol-insoluble fraction (AIF)

Longitudinal sections of the flesh of a 4-fruit sample at each of the previously described ripening stages were obtained; the skin was removed and pulp sections were grouped into a 100 g single experimental unit for each ripening stage. Flesh was finely chopped and boiled for 30 min in 250 ml ethanol at 80 %; then it was homogenized for 40 s at 13,500 rpm using the T25 digital Ultra-Turrax; filtrations were performed using glass fiber filter paper (GF/A) and for 20 min consecutive washings were performed under magnetic stirring with 80 % ethanol (twice), methanol-chloroform (1:1) and acetone until obtaining a white powder (Rose *et al.*, 1998). The residue was dried to constant weight using a stove at 40 °C, weight was recorded, particle size was reduced to 40 mesh (Thomas Scientific Mill, model 3383-L10) and stored in a desiccator. Such residue provided the AIF and it was used for later evaluations.

Uronic acids, total sugars and starch content

The total content of uronic acids and total sugars in mango fruit was determined from the hydrolysis of 2 mg AIF with concentrated H_2SO_4 . In the tubes containing the AIF, 1 ml H_2SO_4 was added, and subsequently 1 ml H_2SO_4 , 1 ml H_2O , and finally 7 ml H_2O were added at intervals of 10 min. Hydrolysis was conducted under conditions of constant stirring and ice bath. Then, total uronic acids was determined with the simplified method of Ahmed and Labavitch (1977), which consisted in the following: 1.2 ml sodium borate (12.5 mM) in concentrated H_2SO_4 was added to 200 μL aliquot from the acidic hydrolysis and the mixture was kept for 5 min in a water bath at 100 °C. Coloration was produced

mezcla se mantuvo por 5 min en baño de agua a 100 °C. La coloración se produjo al añadir 20 µL de *m*-fenil fenol (0.15 %) en NaOH (0.5 %), y la absorbancia se registró a 520 nm con un espectrofotómetro Cary UV-Vis 1-E (Varian Inc.). Se utilizó ácido galacturónico como patrón de calibración. Los azúcares totales se determinaron por el método de antrona (Yemm y Willis, 1954), de la siguiente manera. A 100 µL del hidrolizado se añadieron 400 µL de H₂O destilada y 1 ml de antrona (0.2 %) en H₂SO₄ concentrado; se calentó por 10 min en baño de agua a 100 °C; se enfrió y se midió la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro Cary UV-Vis 1-E (Varian Inc.). La concentración se calculó a partir de una curva de calibración con glucosa. Los estándares utilizados fueron de la marca SIGMA®.

El almidón total digerible se determinó en 250 mg de FIA, a los cuales se añadieron 300 U de α -amilasa termostable y 3 ml de amortiguador MOPS (50 mM, pH 7.0) y se hidrolizaron durante 45 min en baño de agua a ebullición. Posteriormente, se agregaron 100 U de amiloglucosidasa y 4 ml de acetato de sodio (200 mM, pH 4.5); la mezcla se incubó durante 45 min a 50 °C, se enfrió y se centrifugó hasta sedimentación de los sólidos insolubles. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml del sobrenadante por triplicado y se mezclaron con el reactivo enzimático glucosa oxidasa/ peroxidasa; se incubó por 10 min a 50 °C y se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro Cary 1E-UV. Los cálculos de concentración se realizaron a partir del estándar de glucosa. Todos los reactivos fueron del kit enzimático comercial Megazyme®.

Cambio en la composición de azúcares neutros y celulosa

Los azúcares neutros se hidrolizaron a monosacáridos y se derivatizaron a acetatos de alditol para su análisis por cromatografía de gases (Albersheim *et al.*, 1967). Dos mg de la FIA se hidrolizaron con 500 µL de ácido trifluoroacético (2 N conteniendo 200 µg de *myo*-inositol como estándar interno) durante 1 h a 121 °C. La mezcla se separó por centrifugación y el residuo se consideró celulosa; el sobrenadante se sometió a una reducción con 150 µL de NaBH₄ (20 mg·ml⁻¹ en NH₄OH 1N) y una posterior acetilación con 200 µL de anhídrido acético y 20 µL de 1-metilimidazol como catalizador. El material derivatizado se resuspendió en 2 ml de agua y 3 ml de cloroformo. Se recuperó la fase clorofórmica; se evaporó, y los acetatos de alditol se resuspendieron en acetona para su inyección en un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 con detector FID (250 °C), con columna capilar DB-23 de 30 m x 0.25 mm (210 °C) y helio como gas acarreador (flujo constante de 3 ml·min⁻¹). La integración de áreas se realizó con el software MS Workstation (Varian Inc.) versión 6.5 (SP1), y los cálculos se realizaron a partir de curvas de estándares de ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. Los estándares utilizados fueron de la marca SIGMA®. La celulosa se hidrolizó durante 4 h con H₂SO₄ (67 %), y se determinó el contenido de azúcares totales por el método de Yemm y Willis (1954) descrito previamente.

after adding 20 µL *m*-phenylphenol (0.15 %) in NaOH (0.5 %), absorbance was recorded at 520 nm using a Cary UV-Vis 1-E spectrophotometer (Varian Inc.). Galacturonic acid was used as standard. Total sugars content was determined by the anthrone method (Yemm and Willis, 1954), as follows: 400 µL distilled H₂O and 1 ml anthrone (0.2 %) in concentrated H₂SO₄ was added to an aliquot of 100 µL of the acidic hydrolysis, the mixture was heated for 10 min in a water bath at 100 °C; after cooling, absorbance was measured at 620 nm using a Cary UV-Vis 1-E spectrophotometer (Varian Inc.). The concentration was calculated from a calibration curve of glucose. The standards used were purchased from SIGMA®.

Total digestible starch was determined in 250 mg AIF, adding 300 U thermostable α - amylase and 3 ml MOPS buffer (50 mM, pH 7.0) and hydrolyzed during 45 min in a boiling water bath. Thereafter, 100 U amyloglucosidase and 4 ml sodium acetate (200 mM, pH 4.5) were added; mixture was incubated for 45 min at 50 °C, then cooled and centrifuged until the sedimentation of *insoluble solids*. Aliquots (0.1 ml) in triplicate were taken from the supernatant and mixed with the glucose oxidase/peroxidase reagent; the mixture was incubated for 10 min at 50 °C; absorbance was recorded at 510 nm using a Cary 1E-UV spectrophotometer. By means of the glucose standard the concentration was obtained. All reagents belonged to the Megazyme® commercial enzymatic kit.

Change in the composition of neutral sugars and cellulose

Neutral sugars were hydrolyzed to monosaccharides and derivatized to alditol acetates to conduct gas chromatography analysis (Albersheim *et al.*, 1967). Two mg of AIF was hydrolyzed with 500 µL trifluoroacetic acid (2 N containing 200 µg *myo*-inositol as internal standard) for 1 h at 121 °C. The mixture was centrifuged and the residue was considered cellulose; the supernatant was subjected to a reduction with 150 µL Na BH₄ (20 mg·ml⁻¹ in NH₄OH 1N) and a later acetylation with 200 µL acetic anhydride and 20 µL 1-methylimidazole as catalyst. The derivatized material was resuspended in 2 ml water and 3 ml chloroform. The chloroform phase was recovered; then it was evaporated, and alditol acetates were resuspended in acetone for injection into a Varian CP-3800 gas chromatograph with FID (250 °C), with a DB-23 capillary column of 30 m x 0.25 mm (210 °C) and helium as carrier gas (constant flow of 3 ml·min⁻¹). The integration of areas was performed using the MS Workstation software (Varian Inc.) version 6.5 (SP1), and measurements were conducted from the standard curves of rhamnase, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose and glucose (All SIGMA® standards). Cellulose was hydrolyzed for 4 h with H₂SO₄ (67 %), and total sugar content was determined using the method of Yemm and Willis (1954), previously described.

Solubilidad de pectinas y hemicelulosas

Se realizó por triplicado la extracción química secuencial de pectinas y hemicelulosas a partir de la FIA, siguiendo la metodología de Rose *et al.* (1998). La FIA hidrolizada para almidón se mezcló con cuatro volúmenes de etanol; se dejó reposar toda la noche y el sedimento se lavó cuatro veces con etanol. Los polisacáridos pécticos y hemicelulósicos se obtuvieron secuencialmente solubilizando el sedimento en H₂O, EDTA (50 mM en acetato de sodio 50 mM, pH 6.5), Na₂CO₃ (50 mM), KOH 4 % y KOH 24 %; a las tres últimas soluciones se les añadió el agente reductor NaBH₄ (20 mM), y la fracción KOH al 4 % se descartó por baja recuperación. Cada fracción se obtuvo mediante la agitación del sedimento por 12 h a temperatura ambiente, primero de un volumen de 20 ml de la solución extractora, seguido de la separación del material solubilizado (sobrenadante) por centrifugación (8,500 x g) y una segunda extracción con 10 ml. Los sobrenadantes se mezclaron y la pastilla (sedimento) se utilizó para las subsiguientes extracciones siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, todas las fracciones, excepto la soluble en agua, se neutralizaron con ácido acético y se dializaron con membrana de celulosa de corte molecular en 6000 - 8000 Daltons (Sigma®) contra agua destilada. Las fracciones dializadas se filtraron con papel de fibra de vidrio (GF/A) y se almacenaron hasta su uso en la determinación de ácidos urónicos, azúcares totales, azúcares neutros y masa molecular aparente.

Despolimerización de pectinas y hemicelulosas

La masa molecular aparente, pectinas y hemicelulosas se determinaron por cromatografía de exclusión molecular (CEM) con la metodología de Rose *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Se inyectó una cantidad equivalente a 1 mg de ácidos urónicos en una columna (60 x 1.5 cm) de agarosa CL-6B. La muestra se eluyó a flujo constante (33.3 ml·h⁻¹) con acetato de amonio 0.2 M (pH de 5.2). El volumen eluido se colectó en un fraccionador Bio-Rad (modelo 2110) a volúmenes de 1.9 ml y se determinó el contenido de ácidos urónicos (Ahmed y Labavitch, 1977) de cada fracción para obtener el perfil de elución y dispersión. El volumen muerto y volumen total de elución de la columna se determinaron inyectando glucosa y un dextrano de 2'000,000 Daltons (Sigma®).

Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar, considerando como tratamientos los niveles del estado de madurez descritos más adelante. En las variables de composición y firmeza de los frutos se realizaron análisis de varianza (Minitab versión 15); en caso de valores $P \leq 0.05$, se hizo una comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El tamaño molecular se presenta en perfiles de elución y se compara subjetivamente con base en la distribución de urónidos o azúcares.

Los estados de madurez en que se realizaron las evaluaciones de las variables de respuesta, se

Solubility of pectins and hemicelluloses

The sequential chemical extraction of pectins and hemicelluloses was performed in triplicate from the AIF, following the methodology of Rose *et al.* (1998). Hydrolyzed AIF for starch was mixed with four volumes of ethanol; it was settled overnight and the sediment was washed four times with ethanol. Pectic polysaccharides and hemicelluloses were obtained by sequentially solubilizing the sediment in H₂O, EDTA (in 50 mM sodium acetate, pH 6.5), Na₂CO₃ (50 mM), 4 % KOH and 24 % KOH; the reducing agent NaBH₄ (20 mM) was added to the three last solutions and the 4 % KOH fraction was discarded due to low recovery. Each fraction was retained by sediment agitation for 12 h at room temperature, first from a volume of 20 ml extracting solution, followed by the separation of the solubilized material (supernatant) using centrifugation (8,500 x g) and a second extraction with 10 ml. The supernatants were mixed and the tablet (sediment) was used for subsequent extractions following the same procedure. Finally, all fractions, except the water soluble fraction, were neutralized with acetic acid and dialyzed using a cellulose membrane of molecular weight cut-off in 6000 - 8000 Daltons (Sigma®) against distilled water. The dialyzed fractions were filtered using glass fiber filter paper (GF/A) and stored until being used in the determination of uronic acids, total sugars, neutral sugars and apparent molecular mass.

Depolymerization of pectins and hemicelluloses

Apparent molecular mass, pectins and hemicelluloses were determined by molecular exclusion chromatography (MEC) using the methodology of Rose *et al.* (1998), with some modifications. Briefly, 1 mg of uronic acid was injected into a CL-6B agarose column (60 x 1.5 cm). The sample was eluted to constant flow (33.3 ml·h⁻¹) using 0.2 M ammonium acetate (pH of 5.2). The eluted volume was collected in a fractionator (Bio-Rad model 2110) at volumes of 1.9 ml and the uronic acid content of each fraction was determined (Ahmed and Labavitch, 1977) in order to obtain the dispersion and elution profile. Dead volume and total volume of elution of the column were determined injecting glucose and a dextran of 2'000,000 Daltons (Sigma®).

Data analysis

A completely randomized design was used, considering as treatments the levels of ripening described later. An analysis of variance (Minitab version 15) was performed in the variables of composition and firmness of fruit; in the case of values $P \leq 0.05$, a multiple comparison was performed using Tukey's test ($P \leq 0.05$). The molecular size is shown in elution profiles and is compared subjectively based on the distribution of uronides or sugars.

Ripening stages, at which assessments of the response variables were conducted, were determined subjectively

determinaron de manera subjetiva (Baez, 1998). Los frutos se cortaron longitudinalmente de ambos lados cuidando seguir la trayectoria del hueso desde el ápice hasta el área de inserción del pedúnculo. Se estimó el porcentaje de desarrollo de color (de crema a naranja) sobre la superficie total de la pulpa y se asignaron los estados de madurez según se indica en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Descripción de los estados de madurez de frutos de mango, con base en la coloración de la superficie de la pulpa.

ESTADO DE MADUREZ	ÍNDICE DE COLORACIÓN EN PULPA
2	Color crema a amarillo claro en ≤ 30 % de la superficie de la pulpa, y comienza a aparecer el color amarillo intenso
3	Color amarillo en 30 a 60 % de la superficie de la pulpa
4	Color amarillo en ≥ 60 % de la superficie de la pulpa, y naranja ≤ 30 %
5	Color naranja en ≥ 90 % de la superficie de la pulpa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Firmeza

La reducción total de la firmeza (Figura 1) se distribuyó en un 40 % en la maduración de estado de madurez 2 al 3 (ablandamiento inicial); un 44 % en el cambio del estado de madurez 3 al 4 (ablandamiento intermedio); y, finalmente, de un 9 % entre el estado de madurez 4 y el 5 (ablandamiento final). La maduración progresiva y el ablandamiento de la pulpa indicaron una maduración distintiva en los frutos de mango 'Kent' (Siller-Cepeda *et al.*, 2009). Para los fines de esta investigación, el periodo de ablandamiento se definió como etapa inicial (de la madurez 2 a 3), intermedia (de madurez 3 a 4) y tardía (de madurez 4 a 5), encontrando la mayor velocidad de pérdida de firmeza en los tres primeros estados de madurez.

Contenido de ácidos urónicos, azúcares totales, almidón y celulosa

Los frutos de mango presentaron variaciones significativas en los contenidos de ácidos urónicos, azúcares totales, almidón y celulosa (Cuadro 2). La concentración de almidón se redujo en un 99.1 % del estado 2 al 5, evento que ocurrió principalmente en el periodo de ablandamiento inicial, donde se degradó el 90 % de este polisacárido. El almidón fue el polisacárido de mayor abundancia en los frutos en madurez 2, y su reducción significativa durante la fase inicial del ablandamiento sugiere una posible contribución en esa etapa; sin embargo, en las etapas intermedia y tardía, la concentración de almidón fue baja y no presentó cambios significativos. La acumulación de ácidos

(Baez, 1998). Fruits were cut longitudinally from both sides following carefully the path of the pit from the apex to the area of insertion of the peduncle. Ripening stages were assigned according to percentage of color development on the total surface of the flesh (from color cream to orange) as indicated in the Table 1.

TABLE 1. Description of the ripening stages of mango fruits, based on the coloration of the surface flesh.

RIPENING STAGE	FLESH COLOR INDEX
2	Cream to light yellow color in ≤ 30 % of the surface of the flesh, intense yellow color starts to appear
3	Yellow color in 30 to 60 % of the surface of the flesh
4	Yellow color in ≥ 60 % of the surface of the flesh, and orange color ≤ 30 %
5	Orange color in ≥ 90 % of the surface of the flesh

RESULTS AND DISCUSSION

Firmness

A 40 % of total reduction of firmness (Figure 1) occurred in the ripening from the stage 2 to 3 (initial softening); 44 % in the change from ripening stage 3 to 4 (intermediate softening); and finally, 9 % between the ripening stage 4 to 5 (late softening). Progressive ripening and softening of the flesh showed a distinctive ripening in 'Kent' mango fruit (Siller-Cepeda *et al.*, 2009). For the purpose of this research, the softening period was defined as initial stage (from the ripening stage 2 to 3), intermediate (from the ripening stage 3 to 4) and late (from the ripening stage 4 to 5), finding the greater rate of loss of firmness in the first three stages of ripening.

Content of uronic acids, total sugars, starch and cellulose

Mango fruit showed significant variations in uronic acids, total sugars, starch, and cellulose content (Table 2). Starch concentration was reduced in 99.1 % from the stage 2 to 5, which occurred mainly during the initial softening period, where 90 % of this polysaccharide was reduced. Starch was the most abundant polysaccharide in the fruit during the ripening stage 2, and its significant reduction suggest a possible contribution in this stage; In contrast, at the intermediate and late stage of ripening, starch concentration was low and it did not show significant changes. The uronic acid accumulation during the initial softening agrees with that reported in 'Tommy Atkins' mango (Muda *et al.*,

urónicos en la etapa de ablandamiento inicial coincide con lo reportado en mango 'Tommy Atkins' (Muda *et al.*, 1995), y sugiere una síntesis de pectinas posiblemente a partir de la interconversión de azúcares de reserva. La reducción en azúcares totales, almidón y celulosa durante la maduración de los frutos de mango 'Kent' indicó cambios cuantitativos en los polímeros insolubles en alcohol, mismos que son convertidos a oligosacáridos y monosacáridos que imparten las características de textura y sabor del fruto (Yashoda *et al.*, 2006). Dicha conversión se induce mediante el estímulo hormonal del etileno, el cual activa la expresión génica de hidrolasas de carbohidratos estructurales y de reserva, entre otros genes de la maduración (Roe y Bruemmer, 1981; Sen *et al.*, 1985; Prasanna *et al.*, 2003).

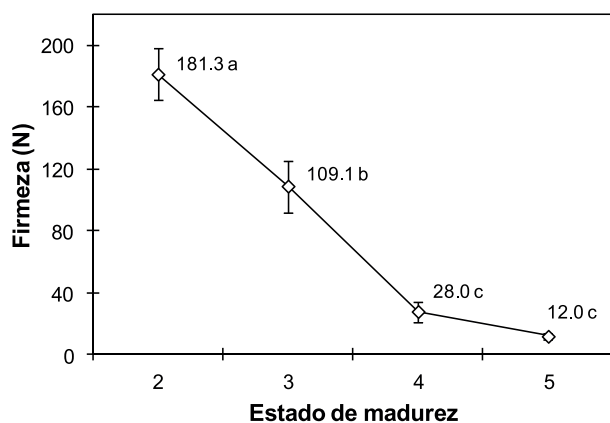


FIGURA 1. Cambios en la firmeza durante la maduración de frutos de mango 'Kent' almacenado a 20 ± 2 °C.

Cada punto representa el promedio de 16 repeticiones \pm error estándar.

Diferencia mínima significativa = 53.79, $P \leq 0.05$.

CUADRO 2. Cambios en la composición de ácidos urónicos, azúcares totales, almidón y celulosa en la fracción insoluble de frutos de mango 'Kent' en distinto estado de madurez.

Madurez	Ácidos urónicos	Azúcares totales	Almidón	Celulosa
	(g·100 g ⁻¹ pf ²)			
2	1.21 b ^γ	4.77 a	2.40 a	0.91 a
3	1.69 a	2.11 b	0.18 b	0.54 b
4	1.16 b	1.34 c	0.06 b	0.71 ab
5	1.05 b	1.30 c	0.01 b	0.39 b
DMS	0.34	0.67	1.21	0.25

^z Valores promedio de 3 repeticiones; pf = preso fresco.

^γ Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: Diferencia mínima significativa.

1995) and suggests a synthesis of pectins possibly from the conversion of reserve sugars. The reduction in total sugars, starch and cellulose during the ripening stage of 'Kent' mango fruit showed quantitative changes in alcohol-insoluble polymers, which are converted to oligosaccharides and monosaccharides and provide the texture and flavor of the fruit (Yashoda *et al.*, 2006). This conversion was induced by means of hormonal stimulation of ethylene, which activates gene expression of structural and reserve carbohydrate hydrolases, among other genes involved in ripening (Roe and Bruemmer, 1981; Sen *et al.*, 1985; Prasanna *et al.*, 2003).

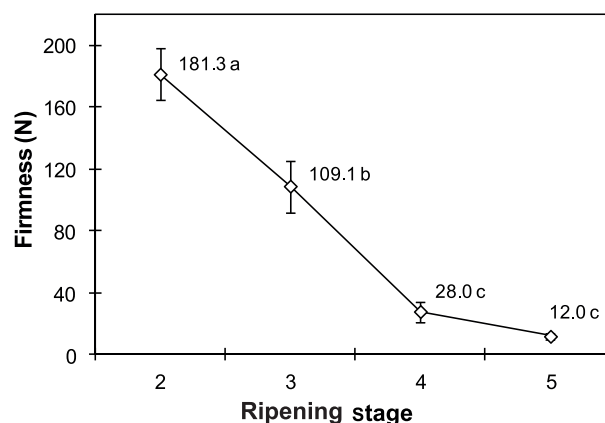


FIGURE 1. Changes in firmness during the ripening of 'Kent' mango fruits stored at 20 ± 2 °C.

Each mark represents the average of 16 replications \pm standard error.

Minimum significant difference = 53.79, $P \leq 0.05$.

TABLE 2. Changes in the composition of uronic acids, total sugars, starch and cellulose in the insoluble fraction of 'Kent' mango fruits in different ripening stages.

Ripening	Uronic acids	Total sugars	Starch	Cellulose
	(g·100 g ⁻¹ pf ²)			
2	1.21 b ^γ	4.77 a	2.40 a	0.91 a
3	1.69 a	2.11 b	0.18 b	0.54 b
4	1.16 b	1.34 c	0.06 b	0.71 ab
5	1.05 b	1.30 c	0.01 b	0.39 b
LSD	0.34	0.67	1.21	0.25

^z Mean values of 3 replications; pf = fresh weight

^γ Values with the same letter in each column are equal, according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$.

LSD: Minimum significant difference.

Cambio en la composición de azúcares neutros totales

La glucosa representó el 82.5 % del total de azúcares neutros de la FIA y se perdieron cerca de 1,500 mg·100 g⁻¹ peso fresco (pf) entre las etapas de madurez 2 y 3 (Cuadro 3). En el estado 4 se perdieron 1,234 mg·100 g⁻¹ pf, y los contenidos de glucosa en los estados 4 y 5 no fueron significativamente diferentes. Después de la glucosa, la galactosa y la arabinosa fueron los segundos en abundancia con una proporción cercana al 7 % cada uno. La galactosa redujo en un 49 % su concentración en el cambio de la madurez 2 a la 3, mientras que la arabinosa no presentó cambios significativos. El resto de los azúcares mantuvieron valores bajos y relativamente constantes. El ablandamiento inicial se caracterizó por una reducción en el contenido de glucosa y galactosa; mientras que, durante el ablandamiento intermedio y final, la pérdida de ambos monosacáridos fue progresiva, pero en menor grado. El incremento en las concentraciones de ramnosa y xilosa en la madurez 3, coincidió con el aumento en ácidos urónicos.

Change in total neutral sugar composition

Glucose represented 82.5 % of the total neutral sugars of AIF and about 1,500 mg·100 g⁻¹ fresh weight were lost between ripening stage 2 and 3 (Table 3). In stage 4, 1,234 mg·100 g⁻¹ fw were lost and glucose contents in stages 4 and 5 were not significantly different. After glucose, galactose and arabinose were second in abundance with a proportion close to 7 % each. Galactose concentration was reduced in 49 % from ripening stage 2 or 3, and no significant changes were observed for arabinose. The remaining sugars maintained low and relatively constant values. Initial softening was characterized by a reduction in glucose and galactose content; meanwhile, during intermediate and late softening, the loss of both monosaccharides was progressive, to a lesser extent. The increment in rhamnose and xylose concentrations during ripening stage 3, agrees with the increase in uronic acids.

CUADRO 3. Cambios en el contenido de azúcares neutros no celulósicos en la fracción insoluble en alcohol de frutos de mango 'Kent' en distinto estado de madurez.

Madurez	Concentración de azúcares neutros (mg·100 g ⁻¹ pf ²)							
	Ramnosa	Fucosa	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa	Total
2	17.3 b ^y	17.2 a	248.7 a	90.6 b	15.5 a	258.5 a	3062.6 a	3710.4 a
3	20.0 a	18.2 a	262.1 a	102.3 a	15.9 a	126.2 b	1567.0 b	2111.7 b
4	20.4 a	16.6 ab	250.9 a	84.6 b	14.9 a	112.1 b	332.8 c	832.4 c
5	20.3 a	14.3 b	246.7 a	76.8 b	17.8 a	96.6 b	216.7 c	689.1 c
DMS	2.2	2.3	36.8	6.2	5.7	42.2	300.8	351.1

² pf = peso fresco; valores promedio de 3 repeticiones.

^y Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey a una P≤0.05.

DMS: Diferencia mínima significativa.

TABLE 3. Changes in content of non-cellulosic neutral sugars in alcohol-insoluble fraction of 'Kent' mango fruits in different ripening stages.

Ripening	Neutral sugar concentration (mg·100 g ⁻¹ pf ²)							
	Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Total
2	17.3 b ^y	17.2 a	248.7 a	90.6 b	15.5 a	258.5 a	3062.6 a	3710.4 a
3	20.0 a	18.2 a	262.1 a	102.3 a	15.9 a	126.2 b	1567.0 b	2111.7 b
4	20.4 a	16.6 ab	250.9 a	84.6 b	14.9 a	112.1 b	332.8 c	832.4 c
5	20.3 a	14.3 b	246.7 a	76.8 b	17.8 a	96.6 b	216.7 c	689.1 c
LSD	2.2	2.3	36.8	6.2	5.7	42.2	300.8	351.1

² Mean values of 3 replications; pf = fresh weight

^y Values with the same letter in each column are equal, according to the Tukey's test at P≤0.05.

LSD: Least significant difference.

Solubilidad de pectinas y hemicelulosas

La extracción química secuencial de los polisacáridos de la pared celular reveló cambios importantes tanto en la matriz péctica como en la hemicelulósica. Los rendimientos en azúcares totales y en ácidos urónicos de las pectinas solubilizadas en H₂O, CDTA y Na₂CO₃, se muestran en el Cuadro 4. La fracción H₂O representó más del 80 % de los ácidos urónicos extraídos, seguida de la fracción EDTA.

CUADRO 4. Cambios en la concentración de pectinas y hemicelulosas fraccionadas por solubilidad durante la maduración de frutos de mango 'Kent'.

Madurez	Concentración de azúcares totales (mg·100 g ⁻¹ pf ^z)			
	H ₂ O	EDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 24 %
2	307.3 b ^y	21.2 ab	8.3 a	29.6 a
3	375.4 a	26.2 a	4.6 b	26.1 a
4	247.2 c	19.4 b	3.4 b	29.2 a
5	228.5 c	16.1 b	2.1 b	16.1 b
DMS	39.4	6.5	3.2	9.3
	Concentración de ácidos urónicos (mg·100 g ⁻¹ pf ^z)			
	H ₂ O	EDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 24 %
2	625.9 a ^y	77.9 b	3.7 a	4.2 ab
3	642.1 a	106.5 a	1.9 b	1.5 b
4	397.6 b	72.5 b	1.2 b	4.9 a
5	406.7 b	66.0 b	1.5 b	2.5 ab
DMS	39.4	83.8	14.5	1.3

^z pf = peso fresco; valores promedio de 3 repeticiones.

^y Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey a una P≤0.05.

DMS: Diferencia mínima significativa.

El análisis de los cambios en azúcares neutros de las fracciones pécticas se muestran en el Cuadro 5. La acumulación de azúcares totales en las pectinas solubles en H₂O en la madurez 3 coincidió con un aumento significativo en el contenido de arabinosa, la cual representó más del 65 % de esa fracción. La ramnosa, aunque presente en bajas concentraciones, también aumentó significativamente en la madurez 3, en contraste con la reducción que presentaron los residuos de glucosa, manosa, xilosa y fucosa. La acumulación de ácidos urónicos totales en los frutos de mango 'Kent' en estado de madurez 3 coincidió con el aumento de urónicos en la fracción EDTA, lo cual sugiere la posible acumulación de pectinas con asociación tipo iónica; sin embargo, en la fracción péctica hidrosoluble también se presentó un ligero aumento en urónicos, aunque éste no fue significativo.

Pectins and hemicelluloses solubility

The sequential chemical extraction of polysaccharides of the cell wall showed important changes both in pectic and in hemicellulose matrix. Yields in total sugars and uronic acids of solubilized pectins in H₂O, CDTA and Na₂CO₃ are shown in Table 4. H₂O fraction represented more than 80 % of the extracted uronic acids, followed by the EDTA fraction.

TABLE 4. Changes in the concentration of pectins and hemicellulose fractionated by solubility during the ripening of 'Kent' mango fruits.

Ripening	Total sugar concentration (mg·100 g ⁻¹ pf ^z)			
	H ₂ O	EDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 24 %
2	307.3 b ^y	21.2 ab	8.3 a	29.6 a
3	375.4 a	26.2 a	4.6 b	26.1 a
4	247.2 c	19.4 b	3.4 b	29.2 a
5	228.5 c	16.1 b	2.1 b	16.1 b
LSD	39.4	6.5	3.2	9.3
	Uronic acid concentration (mg·100 g ⁻¹ pf ^z)			
	H ₂ O	EDTA	Na ₂ CO ₃	KOH 24 %
2	625.9 a ^y	77.9 b	3.7 a	4.2 ab
3	642.1 a	106.5 a	1.9 b	1.5 b
4	397.6 b	72.5 b	1.2 b	4.9 a
5	406.7 b	66.0 b	1.5 b	2.5 ab
LSD	39.4	83.8	14.5	1.3

^z Mean values of 3 replications; pf = fresh weight

^y Values with the same letter in each column are equal, according to the Tukey's test at P≤0.05.

LSD: Least significant difference.

The analysis of changes in neutral sugars of pectic fractions is shown in Table 5. The accumulation of total sugars in H₂O soluble pectins during ripening stage 3 agrees with a significant increment in arabinose content, which represented more than 65 % of this fraction. Although rhamnose showed low concentrations, it had a significantly increment during ripening stage 3, in contrast to the reduction that the residues of glucose, mannose, xylose and fucose showed. The accumulation of total uronic acids in 'Kent' mango fruit during ripening stage 3 agreed with the increment of uronic acids in the EDTA fraction, suggesting the possible accumulation of pectins with ionic association; however, in soluble pectin fraction a slight increase in uronic acids was observed, although this was not significant.

CUADRO 5. Cambios en la composición de azúcares neutros de pectinas y hemicelulosas fraccionadas por solubilidad (H₂O, EDTA, Na₂CO₃ y KOH 24 %) durante la maduración de frutos de mango 'Kent'.

Concentración de azúcares neutros (mg·100 g ⁻¹ pf ²)							
Madurez	Ramnosa	Fucosa	Arabinosa	Xilosa	Manosa	Galactosa	Glucosa
H₂O							
2	5.82 b ^z	5.07 a	142.47 c	16.39 a	18.21 a	69.05 a	50.26 a
3	9.28 a	2.23 b	252.23 a	9.32 b	14.09 b	68.85 a	19.36 b
4	6.23 b	1.44 c	176.37 b	7.17 c	9.46 c	36.69 b	9.84 c
5	6.12 b	1.18 c	147.91 c	5.65 d	12.24 bc	44.64 b	10.74 c
DMS	0.93	0.34	11.52	1.37	4.11	10.30	7.71
EDTA							
2	2.93 b ^z	0.37 b	6.55 ab	1.36 a	1.15 a	4.29 ab	4.57 a
3	4.44 a	0.63 a	7.89 a	1.13 a	1.87 a	5.65 a	4.59 a
4	3.26 ab	0.11 c	4.83 bc	1.48 a	1.53 a	4.50 ab	3.67 ab
5	3.50 ab	0.29 b	4.07 c	1.21 a	1.09 a	3.42 b	2.49 b
DMS	1.32	0.17	2.44	1.11	0.81	1.86	1.96
Na₂CO₃							
2	0.35 a ^z	0.05 a	2.97 a	0.95 a	0.99 a	1.47 a	1.49 a
3	0.17 b	0.02 a	1.17 b	1.21 a	0.56 b	0.77 b	0.73 b
4	0.10 b	0.02 a	1.01 bc	1.09 a	0.31 c	0.51 c	0.36 c
5	0.09 b	0.02 a	0.58 c	0.50 b	0.23 c	0.33 c	0.32 c
DMS	0.12	0.03	0.44	0.28	0.11	0.20	0.29
KOH 24 %							
2	0.51 a ^z	0.98 ab	4.53 a	6.92 ab	1.70 a	3.72 a	11.29 a
3	0.10 b	1.12 ab	4.03 a	6.68 ab	1.71 a	3.11 a	9.32 a
4	0.16 ab	1.50 a	2.37 ab	8.71 a	1.64 a	3.74 a	11.08 a
5	0.04 b	0.60 b	1.98 b	4.93 b	1.12 a	2.04 b	5.43 b
DMS	0.36	0.60	2.01	2.44	0.99	0.62	2.40

Los azúcares se extrajeron a partir de la fracción insoluble en alcohol de mango 'Kent' en diferente estado de madurez.

^z Valores promedio de 3 repeticiones; pf = peso fresco.

^y Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: Diferencia mínima significativa.

TABLE 5. Changes in the composition of neutral sugars of pectins and hemicelluloses fractioned by solubility (H₂O, EDTA, Na₂CO₃ AND KOH 24 %) during the ripening of 'Kent' mango fruits.

Neutral sugar concentration (mg·100 g ⁻¹ pf ²)							
Ripening	Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
H₂O							
2	5.82 b ^z	5.07 a	142.47 c	16.39 a	18.21 a	69.05 a	50.26 a
3	9.28 a	2.23 b	252.23 a	9.32 b	14.09 b	68.85 a	19.36 b
4	6.23 b	1.44 c	176.37 b	7.17 c	9.46 c	36.69 b	9.84 c
5	6.12 b	1.18 c	147.91 c	5.65 d	12.24 bc	44.64 b	10.74 c
LSD	0.93	0.34	11.52	1.37	4.11	10.30	7.71
EDTA							
2	2.93 b ^z	0.37 b	6.55 ab	1.36 a	1.15 a	4.29 ab	4.57 a
3	4.44 a	0.63 a	7.89 a	1.13 a	1.87 a	5.65 a	4.59 a
4	3.26 ab	0.11 c	4.83 bc	1.48 a	1.53 a	4.50 ab	3.67 ab
5	3.50 ab	0.29 b	4.07 c	1.21 a	1.09 a	3.42 b	2.49 b
LSD	1.32	0.17	2.44	1.11	0.81	1.86	1.96
Na₂CO₃							
2	0.35 a ^z	0.05 a	2.97 a	0.95 a	0.99 a	1.47 a	1.49 a
3	0.17 b	0.02 a	1.17 b	1.21 a	0.56 b	0.77 b	0.73 b
4	0.10 b	0.02 a	1.01 bc	1.09 a	0.31 c	0.51 c	0.36 c
5	0.09 b	0.02 a	0.58 c	0.50 b	0.23 c	0.33 c	0.32 c
LSD	0.12	0.03	0.44	0.28	0.11	0.20	0.29
KOH 24 %							
2	0.51 a ^z	0.98 ab	4.53 a	6.92 ab	1.70 a	3.72 a	11.29 a
3	0.10 b	1.12 ab	4.03 a	6.68 ab	1.71 a	3.11 a	9.32 a
4	0.16 ab	1.50 a	2.37 ab	8.71 a	1.64 a	3.74 a	11.08 a
5	0.04 b	0.60 b	1.98 b	4.93 b	1.12 a	2.04 b	5.43 b
LSD	0.36	0.60	2.01	2.44	0.99	0.62	2.40

Sugars were extracted from the alcohol-insoluble fraction of 'Kent' mango fruit in different ripening stages.

^z Mean values of 3 replications; pf = fresh weight

^y Values with the same letter in each column are equal, according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$.

LSD: Least significant difference

Además, las pectinas hidrosolubles presentaron en la madurez 3 una acumulación significativa de azúcares totales que cromatográficamente se identificó en la concentración de arabinosa. Simultáneo al comportamiento anterior, en las pectinas unidas covalentemente se redujo el contenido de arabinosa, lo cual sugiere un posible desmantelamiento de esas estructuras. La acumulación de pectinas solubles en agua ha sido reportada durante la maduración temprana de mango 'Tommy Atkins' y 'Keitt' (Mitcham y MacDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995). La glucosa, xilosa, manosa y fucosa en las pectinas solubles en agua redujeron progresivamente su concentración por efecto de la maduración de los frutos; sin embargo, la glucosa también puede estar asociada a la presencia de dextrinas de mediano y alto peso molecular (derivadas de la hidrólisis incompleta de almidón), las cuales son solubles en agua (Sen *et al.*, 1985). En todas las fracciones pécticas, el contenido de arabinosa fue representativo y presentó una reducción progresiva hacia los estados 4 y 5. El alto contenido de arabinosa en las fracciones pécticas y su pérdida a través de la maduración fue reportada en frutos de mango 'Keitt', 'Tommy Atkins' y 'Alfonso' (Mitcham y MacDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Yashoda *et al.*, 2006). Prasanna *et al.* (2003, 2005) reportaron el aislamiento y caracterización de arabinogalactanos en mango 'Alfonso', los cuales presentaron una proporción 1:3 en el contenido de arabinosa:galactosa, y redujeron extensivamente la masa molecular con la maduración del fruto posiblemente por la acción de tres isoformas de β -galactosidasas. Sin embargo, en el presente estudio se muestra que la relación de arabinosa con respecto a galactosa fue mayor en todas las fracciones pécticas, lo cual indica la presencia de polisacáridos pécticos con alta ramificación de arabinosa. Es importante mencionar que las estructuras de arabinanos y arabinogalactanos se relacionan con funciones de restricción de la hidrólisis enzimática de pectinas a través de obstrucciones en la formación de enlaces iónicos entre homogalacturonanos, llegando incluso a influir en la capacidad de retención de agua en el apoplasto (Jones *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2008). En la fracción hemicelulósica, la reducción más significativa de glucosa ocurrió en la etapa tardía del ablandamiento; además, la concentración glucosa:xilosa se presentó en una proporción 1.6:1 en la madurez 2 y se modificó gradualmente hasta 1.1:1 en la madurez 5. Lo anterior sugiere un metabolismo activo sobre polisacáridos del tipo xiloglucano, en los cuales la estructura central de β -D (1-4)-glucano es similar a la celulosa, pero con sustituciones de α -D-xilosa a intervalos regulares de 3 residuos de glucosa (Brummell y Harpster, 2001).

Despolimerización de pectinas y hemicelulosas

La distribución de la masa molecular aparente de las pectinas solubles en H₂O y EDTA de los frutos en madurez 2 y 5, se muestra en la Figura 2. En la madurez 5, las pectinas hidrosolubles eluyeron en un perfil de mayor polidispersión en comparación con el perfil de la madurez 2 (Figura 2A). El perfil de elución de las pectinas solubles en EDTA presentó un cambio en la distribución de la concentración de urónicos, el cual es característico de la despolimerización de pectinas (Figura 2B); en la madurez 2, la mayor concentración eluyó entre los 70 y 120 ml; mientras que, en la madurez 5 la

Moreover, soluble pectins showed a significant accumulation of total sugars during ripening stage 3, which was observed chromatographically in the arabinose concentration. Simultaneously to the previous behavior, in covalently bound pectins the arabinose content was reduced, suggesting a possible disassembly of these structures. The accumulation of water soluble pectins has been reported during the early ripening stage of 'Tommy Atkins' and 'Keitt' mango fruit (Mitcham and MacDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995). Glucose, xylose, mannose and fucose in water soluble pectins gradually reduced their concentration due to the effect of fruit ripening; nevertheless, glucose can also be related to the presence of dextrans of medium and high molecular weight (obtained from the incomplete hydrolysis of starch), which are soluble in water (Sen *et al.*, 1985). In all pectic fractions, arabinose content was representative and showed a progressive reduction to ripening stages 4 and 5. The high arabinose content in pectin fractions and its loss during the ripening process, was reported in 'Keitt', 'Tommy Atkins' and 'Alfonso' mango fruit (Mitcham and MacDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Yashoda *et al.*, 2006). Prasanna *et al.* (2003, 2005) reported the isolation and characterization of arabinogalactans in 'Alfonso' mango, which showed a rate 1:3 arabinose:galactose content, and extensively reduced the molecular mass with the ripening of the fruit probably due to the action of three isoforms of β -galactosidase. However, this study shows that the relation of arabinose with respect to galactose was greater in all pectic fractions, indicating the presence of pectic polysaccharides with high ramification of arabinose. It is important to mention that arabinans and arabinogalactans structures are involved in the restriction of enzymatic hydrolysis of pectins through obstructions in the formation of ionic bonds among homogalacturonans, even influencing the water holding capacity in the apoplast (Jones *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2008). In the hemicellulose fraction, the most significant reduction of glucose occurred in the late softening stage; moreover, the glucose:xylose concentration was shown in a rate 1.6:1 during the ripening stage 2 and was gradually modified to 1.1:1 during the ripening stage 5. This suggests an active metabolism on xyloglucan-type polysaccharides, in which the central structure of β -D (1-4)-glucan is similar to the cellulose, but with substitutions of α -D-xylose at regular intervals of 3 glucose residues (Brummell and Harpster, 2001).

Depolymerization of pectins and hemicelluloses

The distribution of the apparent molecular mass of H₂O and EDTA soluble pectins obtained from fruit in ripening stage 2 and 5, are shown in Figure 2. In ripening stage 5, the hydrosoluble pectins eluted in a profile of greater polydispersion in comparison with pectins from ripening stage 2 (Figure 2A). The elution profile of EDTA soluble pectins showed a change in the distribution of uronic concentration, which is characteristic of pectin depolymerization (Figure 2B); during ripening stage 2, the greatest concentration eluted between 70 and 120 ml; while, during stage 5, the

concentración de poliuronidos se desplazó hacia el rango de 90 a 150 ml de elución.

Los polisacáridos hemicelulósicos de la fracción KOH 24 % presentaron un tamaño molecular mayor al de las pectinas solubles en H₂O y EDTA (Figura 3). Aunque la distribución molecular de las hemicelulosas estuvo repartida en la totalidad del volumen de elución, la mayor proporción se colectó entre los 50 y 80 ml. Los frutos en madurez presentaron un patrón de despolimerización de hemicelulosas, ya que los polisacáridos se concentraron entre los 60 y 110 ml, donde eluyen compuestos de menor tamaño.

El tamaño molecular de las pectinas quelatadas fue mayor que las pectinas hidrosolubles. El cambio en la distribución del tamaño de las pectinas solubles en agua por efecto de la maduración de los frutos se considera atípico, ya que muestra una acumulación de pectinas de mayor tamaño. No obstante, el patrón de polidispersión y la reducción de los urónicos cercanos al volumen muerto de las pectinas hidrosolubles de los frutos en madurez 5, indicaron la posible acción despolimerizante de pectinasas (Yashoda *et al.*, 2006). Esta reducción en grado de polimerización ha sido asociada al ablandamiento de frutos de mango 'Tommy Atkins' y 'Kaew' (Roe y Bruemmer, 1981; Mitcham y McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Varayanond *et al.*, 1999). La reducción de la masa molecular de las fracciones EDTA y KOH 24 % fue evidente en la madurez 5, lo que indicó que la despolimerización de pectinas de la lámina media (quelatadas) y hemicelulosas de alto grado de asociación a microfibrillas de celulosa, son factores que también contribuyen al ablandamiento del fruto.

concentration of polyuronides was shifted to the range of 90 to 150 ml of elution.

Hemicellulosic polysaccharides of KOH 24 % fraction showed greater molecular size than soluble pectins in H₂O and EDTA (Figure 3). Even though the molecular distribution of hemicelluloses was distributed over the entire volume of elution, the greatest proportion was collected between 50 and 80 ml. Fruit in ripening stage showed a hemicellulose depolymerization pattern, because polysaccharides were concentrated between 60 and 110 ml, where the compounds of smaller size are eluted.

The molecular size of chelated pectins was higher than the water-soluble pectins. The change in the size distribution of the water-soluble pectins by effect of fruit ripening was considered atypical, because it showed an accumulation of pectins in the range of greater size. However, the pattern of polydispersion and the reduction of uronic acids near to the dead volume in the water-soluble pectins of fruits during ripening stage 5, showed the possible depolymerizing action of pectinases (Yashoda *et al.*, 2006). This reduction in polymerization degree has been related to the softening of 'Tommy Atkins' and 'Kaew' mango fruit (Roe and Bruemmer, 1981; Mitcham and McDonald, 1992; Muda *et al.*, 1995; Varayanond *et al.*, 1999). The molecular mass reduction of the EDTA and KOH 24 % fractions during ripening stage 5 was clear and indicated that pectin depolymerization in the middle lamella (chelated) and hemicelluloses of high degree of association with microfibrils, are factors that also contribute to fruit softening.

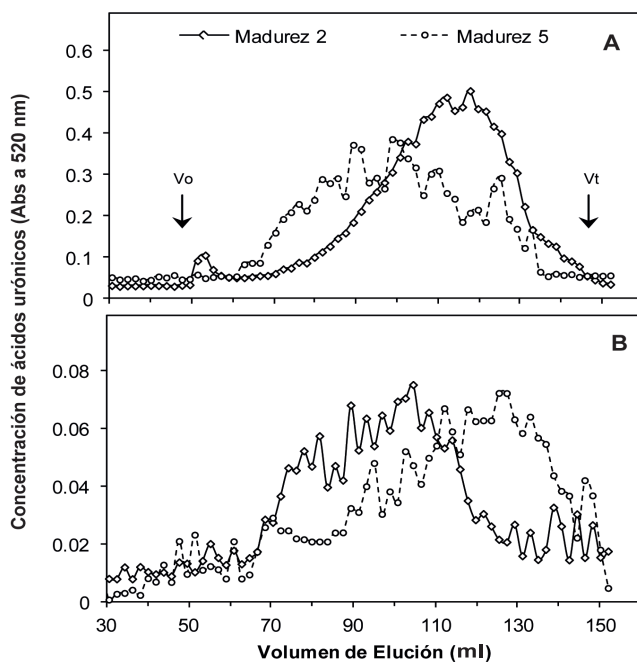


FIGURA 2. Cambios en la distribución de la masa molecular aparente de pectinas solubles en agua (A) y solubles en EDTA (B) de frutos de mango 'Kent' en dos estados de madurez (2 y 5).

Exclusión molecular en agarosa CL-6B, las fracciones se analizaron para contenido de ácidos urónicos y se reportó el valor de absorbancia a 520 nm. Vo = volumen muerto, Vt = volumen total.

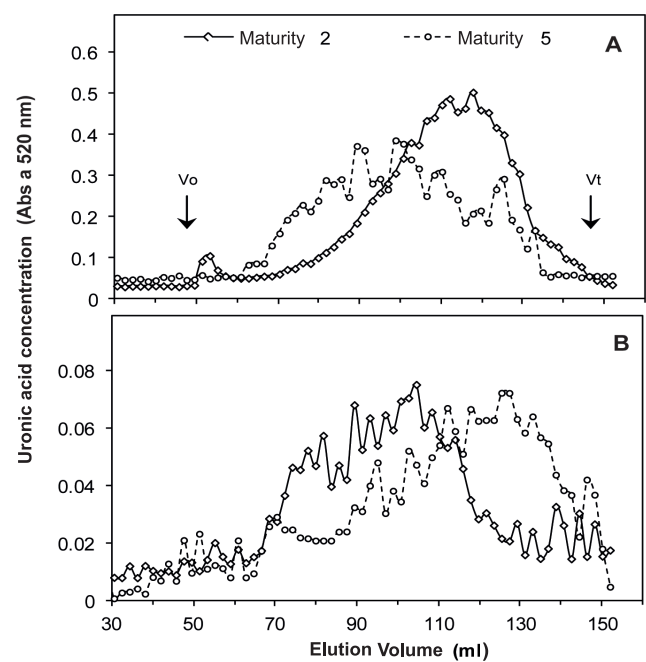


FIGURE 2. Changes in the distribution of the apparent molecular mass of water soluble (A) and EDTA soluble (B) pectins from 'Kent' mango fruit in two ripening stages (2 and 5).

Molecular exclusion in CL-6B agarose, the fractions for uronic acid content were analyzed and the absorbance value at 520 nm was reported. Vo= dead volume, Vt=total volume

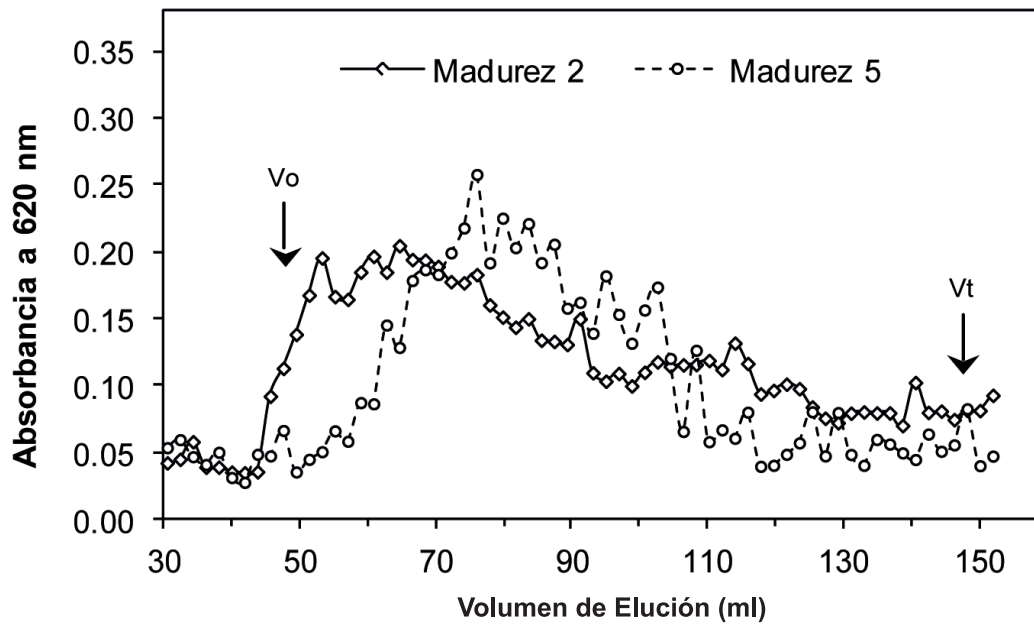


FIGURA 3. Cambios en la distribución de la masa molecular aparente de hemicelulosas (solubles en KOH 24 %) de frutos de mango 'Kent' en dos estados de madurez (2 y 5).

Exclusión molecular en agarosa CL-6B, las fracciones se analizaron para contenido de azúcares totales y se reporta el valor de absorbancia a 620 nm. Vo = volumen muerto, Vt = volumen total.

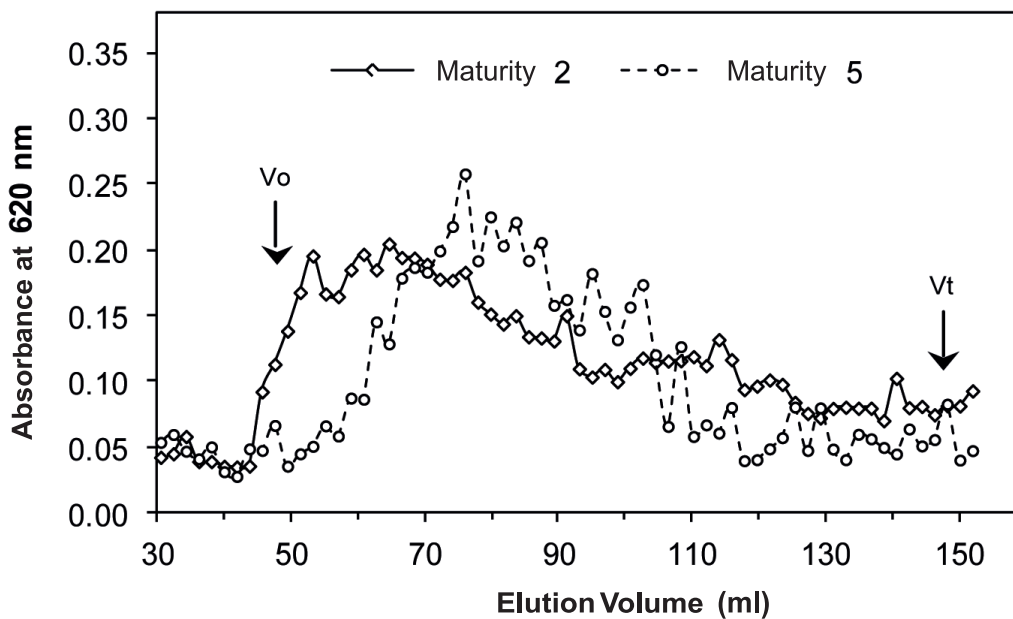


FIGURE 3. Changes in the distribution of the apparent molecular mass of hemicellulose (soluble in KOH 24 %) from 'Kent' mango fruit in two ripening stages (2 and 5).

Molecular exclusion in CL-6B agarose, the fractions for total sugar content were analyzed and the absorbance value at 620 nm was reported. Vo= dead volume, Vt=total volume.

CONCLUSIONES

El ablandamiento de los frutos de mango 'Kent' se encuentra diferencialmente asociado con la degradación de los polisacáridos de la lámina media y de la pared celular primaria. La degradación de almidón se asoció con el ablandamiento temprano de los frutos; sin embargo, los cambios en la composición de la pared celular contribuyeron al ablandamiento tardío de los frutos.

AGRADECIMIENTOS

A la colaboración técnica de Manuel A. Báez Sañudo, Laura Contreras Angulo y Rosalba Contreras Martínez. Al Fondo Mixto del estado de Sinaloa por el apoyo financiero (Proyecto clave Sin-2008-C01-98642).

LITERATURA CITADA

- AHMED, A. E. R.; LABAVITCH, J. M. 1977. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Food Biochemistry* 1: 361-365.
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D.; KARR, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 5: 340-345.
- ALI, Z.M.; ARMUGAM, S.; LAZAN, H. 1995. β -Galactosidase and its significance in ripening mango fruit. *Phytochemistry* 38: 1109-1114.
- BÁEZ S., R. 1998. Norma mexicana de calidad para mango fresco de exportación. Comité Técnico Científico de Empacadores de Mango de Exportación, A. C. (EMEX, A. C.). Guadalajara, Jalisco. México. 4 p.
- BRUMMELL, D. A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103-119.
- BRUMMELL, D. A.; HARPSTER, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311-340.
- GALÁN-SAÚCO V. 1999. El Cultivo del Mango. Ed. Mundi-Prensa. Malaga, Madrid. 298 p.
- IRETA, A.; GUZMAN, C. 2002. Guía técnica para la producción de mango en Sinaloa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico 22. Culiacán, Sinaloa. 152 p.
- JONES, L.; MILNE, J. L.; ASHFORD, D.; MCQUEEN-MASON, S. J. 2003. Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Plant Biology* 100: 11783-11788.
- MITCHAM, E. J.; MCDONALD, R. E. 1992. Cell wall modification during ripening of 'Keitt' and 'Tommy Atkins' mango fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science* 117: 919-924.
- MOORE, J. P.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. 2008. A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling & Behavior* 3(2): 102-104.
- MUDA, P.; SEYMOUR, G. B.; ERRINGTON, N.; TUCKER, G. A. 1995. Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. *Carbohydrate Polymers* 26: 255-260.
- OLLÉ, D.; LOZANO, Y. F.; BRILLOUET, J. 1996. Isolation and

CONCLUSIONS

The softening of 'Kent' mango fruit is differentially associated with the degradation of the polysaccharides of the middle lamella and primary cell wall. The degradation of starch was related with the early softening of fruits; however, changes in the composition of the cell wall contributed to a late softening of fruit.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thank you to Manuel A. Báez Sañudo, Laura Contreras Angulo and Rosalba Contreras Martínez for their technical contribution, and to Fondo Mixto de Sinaloa for the financial assistance (Project Sin-2008-C01-98642).

End of English Version

- characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2658-2662.
- PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. 2005. Multiple forms of β -galactosidase from mango (*Mangifera indica* L. 'Alphonso') fruit pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 797-803.
- PRASANNA, V.; YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. 2003. Pectic polysaccharides during ripening of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1182-1186.
- ROE, B.; BRUEMMER, J. H. 1981. Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of 'Keitt' mangoes. *Journal of Food Science* 46: 186-189.
- ROSE, J. K. C.; HADFIELD, K. A.; LABAVITCH, J. M.; BENETT, A. B. 1998. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology* 117: 345-361.
- SEN, S.; CHATTERJEE, B. K.; ROY, H. B. 1985. Amylase activity in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Indian Biology* 17: 25-28.
- SILLER-CEPEDA, J.; MUY-RANGEL, D.; BÁEZ-SAÑUDO, M.; ARAIZA-LIZARDE, E.; IRETA-OJEDA, A. 2009. Calidad poscosecha de variedades de mango de maduración temprana, intermedia y tardía. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 45-52.
- THARANATHAN, R. N.; YASHODA H. M.; PRABHA, T. N. 2006. Mango (*Mangifera indica* L.), "The King of Fruits"—An Overview. *Food Reviews International* 22: 95-123.
- VARANYANOND, W.; NAOHARA, J.; WONGKRAJANG, K.; MANABE, M. 1999. Changes in pectin content and average molecular weight of pectin during maturation of the mango 'Kaew'. *Food Science Technology Research* 5: 362-364.
- YASHODA, H.M.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R. N. 2006. Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 713-721.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal* 57: 508-514.