

TEC-46

ALPEORUJO Y SEMILLAS DE OLIVO PRESENTAN EL MISMO TIPO DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO.

Jiménez J. C., Alché J. D., Wang W. y Rodríguez-García M. I.*

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España.
[*mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es](mailto:mariaisabel.rodriguez@eez.csic.es)

RESUMEN

En las semillas del olivo se encuentran grandes cantidades de proteínas de almacenamiento de semillas (SSP = seed storage proteins) de tipo globulina, similares a las proteínas 11S de otras familias de plantas. Estas proteínas pueden representar más del 70% del total de proteína de la semilla madura. Este hecho tiene una gran relevancia en procesos vitales para la planta como son el desarrollo, maduración y germinación de la semilla.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las proteínas de almacenamiento tipo 11S en semillas de olivo son acumuladas dentro de las células tanto en el endospermo como en el embrión en forma de cuerpos proteicos (PBs = protein bodies).

Los estudios bioquímicos de caracterización preliminar de estas proteínas, confirman su presencia en los orujos como componente proteico mayoritario. Este hecho puede ser de gran relevancia para el aprovechamiento y utilización de los residuos industriales del proceso de elaboración del aceite de oliva como alimento para el ganado, utilización como fertilizante de compostaje, etc...

Palabras clave: semilla, proteínas de almacenamiento, seed storage proteins, globulinas tipo 11S, cotiledón, endospermo, embrión, cuerpos proteicos, *Olea europaea*, orujo, fertilizantes, compostaje.

INTRODUCCIÓN

El olivo y las industrias derivadas del olivo tienen una gran importancia en el área mediterránea. Mediante los diversos procesos de extracción del aceite de oliva se generan subproductos sólidos (orujos), en los cuales están incluidos el exocarpo (piel de la aceituna), mesocarpo (pulpa) y endocarpo (hueso) junto con la semilla, lo que equivale al 80 % del material procesado para obtener el aceite de oliva.

El reciclaje de estos productos de la industria derivada del olivo es de gran interés, ya que su almacenamiento causa serios problemas medioambientales, y además puede representar un valor añadido para la industria del procesado. Actualmente estos residuos sólidos se emplean mayoritariamente para la cogeneración de energía, aunque se están ensayando otros métodos de aprovechamiento (**Fernández-Bolaños et al., 2003**).

El uso de este material en la alimentación ganadera se considera una buena alternativa. Por ello, el conocimiento de la composición química y nutricional de estos derivados es de gran importancia para el posterior uso de los mismos (**Martín García et al., 2003**). Dentro del área mediterránea, la ganadería principal es de rumiantes (cabras y ovejas). Uno de los factores más importantes que debemos de conocer es la cantidad y composición de aminoácidos de las proteínas que en estos subproductos se encuentran. Esta información es necesaria para determinar el aprovechamiento proteico que lleva a cabo el ganado potencialmente alimentado con éstas, mediante la degradación proteica en el rumen (**Landau et al., 2000**).

La mayor parte de los estudios realizados sobre los componentes nutricionales de la aceituna se han centrado en la composición en ácidos grasos de ésta, por la implicación en la salud humana que tienen muchos de estos ácidos grasos. Se conoce muy poco sobre la composición proteica de la aceituna, y más concretamente de la semilla, ya que en ella se encuentra el mayor contenido proteico del total de proteínas del fruto del olivo.

Algunos trabajos pioneros han mostrado que tanto los embriones como el endospermo maduro de semillas de olivo contienen grandes cantidades de cuerpos proteicos (PBs) (**Ross et al., 1993; Wang et al., 2001**), donde las globulinas son las proteínas mayoritarias. Estas proteínas se encuentran

abundantemente en células del mesófilo del cotiledón en el embrión y así como en el tejido principal de almacenamiento de sustancias de reserva en semillas de dicotiledóneas: el endospermo.

Las proteínas de reserva en embriones y células vegetativas de plantas, son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla e hidrolizadas durante la maduración, imbibición y germinación de éstas, proporcionando una de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y azufre para el subsiguiente crecimiento y desarrollo. Estas proteínas de reserva en células vegetativas proporcionan una base para las semillas y frutos durante el crecimiento reproductivo y para una rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia, durante la germinación. **(Bawley & Black, 1994)**. El olivo constituye una excepción a esto, ya que las proteínas principales de reserva en semillas de olivo son globulinas 11S, aunque éstas son similares a las prolaminas en solubilidad **(Wang et al., 2001)**. Las globulinas 11S constituyen una familia en el olivo, con gran similitud a otras proteínas de almacenamiento como leguminas y α -conglutinas **(Nielsen et al., 1995)**. Las formas maduras, son codificadas por una pequeña familia de genes y son almacenadas como grandes complejos hexaméricos **(Badley et al., 1975)** en cuerpos proteicos. En el olivo, estos complejos hexaméricos son derivados de dos precursores, Solea I de 41 kDa y Solea II de 47.5 kDa, los cuales permanecen unidos por enlaces de hidrógeno. Después de su reducción, el precursor de 41kDa da lugar a 3 polipéptidos P2 (22.4 kDa), P3 (23.5 kDa) y P4 (27 kDa), así como el precursor de 47.5 kDa da lugar a dos polipéptidos P1 (20 kDa) y P5 (30 kDa) **(Wang et al., 2001)**.

Los objetivos fundamentales de este estudio han consistido, por una parte, en la caracterización y localización de las proteínas de almacenamiento mayoritarias de semillas maduras de olivo (globulinas tipo 11S). Por otro lado se ha pretendido caracterizar el perfil proteico de los productos sólidos derivados de la extracción del aceite de oliva, mediante SDS-PAGE, para intentar determinar así el tipo mayoritario de proteínas que los componen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- El material vegetal consistió en semillas maduras (160 DDA = días después de la antesis) de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad Picual recolectadas en la Estación Experimental del Zaidín (Granada), tomando como punto de inicio el proceso de antesis.
- Diversas muestras de residuos sólidos (alpeorujos) procedentes de la elaboración del aceite de oliva en sistemas de dos fases fueron obtenidas en diversas almazaras de Granada.

Métodos

Extracción de proteínas.

- Las semillas maduras fueron directamente homogeneizadas en un tampón que contenía 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.2% SDS y 1% 2-mercaptoetanol (condiciones desnaturizantes y reductoras). Después se sometió este homogeneizado a centrifugación 10000xg durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se realizó una precipitación con 2 volúmenes de acetona preenfriada y posterior resuspensión del precipitado en tampón de extracción. Este medio fue usado para los ensayos de SDS-PAGE e Inmunoblot.
- El residuo sólido obtenido del procesamiento de la oliva para la extracción del aceite fue calentado durante toda la noche a 100-120 °C, para su completo secado. Para la extracción de proteínas, se utilizaron 0.5g de residuo seco, homogeneizándolo en un mortero con un medio de extracción que contenía 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS and 100 mM ditio-treitol (DTT). Posteriormente, dicho homogeneizado fue clarificado mediante centrifugación a 10000xg durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y se realizó una precipitación con acetato amónico 100 mM en metanol. Las proteínas recuperadas después de la precipitación se disolvieron en el medio de extracción y fueron usadas para realizar los ensayos de SDS-PAGE.

Análisis electroforético.

Los extractos proteicos se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) **(Von Jagow et al., 1987)**, en un equipo MiniPROTEAN II (BioRad). Los geles corrieron a un voltaje de 120 v constantes durante 1 hora y 30 minutos. Las bandas de los distintos perfiles de los extractos proteicos fueron cuantificadas mediante el programa Quantity one 4.1.0 incorporado en el sistema Gel.doc 1000/2000, BioRAD

Producción de anticuerpos.

El anticuerpo primario utilizado en las inmunocitoquímicas fue obtenido del servicio de producción de anticuerpos del Instituto de Salud Carlos III (M^o de Salud) mediante la inmunización de conejos con la fracción proteica 11S aislada previamente, obteniéndose un anticuerpo policlonal contra la fracción proteica P1 (Wang et al., 2001).

Preparación del material para estudio de inmunolocalización a microscopía óptica.

Algunos segmentos de aproximadamente 1 mm³ de tejido de cotiledón y endospermo fueron prefijados 12h a 4 °C en una solución de fijación que contenía glutaraldehído al 0.2 % (v/v) y paraformaldehído al 4% (w/v) en tampón cacodilato sódico 50 mM, pH 7.2. Posteriormente y después de realizar 3 lavados en tampón cacodilato 50 mM durante 30 minutos cada uno se llevaron a cabo varias etapas de deshidratación mediante concentraciones crecientes de alcohol, a baja temperatura. Posteriormente las muestras se sometieron a la inclusión en resina Unicryl a baja temperatura con luz UV. Las secciones finas fueron obtenidas empleando un ultramicrotomo (Reichert Ultracut).

Para la inmunocitoquímica a microscopía de fluorescencia, todo el proceso se desarrolla de la misma forma sobre secciones finas (0.99 µm) colocadas sobre portaobjetos. El anticuerpo primario usado estaba en una dilución 1/100 en tampón TBS + BSA al 1%. Se incubó con la membrana durante 4h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario usado estaba conjugado con FITC (Amersham science) y se utilizó a una dilución 1/2000, durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Por último se montaron las muestras con cubreobjetos añadiéndole unas gotas de un producto antifading (Citifluor/glicerol/PBS (Sigma)) y sellando el borde de los cubres con laca de uñas.

Se utilizaron como controles negativos muestras que siguieron el mismo proceso pero omitiendo el anticuerpo primario.

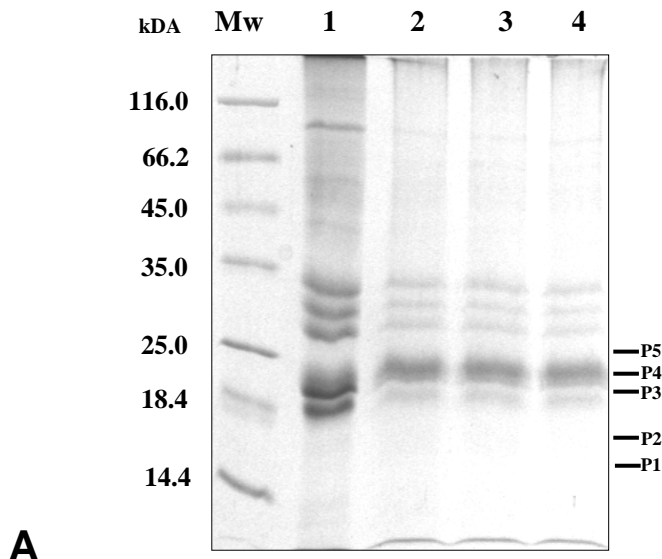
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

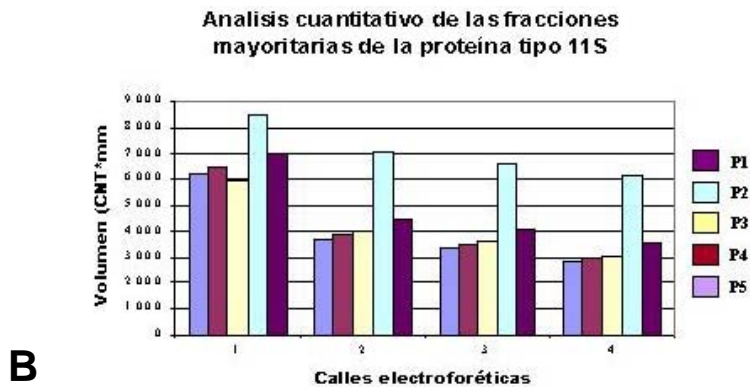
Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas de almacenamiento tipo 11S en distintas fases de procesado del fruto del olivo.

El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos crudos de semillas maduras de olivo (Fig. 1A), muestra que un gran porcentaje de las proteínas totales (aprox. 90%) corresponde a distintas formas de proteínas de almacenamiento tipo 11S, (polipéptidos P1(20 kDa), P2 (22.4 kDa), P3 (23.5 kDa), P4 (27 kDa) y P5 (30 kDa)).

En el caso de las muestras correspondientes al alpeorujo, dichos polipéptidos (P1 hasta P5) también constituyen la forma mayoritaria de especies proteicas presentes.

Figura 1. A. SDS-PAGE de proteínas de semillas maduras de olivo y residuo sólido seco del fruto del olivo. 1, Proteínas de semillas; 2-4, Diferentes residuos sólidos secos. P1-P5 son las distintas fracciones proteicas en que se dividen las proteínas de almacenamiento tipo 11S. **B.** Análisis cuantitativo de las fracciones mayoritarias de la proteína de almacenamiento tipo 11S.

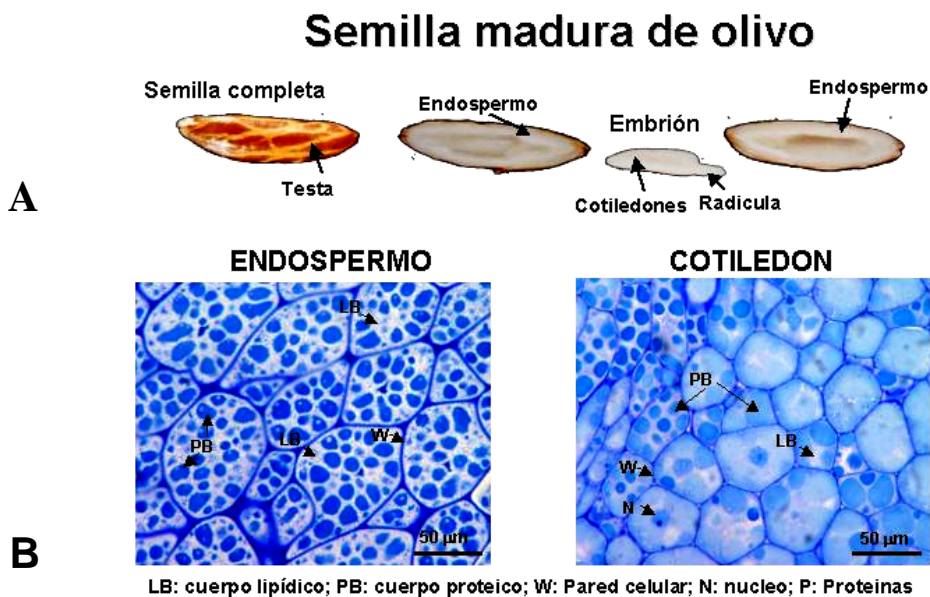




Localización de las proteínas de reserva tipo 11S en la semilla de olivo madura.

En la figura 2 podemos observar la estructura macroscópica y microscópica de la semilla madura de olivo. La semilla está formada por una cubierta de naturaleza polisacáridica, que rodea el tejido de reserva principal de la semilla del olivo (endospermo), que nutre y protege al embrión. Podemos observar que tanto el embrión como el endospermo poseen una serie de cuerpos proteicos de gran tamaño, teñidos de azul mediante una tinción general con azul de toluidina / metileno. Estos cuerpos están rodeados por pequeños cuerpos lipídicos que ocupan el resto del citoplasma.

Figura 2. Localización de proteínas de almacenamiento tipo 11S de semillas maduras de olivo. **A.** Estructura macroscópica y **B** microscópica de la semilla madura de olivo. **B.** Localización mediante microscopía de fluorescencia de las proteínas de reserva tipo 11S



En la figura 3 se puede observar la inmunolocalización, mediante microscopía de fluorescencia, de las proteínas tipo 11S en endospermo y cotiledón de semillas maduras de olivo. Podemos comprobar que el marcado fluorescente de estas proteínas se localiza casi exclusivamente en los cuerpos proteicos. En esta etapa del desarrollo de la semilla, la síntesis de estas proteínas de almacenamiento prácticamente ha terminado.

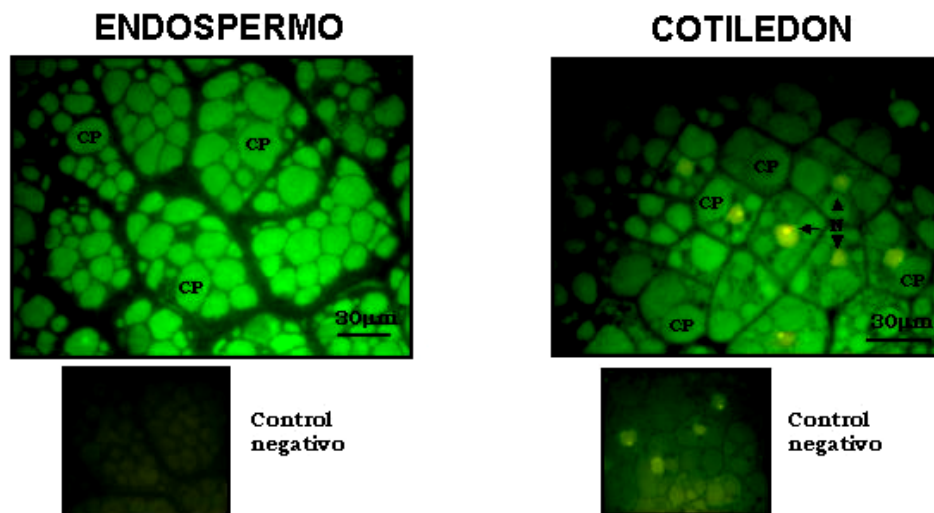
También se confirma que en las etapas mas tempranas de la formación de la semilla y hasta 80 – 100 DAA, la síntesis de estas proteínas es poco significativa, así como ha sido comprobado por estudios bioquímicos (**Wang et al., 2001**), que entre 105 hasta 130 DAA aprox, tiene lugar una máxima síntesis y acumulación de globulinas tipo 11S.

Podemos observar la distribución y tamaños de los cuerpos proteicos en las células de ambos tejidos (Figura 2B y 3). En las células del cotiledón, se observa que existen dos o tres cuerpos proteicos de gran tamaño por célula que ocupan la mayor parte del citoplasma, además de otros de menor tamaño. Por otro lado también son observables diferencias respecto al nivel de fluorescencia de los cuerpos proteicos dentro de las células, lo que puede significar que la distribución de las proteínas de almacenamiento tipo 11S no se da por igual dentro de los PBs dentro de una misma célula.

En las células del endospermo, los cuerpos proteicos ocupan gran parte del citoplasma, pero sus tamaños son más homogéneos, así como su marcado fluorescente.

Hemos comprobado también que el proceso de síntesis y acumulación de proteínas de almacenamiento tipo 11S, se da en paralelo, tanto en el endospermo de la semilla como en los cotiledones del embrión, aunque con un cierto desfase temporal, ya que se inicia más tempranamente en el endospermo.

Figura 3. Localización de proteínas de almacenamiento tipo 11S de semillas maduras de olivo mediante microscopía de fluorescencia.



Comparación del contenido aminoacídico de las proteínas contenidas en el alpeorujó y un precursor proteico de alta homología con las globulinas tipo 11S de olivo.

La tabla 1 muestra los alineamientos de una secuencia de 13 aminoácidos obtenida mediante degradación de Edman a partir del polipéptido P1 de semillas de olivo, con las secuencias de la base de datos SWALL utilizando el programa FASTA33_t (Pearson and Lipman 1988).

Tabla 1: Resultados de la búsqueda de identidad de la secuencia parcial del polipéptido P1 de semilla de olivo con proteínas de la base de datos SWALL tras utilizar el programa FASTA33_t.

Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Ungapped%	Overlap	E()
1 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q96475_LUPAN	Conglutin alpha (Fragment)	131	75.000	75.000	12	0.2
2 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q9XHP0_SESIN	11S globulin.	459	75.000	75.000	12	1.1
3 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:LEGB6_VICFA	Legumin type B [Contains: L	329	66.667	66.667	12	1.1
4 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:LEGB7_VICFA	Legumin type B [Contains: L	335	66.667	66.667	12	1.1
5 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:LEGB2_VICFA	Legumin type B [Contains: L	335	66.667	66.667	12	1.1
6 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:LEGB4_VICFA	Legumin type B precursor [C	484	66.667	66.667	12	1.5
7 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q39627_CITSI	Citrin.	486	66.667	66.667	12	1.5
8 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q9SE84_PERFR	Legumin-like protein.	471	81.818	81.818	11	2
9 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q8AUD2_SESIN	11S globulin.	497	75.000	75.000	12	2.1
10 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:GLU4_ORYSA	Glutelin precursor.	499	66.667	66.667	12	2.1
11 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:GLUB1_ORYSA	Glutelin type-B 1 precursor	499	66.667	66.667	12	2.1
12 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q6KA41_ORYSA	Glutelin.	499	66.667	66.667	12	2.1
13 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q8T725_ORYSA	Glutelin type-B.	495	75.000	75.000	12	2.9
14 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:GLU3_ORYSA	Glutelin type-A III precursor	496	58.333	58.333	12	2.9
15 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q75163_ORYSA	Glutelin.	496	58.333	58.333	12	2.9
16 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q40888_ORYSA	Glutelin.	497	58.333	58.333	12	2.9
17 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q7G2V6_ORYSA	Glutelin II (Glutelin prec	499	58.333	58.333	12	2.9
18 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:GLU2_ORYSA	Glutelin type II precursor.	499	58.333	58.333	12	2.9
19 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q40889_ORYSA	Glutelin.	499	58.333	58.333	12	2.9
20 <input checked="" type="checkbox"/>	UNIPROT:Q9SNZ2_ELAGV	Glutelin.	368	66.667	66.667	12	3.1

Los resultados obtenidos en trabajos previos (**Martín García et al., 2003 y Molina Alcaide et al., 2003**) nos muestran la importancia que pueden tener los subproductos sólidos de la industria oleícola en la alimentación ganadera en zonas semi-áridas del Mediterráneo. Estos autores estudiaron la digestibilidad de estos subproductos por los animales, mediante una estimación tanto in vivo como in sacco de la degradación proteica, y determinaron la composición aminoacídica de estos subproductos. En la siguiente tabla (tabla 2) se muestran los porcentajes de aminoácidos obtenidos por estos autores, al analizar los subproductos sólidos, junto con los porcentajes teóricos de aminoácidos, calculados para la secuencia SWALL: Q41128 (precursor de legumina), con la que las proteínas tipo 11S de olivo muestran elevada identidad de secuencia (Figura 4).

Tabla 2: Comparación de los porcentajes aminoacídicos entre las proteínas del alpeorajo y el precursor de legumina.

Aminoácidos	% aminoácidos alpeorajo	% aminoácidos Precursor legumina
Histidina (H)	3.50	2.25
Arginina (R)	8.58	9.22
Treonina (T)	4.49	4.10
Valina (V)	11.87	6.15
Metionina (M)	1.55	0.21
Isoleucina (I)	5.15	4.92
Leucina (L)	12.64	9.22
Fenilalanina (F)	6.31	3.69
Lisina (K)	7.24	2.05
Aspartato (D)	2.96	5.33
Glutamato (E)	6.14	7.58
Serina (S)	4.41	5.53
Glicina (G)	7.36	6.35
Alanina (A)	9.49	6.97
Prolina (P)	5.32	4.30
Tirosina (Y)	1.79	2.05
Cisteina (C)	1.15	1.23

Figura 4: Alineamiento parcial de las secuencias del precursor de legumina y la proteína tipo 11S de olivo.

```
>>UNIPROT:Q41128 QUERO Q41128 Legumin. (488 aa)
  initn: 52 init1: 52 opt: 62 Z-score: 147.4 bits: 31.4 E(): 3.9
Smith-Waterman score: 62; 58.333% identity (58.333% ungapped) in 12 aa overlap (1-12:299-310)

                               10
Sequen                        GLEESLCTMKIR
                               :.:.:.:.:.:.:
UNIPRO ERERLERQEREQEREDEREPRESHRGGGRDNGIEETLCTLRLENIHDFSRADIYNPQAGR
       270          280          290          300          310          320
UNIPRO ISTLNSHNLPLVLRWLQLSAEFGRLQRDAIYVPHWNRNNAHSVIVVVKGRAQVQVVDVDFGQT
       330          340          350          360          370          380
```

Tras comprobar la normalidad estadística de las poblaciones de datos mediante el test de Shapiro-Wilks ($W = 9.5$, $p > 0.05$), se aplicó el test estadístico de Kolmogorov-Smirnow ($K-S = 0.5145$, $p > 0.05$). Los resultados estadísticos nos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas composiciones aminoacídicas, con lo cual podemos decir que el contenido aminoacídico que existe en el subproducto de extracción de aceite se asemeja al de las proteínas de almacenamiento tipo 11S en semillas maduras de olivo.

Esta similitud en el contenido aminoacídico entre el alpeorujo y las proteínas de reserva de la semilla del olivo nos indica que durante el proceso de obtención del aceite de oliva, casi todo el contenido proteico del fruto del olivo se queda en este subproducto sólido seco derivado, lo que nos confirma por esta parte sus posibles utilidades. Estos datos están completamente de acuerdo con el análisis mediante SDS-PAGE de las formas proteicas presentes en la semilla madura y los alpeorujos detallado en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. Las semillas maduras de olivo contienen una gran proporción de proteínas de almacenamiento de semillas de tipo 11S, que constituyen una familia de proteínas en el olivo formada por cinco formas mayoritarias.
2. Las proteínas de almacenamiento tipo 11S se localizan en cuerpos proteicos en el citoplasma de las células del endospermo y de los cotiledones.
3. Los subproductos sólidos del proceso de extracción del aceite de oliva en dos fases contienen una gran proporción de proteínas de almacenamiento tipo 11S en sus cinco formas mayoritarias. Estos datos se confirman mediante análisis SDS-PAGE y determinación química e “in silico” a partir de la secuenciación parcial de estas proteínas y estudios de homología
4. Los datos obtenidos, así como el anticuerpo utilizado en este trabajo pueden constituir herramientas esenciales para estudiar la capacidad nutritiva de estos subproductos, y determinar su posible utilización como base o complemento nutricional, o fuente nitrogenada.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado gracias a los proyectos INIA-CAO99-003, AGL2003-00719 y MEC BFU2004-00601/BFI. Jiménez J C et al. agradecen al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la concesión de una beca predoctoral (I3P-CSIC 2002), y a Concepción Martínez Sierra su ayuda técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Badley R.A., Atkinson D., Hauser H., Oldani D., Green J.P. & Stubbs J.M.** 1975. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochim Biophys Acta*. 412: 214-228
2. **Bewley J.D. & Black M.** 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*, 2nd Edn. Plenum Press, New York, 445 p.

3. **Fernández-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Heredia A., Guillén R. & Jiménez A.** 2003. Aplicación de un tratamiento al vapor para aprovechamiento integral del alpeorujo. In: Simposium Científico-Técnico Expoliva 2003, TEC - 09
4. **Landau S., Silanikove N., Nitsan Z., Barkai D., Baram H., Provenza F.D. & Perevolotsky A.** 2000. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Appl Anim Behav Sci.* 69, 199-213
5. **Nielsen, N.C., Jung, R., Nam, Y., Beaman, T.W., Oliveira, L.O., and Bassuner, R.B.** 1995 Synthesis and assembly of 11S globulins. *J Plant Physiol.* 145: 641-647
6. **Martín García A.I., Moumen A., Yáñez Ruíz D.R., Molina Alcaide E.** 2003. Chemical composition and nutrients availability for gotas and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim Feed Scie Techn.* 107: 61-74
7. **Molina Alcaide E., Yáñez Ruíz D.R., Moumen A. & Martín García A.I.** 2003. Ruminant degradability and in vitro intestinal digestibility of sunflower meal and in vitro digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal comparison between gotas and sheep. *Anim Feed Scie and Techn.* 110: 3-15.
8. **Pearson W.R., Lipman D.J.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(8):2444-2448.
9. **Ross J.H.E., Sanchez J., Millan F. & Murphy D.J.** 1993. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissue. in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea Americana*). *Plant Sci.* 93: 203-210
10. **Schagger H. & Von Jagow G.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Ann Bioch.* 166, 368-379
11. **Wang W., Alché J.D., Castro A.J. & Rodríguez-García M.I.** 2001. Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *Olea europaea*. *Int J Dev Biol.* 45 (S1): 63-64