

**Estudio de la Degradación Enzimática del Glucósido  
Amargo Oleuropeína Durante el Procesamiento de  
Aceitunas de Mesa**

**Eva M<sup>a</sup> Ramírez Castro**

Sevilla, 2015



# Índice

---



---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Aceituna de mesa: importancia social y económica.....	3
1.2. Procesos de elaboración de aceitunas de mesa.....	7
1.2.1. Aceituna verde estilo español .....	8
1.2.2. Aceituna negra oxidada o estilo californiano.....	11
1.2.3. Aceituna natural en salmuera: verde de color cambiante o negras naturales al estilo griego.....	13
1.2.4. Aceitunas deshidratadas.....	14
1.3. Compuestos fenólicos en aceitunas .....	15
1.3.1. Composición fenólica del fruto fresco.....	16
1.3.2. Composición fenólica del fruto procesado .....	21
1.3.3. Influencia de los factores agronómicos sobre la composición fenólica de las aceitunas.....	23
1.4. Enzimas en alimentos .....	26
1.4.1. Enzimas oxidoreductasas: polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD).....	28
1.4.1.1. Enzimas oxidoreductasas (PPO y POD) relacionadas con compuestos polifenólicos en aceitunas.....	31
1.4.2. Enzimas hidrolasas: $\beta$ -glucosidasa y esterasa.....	33
1.4.1.2. Enzimas hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y esterasa) relacionadas con compuestos polifenólicos en aceitunas.....	36
1.5. Influencia de los procesos tecnológicos sobre la composición fenólica en aceitunas de mesa.....	38
1.5.1. Transformaciones químicas .....	38
1.5.1.1. Aceitunas verdes estilo español .....	39
1.5.1.2. Aceitunas negras oxidadas .....	40
1.5.1.3. Aceitunas naturales en salmuera .....	41
1.5.1.4. Aceitunas deshidratadas .....	42
1.5.2. Transformaciones con intervención enzimática.....	43
1.5.2.1. Aceitunas verdes estilo español .....	43
1.5.2.2. Aceitunas negras oxidadas y aceitunas naturales en salmuera .....	44
1.5.2.3. Aceitunas deshidratadas .....	46

---

<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.1. Determinación de la concentración de cloruro sódico.....	55
3.2. Determinación de la acidez libre, acidez combinada y pH.....	55
3.3. Análisis de ácidos orgánicos en salmueras y jugo de aceitunas .....	56
3.4. Análisis del color superficial de las aceitunas .....	57
3.5. Análisis del color de los jugos de aceitunas .....	57
3.6. Determinación del contenido de humedad de las aceitunas .....	58
3.7. Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ ) de las aceitunas .....	58
3.8. Determinación de la textura de las aceitunas.....	58
3.9. Análisis microbiológico.....	58
3.10. Análisis de compuestos polifenólicos.....	59
3.10.1. Preparación de la muestra .....	59
3.10.1.1. Pulpa de aceitunas .....	59
3.10.1.2. Salmuera de aceitunas .....	60
3.10.2. Determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).....	60
3.11. Análisis de compuestos cloroplásticos .....	62
3.11.1. Preparación de la muestra .....	62
3.11.2. Determinación de compuestos cloroplásticos.....	63
3.12. Determinación de la actividad enzimática en aceitunas .....	64
3.12.1. Obtención del material enzimático o polvo cetónico.....	64
3.12.2. Determinación de la actividad de las enzimas oxidoreductasas: PPO y POD .....	65
3.12.2.1. Obtención del extracto enzimático.....	65
3.12.2.2. Condiciones de reacción para la PPO .....	65
3.12.2.3. Condiciones de reacción para la POD.....	66
3.12.2.4. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría.....	66
3.12.3. Determinación de la actividad de las enzimas hidrolasas: $\beta$ -glucosidasa y esterasa.....	67
3.12.3.1. Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa.....	67

3.12.3.1.1. Obtención del extracto enzimático .....	67
3.12.3.1.2. Condiciones de reacción para la $\beta$ - glucosidasa .....	67
3.12.3.1.3. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría .....	68
3.12.3.2. Determinación de la actividad esterasa .....	68
3.12.3.2.1. Obtención del extracto enzimático .....	68
3.12.3.2.2. Condiciones de reacción para la esterasa ....	69
3.12.3.2.3. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría .....	69
3.13. Evaluación subjetiva de la calidad de las aceitunas.....	70
3.14. Evaluación de la composición fenólica y actividad enzimática en fruto fresco.....	70
3.14.1. Materia prima.....	70
3.14.2. Identificación de compuestos fenólicos y actividad enzimática en fruto fresco .....	71
3.14.3. Influencia de la temperatura y pH sobre la actividad de las diferentes enzimas estudiadas .....	71
3.15. Influencia de las enzimas oxidativas en los procesos de elaboración de las aceitunas de mesa .....	72
3.15.1. Postrecolección .....	72
3.15.1.1. Efecto del “golpeado” en aceitunas sobre el contenido de compuestos fenólicos.....	72
3.15.1.2. Experiencias para la reducción de la formación de manchas oscuras debido al “golpeado” durante la recolección mecanizada en aceitunas verdes estilo español.....	74
3.15.1.2.1. Efecto de la recolección mecánica sobre la calidad de aceitunas .....	74
3.15.1.2.2. Aplicación de películas protectoras previas al almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno. Estudio sobre la calidad de la aceituna procesada como verde estilo español .....	76

3.15.2. Aceitunas verdes estilo español y aceitunas verdes naturales en salmuera .....	79
3.15.2.1. Influencia del proceso de elaboración en el color de los frutos procesados .....	79
3.15.2.2. Aceitunas verdes preparadas en condiciones asépticas .....	80
3.15.3. Aceitunas deshidratadas .....	81
3.15.4. Nuevo proceso de eliminación del amargor basado en la eliminación enzimática de la oleuropeína .....	83
3.16. Transformaciones de los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceitunas verdes naturales .....	85
3.16.1. Hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas de mesa.....	85
3.16.1.1. Hidrólisis química de la oleuropeína.....	85
3.16.1.2. Hidrólisis enzimática de la oleuropeína .....	87
3.16.1.2.1. Experiencias para demostrar la participación de enzimas endógenas en la hidrólisis de la oleuropeína durante el almacenamiento de los frutos en salmuera .....	87
3.16.1.2.2. Factores que intervienen en la hidrólisis enzimática de las aceitunas no tratadas con NaOH.....	89
3.16.2. Estudios para el diseño de un nuevo proceso de elaboración de aceitunas verdes naturales .....	93
3.16.2.1. Inactivación de enzimas hidrolíticas .....	93
3.16.2.2. Estudio de la capacidad hidrolítica de las BAL sobre la molécula de oleuropeína .....	94
3.16.2.2.1. Aislamiento de cepas y mantenimiento.....	94
3.16.2.2.2. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en soluciones modelos...	95
3.16.2.2.3. Evolución de la oleuropeína durante la fermentación de aceitunas verdes naturales en salmuera.....	96
3.17. Análisis estadístico .....	98

---

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
4.1. Evaluación de la composición fenólica y actividad enzimática en fruto fresco.....	101
4.1.1. Identificación de compuestos fenólicos en pulpa de aceitunas frescas .....	101
4.1.2. Enzimas endógenas relacionadas con las transformaciones de la oleuropeína.....	113
4.1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas oxidasas ...	113
4.1.2.2. Evaluación de la actividad de las enzimas hidrolasas .	119
4.1.3. Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad de las diferentes enzimas estudiadas.....	124
4.2. Influencia de las enzimas oxidativas en los procesos de elaboración de las aceitunas de mesa .....	130
4.2.1. Postrecolección .....	130
4.2.1.1. Efecto del “golpeado” en aceitunas sobre el contenido de compuestos fenólicos.....	130
4.2.1.2. Experiencias para la reducción de la formación de manchas oscuras debido al golpeado durante la recolección mecanizada en aceitunas verdes estilo español .....	139
4.2.1.2.1. Efecto de la recolección mecánica sobre la calidad de aceitunas.....	139
4.2.1.2.2. Aplicación de películas protectoras previas al almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno .....	146
4.2.2. Aceitunas verdes estilo español y aceitunas verdes naturales en salmuera: importancia de las transformaciones enzimáticas de los compuestos fenólicos en el color de los frutos procesados .....	156
4.2.2.1. Evaluación de los compuestos clorofílicos de las aceitunas.....	159
4.2.2.2. Evaluación del contenido fenólico y actividad PPO .....	167

4.2.3. Aceitunas deshidratadas: evolución de los compuestos fenólicos durante el procesado.....	174
4.2.4. Nuevo proceso de eliminación del amargor basado en la oxidación enzimática de la oleuropeína.....	181
4.3. Transformación de los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceitunas verdes naturales.....	191
4.3.1. Hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas de mesa.....	191
4.3.1.1. Hidrólisis química de la oleuropeína.....	191
4.3.1.2. Hidrólisis enzimática de la oleuropeína .....	195
4.3.1.2.1. Experiencia para demostrar la participación de enzimas endógenas en la hidrólisis de oleuropeína durante el almacenamiento de los frutos en salmuera .....	196
4.3.1.2.2. Factores que intervienen en la hidrólisis enzimática de las aceitunas no tratadas con NaOH.....	202
4.3.2. Estudios para el diseño de un nuevo proceso de elaboración de aceitunas verdes naturales .....	221
4.3.2.1. Inactivación de enzimas hidrolíticas .....	221
4.3.2.2. Estudio de la capacidad hidrolítica de las BAL sobre la molécula de oleuropeína.....	228
4.3.2.2.1. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en soluciones modelo ....	228
4.3.2.2.2. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en aceitunas verdes naturales en salmuera a escala piloto .....	232
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>244</b>

# **1. Introducción**

---



### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Aceituna de mesa: importancia social y económica

Los orígenes del olivo (*Olea europea* L.) se remontan muy atrás en la historia, la primera referencia escrita sobre esta planta se encuentra recogida en el libro del Génesis. Su origen se sitúa posiblemente en la antigua Mesopotamia, siendo los griegos y fenicios los responsables de su expansión por todos los países de la cuenca mediterránea, abarcando Europa, África, Asia Menor e incluso la India. Para los pueblos primitivos, el olivo y su fruto han sido siempre símbolo de paz, sabiduría y progreso, y el aceite ha sido muy apreciado por sus valores nutritivos y medicinales.

En España, fueron los romanos quienes dieron continuidad al olivo y lo extendieron considerablemente a partir del siglo II a. C. Posteriormente, los árabes intensificaron y perfeccionaron su cultivo, que perduró a lo largo de los siglos. Con el descubrimiento de América en el siglo XV, el cultivo del olivo pasó al Nuevo Mundo, y actualmente se encuentra extendido en todos los continentes.

El olivo es uno de los cultivos que más ha influido en la alimentación de los pueblos del mediterráneo, no sólo porque a partir de su fruto se elabora el apreciado aceite de oliva, considerado como alimento básico de la dieta mediterránea, sino porque de él se obtiene un excelente aperitivo, la aceituna de mesa, que al igual que el aceite tiene gran importancia en nuestra dieta.

En el siglo I ya existen referencias en España sobre el consumo de aceitunas de mesa. Es el caso de los famosos escritos de Columela, donde el gaditano recogía los diferentes métodos de preparación: en salmuera, aliñadas con hinojo, con hojas de lentisco y vinagre, etc (Columela, 42). La preparación a escala industrial de las primeras aceitunas de mesa en España “verdes al estilo español o sevillano” comenzó a finales del siglo XIX en la provincia de Sevilla. Desde entonces y hasta ahora, España ha liderado los mercados mundiales, tanto en volumen de producción como de comercialización. Actualmente, la aceituna de mesa es muy apreciada en numerosos países, en particular como aperitivo, aunque también es consumida en algunos países

formando parte del desayuno, acompañando a bebidas, como el Martini, o como ingrediente y adorno de muchas preparaciones culinarias.

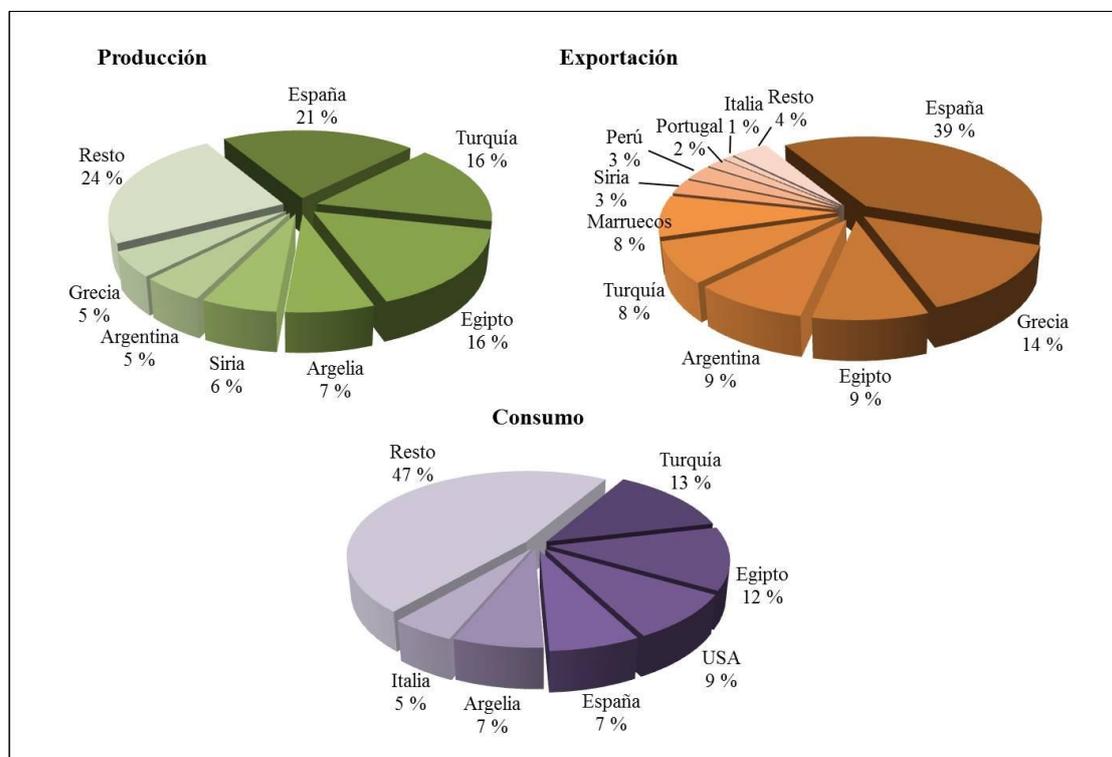
Según datos del Consejo Oleícola Internacional (COI, 2014), el olivar mundial está constituido por unos 850 millones de árboles que ocupan una superficie superior a 10 millones de hectáreas, de las cuales, más de un millón se dedica a la producción de aceitunas de mesa. Se recolectan más de 18 millones de toneladas anuales de aceitunas, de las cuales el 90 % es destinado a la producción de aceite y el 10 % restante a la elaboración de aceitunas de mesa.

Atendiendo a la Reglamentación Técnico-Sanitaria Española (BOE, 2001, 2013) se denomina “aceituna de mesa al fruto de variedades determinadas del olivo cultivado (*Olea europaea sativa* Hoffg, Link), sano, cogido en el estado de madurez adecuado y, de calidad tal, que sometido a las preparaciones adecuadas, dé un producto de consumo y de buena conservación”.

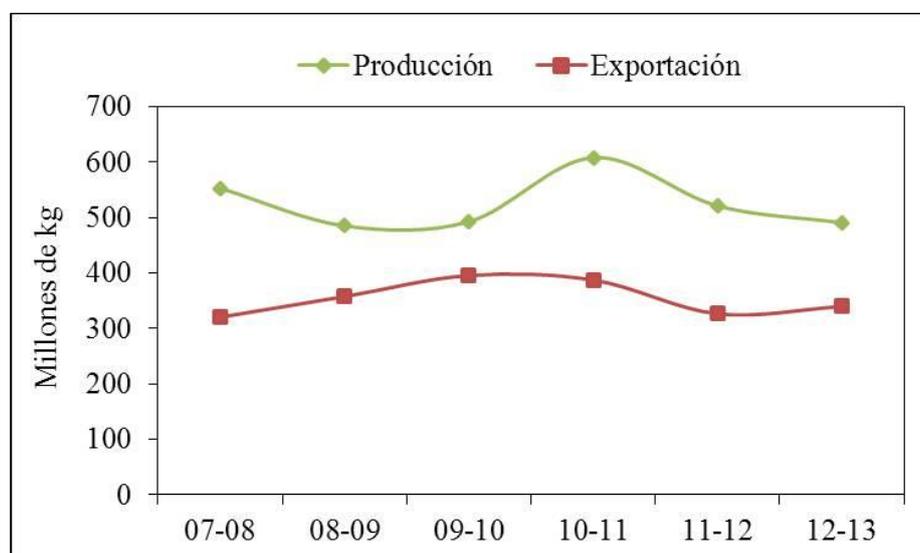
España es el primer país productor de aceitunas de mesa (Figura 1). En las últimas cinco campañas la producción media mundial ascendió a 2.472.700 toneladas, de las cuales, un 21 % se produjo en nuestro país, seguido por otros países como Turquía, Egipto, Argentina, Siria, Argelia y Grecia, entre otros. Asimismo, España también es el primer país exportador de este producto, representando el 39 % del total de las exportaciones (Figura 1). Estas aceitunas se destinan a más de 150 países, destacando las exportaciones realizadas a la Unión Europea y Estados Unidos. Respecto al consumo de aceitunas de mesa a nivel mundial, los tres mayores consumidores son Turquía, Egipto y Estados Unidos, ocupando España el cuarto lugar (Figura 1).

En España, la producción y exportación de aceitunas se han mantenido constantes durante las campañas 2007-2013 (Figura 2). La producción media en los últimos años (2004-2013) se ha incrementado en un 57 % respecto a la media de la década anterior (1994-2003), pasando de 330.057 a 516.919 toneladas. El 68 % de la producción española en los últimos seis años se ha exportado al exterior, mientras que las importaciones han sido poco importantes y proceden fundamentalmente de países de la Unión Europea.

**Figura 1.** Producción, exportación y consumo medio mundial de aceitunas de mesa durante las últimas campañas (2009-2014 para producción y consumo, 2008-2013 para exportación). Fuente: Consejo Oleícola Internacional (COI, 2014).

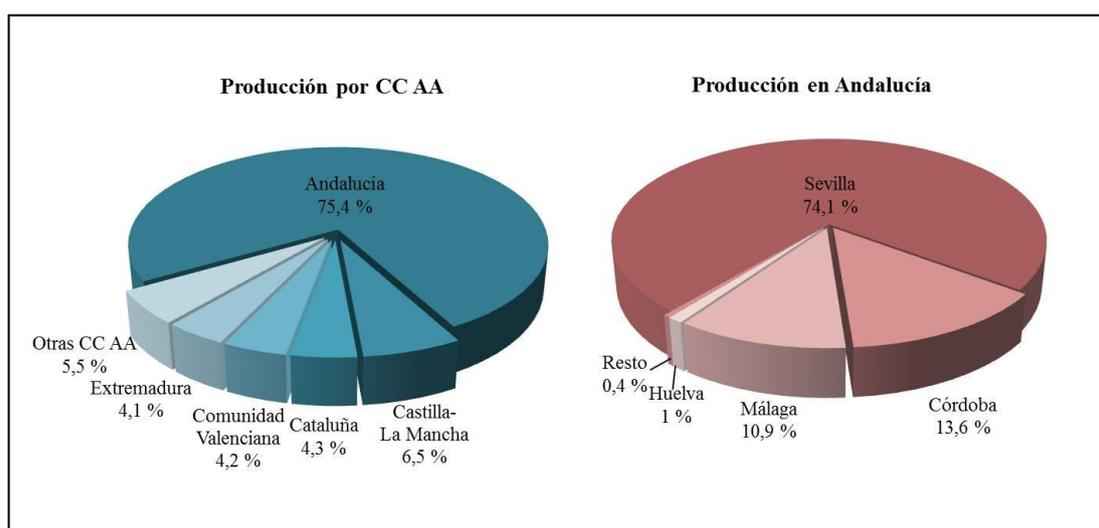


**Figura 2.** Producción y exportación (millones de kg) de aceitunas de mesa en España durante el periodo 2007-2013. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014).



Asimismo Andalucía es la comunidad autónoma con mayor producción de aceitunas de mesa en España, de hecho durante la campaña 2012-13 representaba un 75,4 % de la producción nacional, seguida en menor medida por Castilla-La Mancha (6,5 %), Cataluña (4,3 %), Comunidad Valenciana (4,2 %) y Extremadura (4,1 %). En Andalucía, Sevilla es la provincia con mayor producción, representando más de la mitad regional (74,1 %), seguida a mucha distancia de Córdoba y Málaga. (Figura 3).

**Figura 3.** Producción nacional de aceitunas de mesa por comunidades autónomas (CC AA) y en Andalucía durante la campaña 2012-2013. Fuentes: MAGRAMA y Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA, 2014).

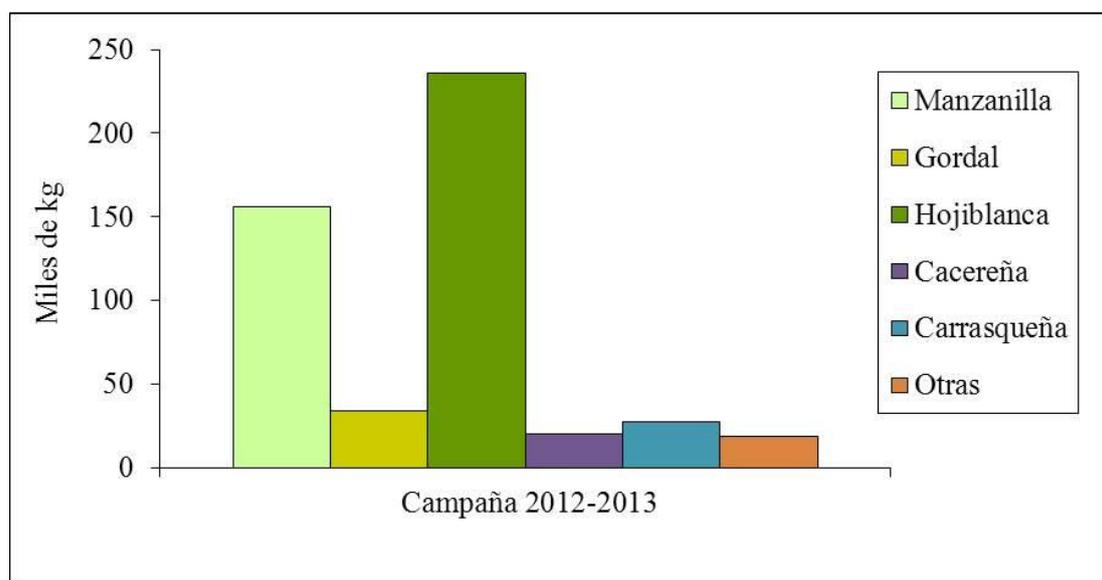


Las principales variedades utilizadas para la elaboración de aceitunas de mesa son Hojiblanca, Manzanilla, Gordal, Cacereña, Carrasqueña y Aloreña, entre otras, siendo las dos primeras variedades las más empleadas, seguidas de la variedad Gordal (Figura 4).

De otra parte, el olivar es uno de los cultivos que más empleo genera en España. En Andalucía, el sector de la aceituna, puede originar en una campaña 19 millones de jornales, siendo el sector que más puestos de trabajo produce en esta Comunidad Autónoma, de los cuales, el 15,3 % corresponden a la aceituna de mesa. Según datos de MAGRAMA durante la campaña 2013-2014, 412 empresas se dedicaron al entamado de aceitunas y 270 al envasado, localizándose en Andalucía el 52 % de las entamadoras,

de las cuales 131 se localizaron en la provincia de Sevilla (62,4 %), 34 en Córdoba (16,2 %), 31 en Málaga (14,8 %), 7 en Jaén (3,3 %), 2 en Almería (1 %), etc. Igualmente, el 43 % de las envasadoras se localizan en la Comunidad Andaluza, de las cuales 50 se localizaron en la provincia de Sevilla (44,6 %), 22 en Málaga (19,6 %), 15 en Córdoba (13,4 %), 10 en Jaén (8,9 %), 7 en Granada (6,3 %), 3 en Almería (2,7 %), etc.

**Figura 4.** Producción media nacional de las variedades más empleadas para la elaboración de aceitunas de mesa durante la campaña 2013-2014. Fuente: AICA (2015).



La aceituna de mesa es un producto que necesita un alto grado de manipulación, que se vende en pequeños formatos y que, por tanto, genera más de 8000 puestos de trabajo directo y aporta más de 1200 millones de euros al PIB nacional.

## 1.2. Procesos de elaboración de aceitunas de mesa

La aceituna es un fruto que, a diferencia de otros empleados para encurtidos, tiene el inconveniente del intenso sabor amargo debido a la presencia del glucósido oleuropeína. Por ello, uno de los principales objetivos de los procesos de elaboración consiste en la aplicación de diferentes tratamientos que eliminen total o parcialmente

dicho compuesto antes de su consumo, con lo que se obtiene un producto con unas características organolépticas particulares.

La aceituna está compuesta por endocarpo o hueso (20-30 %), en cuyo interior se encuentra la semilla, mesocarpo o pulpa (68-86 %) y exocarpo o piel (1-2 %). Posee un gran valor nutritivo y su parte comestible está compuesta mayoritariamente por agua (56-88 %) y grasa (10-24 %), siendo esta última rica en ácidos grasos de interés nutricional (ácido oléico, ácido linoleico y ácido linolénico), esteroides, tocoferoles y  $\beta$ -caroteno. En su composición, también destacan azúcares, aminoácidos esenciales y proteínas, minerales, principalmente calcio, magnesio y sodio, además de otros componentes menores como son pigmentos, ácidos orgánicos, vitaminas y compuestos fenólicos.

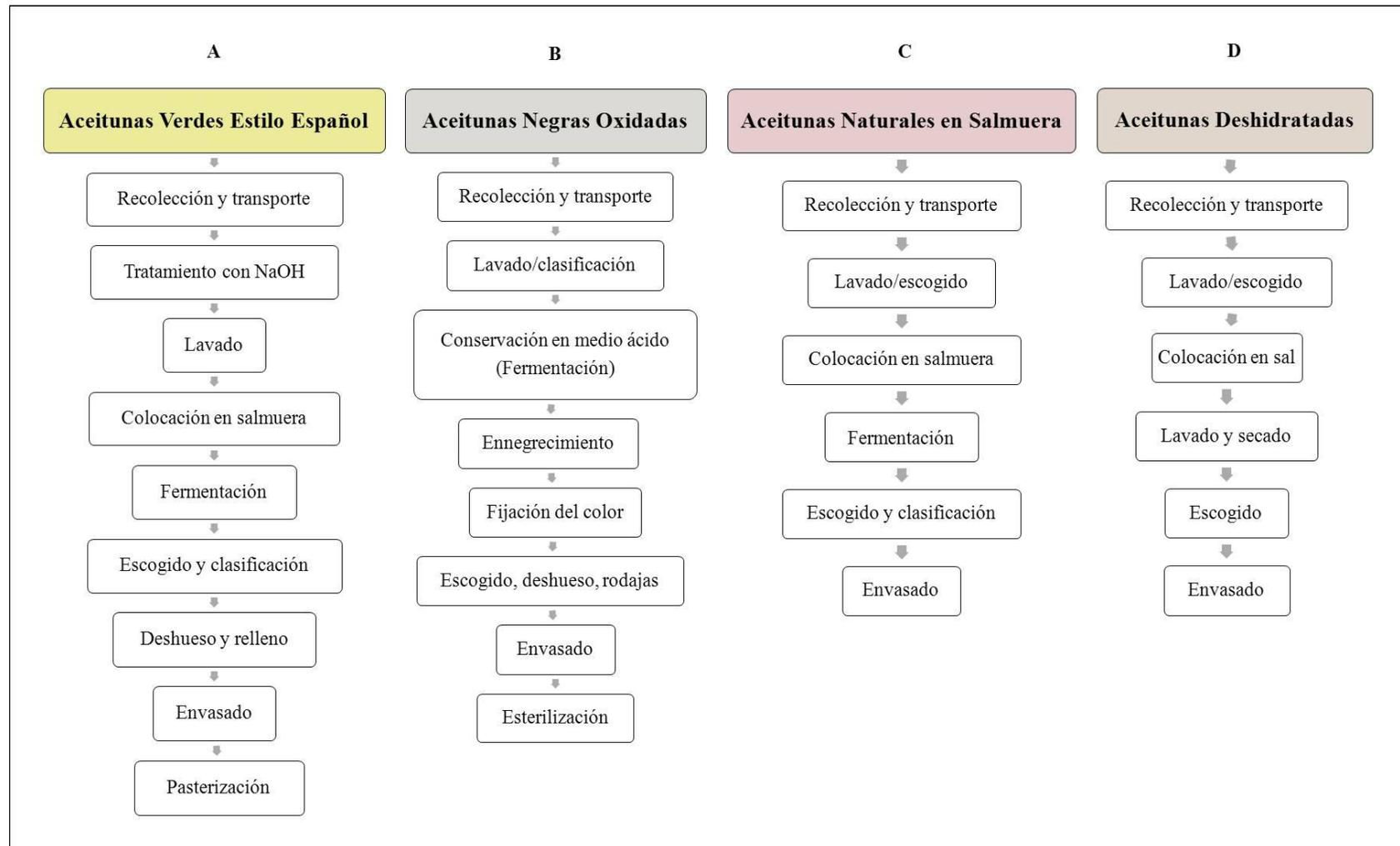
Entre las formas de elaboración más importantes de la aceituna de mesa destacan principalmente cuatro: aceitunas verdes estilo español, negras oxidadas o al estilo californiano, naturales en salmuera y aceitunas deshidratadas (Figura 5).

### **1.2.1. Aceituna verde estilo español**

Las aceitunas elaboradas como verdes estilo español es el tipo de preparación más popular, siendo España el primer productor y la variedad Manzanilla la más empleada (Garrido Fernández y cols., 1997). El proceso de elaboración de estas aceitunas se encuentra esquematizado en la Figura 5A.

La recolección de las aceitunas se efectúa generalmente durante los meses de septiembre y octubre, antes del envero, cuando se alcanza una coloración verde-amarillenta en la superficie del fruto. Esta etapa se realiza de forma manual, sobre todo para las variedades Manzanilla y Gordal, mediante el sistema denominado “ordeño”, lo cual supone un elevado coste de mano de obra. Por ello, ya desde los años 60-70 se viene estudiando la recolección mecánica de los frutos mediante el uso de vibradores de troncos o de ramas (Ferguson y cols., 2010).

**Figura 5.** Procesos de elaboración de aceitunas de mesa.



El principal problema de la recolección mecanizada es el oscurecimiento de los frutos como consecuencia de los golpes que soportan los mismos al ser recolectados, siendo la variedad Manzanilla la más propensa a la aparición de estas manchas (Ferguson, 2006). Se han descrito numerosos métodos para evitar la aparición de las mismas: reducción de la fuerza mecánica aplicada con el vibrador (Ferguson, 2006; Burns y colbs., 2008; Castro-García y colbs., 2015), inmersión de los frutos en soluciones de hidróxido sódico diluidas del orden del 0,3 % (Ben-Shalom y colbs., 1978), transporte de los frutos hasta la industria en éstas soluciones, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración (Kailis y Harris, 2007; Rejano y colbs., 2008), inmersión de los frutos recolectados en soluciones ácidas (Segovia-Bravo y colbs., 2011), almacenamiento de los frutos bajo atmósfera controlada de anhídrido carbónico (Nanos y colbs., 2002), o bajo atmósfera de nitrógeno (Segovia-Bravo y colbs., 2012). Sin embargo, los métodos propuestos hasta ahora no se han implementado a escala industrial debido a las dificultades tecnológicas planteadas y falta de eficacia para evitar la aparición de estas manchas oscuras que disminuyen la calidad del producto final.

Tras la recolección, los frutos se colocan en una solución del 1,7-3,5 % de hidróxido sódico (p/v) conocida como “lejía”, fase denominada “cocido”. En algunas variedades como la Manzanilla existe un período de reposo superior a 24 horas para evitar el despellejado del fruto. La duración del cocido varía dependiendo de la dureza del agua, la concentración de la lejía, la temperatura externa y la variedad del fruto. Esta etapa oscila entre 6-7 horas para las variedades Manzanilla y Hojiblanca, y unas 10 horas para la variedad Gordal. Se considera que el cocido finaliza cuando la solución de hidróxido sódico ha penetrado en el fruto hasta 2/3 ó 3/4 partes de la pulpa, midiendo la distancia desde la piel al hueso.

A continuación, los frutos se sumergen en agua durante 5-12 horas para eliminar el exceso de lejía (lavado). Es recomendable hacer un tratamiento corto de 2-3 horas seguido de uno largo de 7-10 horas, aunque para evitar la generación de grandes vertidos se suele reducir el tratamiento a sólo un lavado.

Finalmente, las aceitunas se colocan en una solución salina del 10-12 % de cloruro sódico (p/v), donde crecen espontáneamente los microorganismos responsables

de la fermentación. Durante los primeros días, cuando el pH es elevado, aumenta la población de bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae*. A medida que el pH disminuye alrededor de 7 unidades, comienza el crecimiento de bacterias del ácido láctico o bacterias lácticas (BAL), en especial *Lactobacillus pentosus*, y también distintas levaduras cuya presencia se mantiene hasta el final de la fermentación (Rodríguez-Borbolla y Rejano, 1979; Lucena-Padrós y cols., 2014).

Una adecuada fermentación es fundamental para la obtención de un producto con buenas características organolépticas. El crecimiento de bacterias lácticas puede verse limitado por diversos factores, tales como una elevada concentración de sal (Tassou y cols., 2007), baja temperatura (Rodríguez-Borbolla y Rejano, 1979), falta de nutrientes (Montaño y cols., 2000) o deficientes tratamientos alcalinos. Medina y cols. (2008) demostraron que un tratamiento de hidróxido sódico incompleto posibilita la formación de compuestos antimicrobianos de origen fenólico que inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas, deteniéndose la fermentación láctica y, por tanto, obteniéndose un producto final no seguro.

Finalizada la fermentación, los frutos son envasados, bien enteros, deshuesados o rellenos, siendo habitual su pasterización.

### **1.2.2. Aceituna negra oxidada o estilo californiano**

Las variedades de aceituna más utilizadas en España para este tipo de elaboración son Hojiblanca, Cacerña y en menor proporción Manzanilla. En la Figura 5B se puede observar el proceso de elaboración de este tipo de producto.

Los frutos son recolectados durante los meses de octubre y noviembre, cuando alcanzan una coloración verde-amarillenta o con ligeras coloraciones moradas. La recolección se realiza de forma mecánica mediante vibradores para la Hojiblanca, ya que no presenta el problema de “golpeado” que aparece en la variedad Manzanilla, la cual se recolecta para esta forma de preparación de forma manual aunque con poco esmero o, incluso, mecánicamente. El producto comercial, tras este proceso de

elaboración, es una aceituna de color negro y, por tanto, el golpeado de los frutos tiene menor importancia desde el punto de vista del color final.

Los frutos recolectados son recepcionados en las cooperativas o centros de compra donde se les eliminan las hojas, trozos de ramas, piedras, etc, se lavan, pesan y colocan en fermentadores. Las aceitunas se pueden ennegrecer directamente, algo inusual, o se conservan durante varios meses para procesarlas a lo largo del año.

Existen varias opciones para conservar estos frutos, bien empleando un medio ácido sin sal bajo condiciones anaeróbicas (2-4 % ácido acético), una salmuera acidificada con aireación (7-9 % cloruro sódico y 0,4-1,0 % ácido acético) o un medio ácido con aireación (1,2-1,6 % ácido acético). Las condiciones aeróbicas evitan el alambrado y arrugado superficial de las aceitunas que se produce debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> en el interior de los frutos como consecuencia de su respiración y el desarrollo de levaduras fermentativas (Romero y colbs., 1996). Los principales microorganismos que crecen durante el periodo de conservación de las aceitunas destinadas a negras oxidadas son levaduras, también bacterias acetogénicas en ausencia de sal (De Castro y colbs., 2007) y si se alcanzan temperaturas superiores a los 20 °C es posible la aparición de bacterias lácticas, siempre que la concentración de cloruro sódico no supere el 7 % (Sánchez y colbs., 2006).

La etapa principal en este tipo de aceituna de mesa es la denominada de ennegrecimiento, la cual consiste en la aplicación de sucesivos tratamientos con hidróxido sódico que se alternan con lavados de agua donde se inyecta aire, transcurriendo aproximadamente unas 20 horas entre cada tratamiento alcalino (García y colbs., 1991). Finalmente, la última solución alcalina habrá penetrado hasta el hueso dejando la pulpa a un valor de pH muy elevado, superior a 11 unidades, siendo conveniente neutralizarla hasta valores de pH inferiores a 8 unidades, bien mediante lavados con agua o añadiendo agentes acidulantes (HCl, CO<sub>2</sub>, etc) (Brenes y colbs., 1993b).

Las aceitunas van desarrollando a lo largo de estas etapas el color negro que las caracteriza, el cual requiere, para quedar fijado en las mismas, un último lavado con una

sal ferrosa (Brenes y colbs., 1995b; García y colbs., 2001a). Actualmente, las únicas sales de hierro permitidas por ley son el gluconato y lactato ferroso, que se adicionan en una concentración de 0,10 ó 0,06 % (p/v) respectivamente.

Las aceitunas después de esta etapa de fijación del color se envasan, bien enteras, deshuesadas o en rodajas con una salmuera de baja concentración (2 % cloruro sódico en el equilibrio) y una pequeña cantidad de sal ferrosa (0,01-0,02 % gluconato ferroso).

Este es un producto de baja acidez (pH >4,6 unidades) lo que requiere que se realice un tratamiento de esterilización antes de ser comercializado para que sea un producto microbiológicamente seguro.

### **1.2.3. Aceituna natural en salmuera: verde de color cambiante o negras naturales al estilo griego**

Este tipo de elaboración de aceitunas tiene gran interés internacional aunque en España su producción es baja. Se les denomina naturales porque no son sometidas a ningún tratamiento con hidróxido sódico (BOE, 2001, 2013) como se observa en la Figura 5C.

En general, los frutos recolectados se colocan en una solución de cloruro sódico de alta graduación (8-16 %), y en algunos casos acidificada con ácido acético. Durante su permanencia en la salmuera, los frutos van perdiendo el amargor por difusión de la oleuropeína desde el fruto hacia la salmuera. El periodo de conservación varía entre 7-8 meses durante la cual tiene lugar una fermentación como consecuencia del crecimiento de levaduras que le confiere un sabor característico al producto, desaparecen prácticamente los azúcares, disminuye la textura de los frutos y se produce una pérdida del color. Las bacterias lácticas no suelen crecer debido a la elevada concentración salina (Tassou y colbs., 2002).

En España, como ejemplo de aceituna verde en salmuera podemos destacar las Aceitunas Alcoreñas de Málaga, primera aceituna de mesa española con Denominación

de Origen. Concretamente, las Aceitunas Aloreñas Verdes Frescas se caracterizan por una primera etapa de “machacado o partido” de los frutos que permite una difusión muy rápida de los nutrientes a la salmuera y el endulzamiento ocurre en apenas unos días, trascurrido este tiempo, los frutos se envasan con el aliño típico de la comarca (tomillo, hinojo, pimienta, ajo, etc).

Las aceitunas negras naturales al estilo griego tienen una producción baja en España debido a la dificultad que presenta la recolección del fruto. Las aceitunas se recogen a partir del mes de noviembre, ya maduras, con una tonalidad negra en toda la superficie. La Aceituna Negra del Bajo Aragón, variedad Empeltre, es la más conocida a nivel nacional. Este tipo de producto, por su carácter natural y sabor aromático, cada vez es más demandado. También se elabora este producto en Extremadura con la variedad Cacereña y en Mallorca con la variedad Empeltre.

En general, estas aceitunas naturales se envasan enteras, bien en salmueras acidificadas, al natural (pH de 4,2 y 7,5 % NaCl) o al estilo Kalamata (acidez 0,75 % añadida como vinagre y 6,0 % NaCl), o al vacío sin líquido de gobierno. La seguridad del producto durante su vida media de mercado se controla mediante pasterización o por adición de sorbato potásico al 0,05 % (p/v).

### **1.2.4. Aceitunas deshidratadas**

Esta es una forma de preparación muy tradicional aunque focalizada en mercados locales y mediterráneos aunque el producto es demandado hoy día en países del este europeo, junto con Australia y Perú. En España, su producción está limitada a zonas de la campiña sevillana donde se suelen aliñar y denominar aceitunas prietas.

El proceso de elaboración de este producto está descrito en la Figura 5D. Las aceitunas se recolectan totalmente maduras con una coloración morada intensa-negra en toda la superficie, después de un lavado y escogido por tamaño se colocan capas alternas de frutos y cloruro sódico. Transcurridos unos 40-60 días, las aceitunas están deshidratadas. Posteriormente se lavan y secan a temperatura ambiente, quedando aptas para su consumo (Panagou y cols., 2006; Değirmenciöđlu, 2011).

Durante el proceso de deshidratación las aceitunas pierden su amargor, disminuyen su peso, la pulpa se enriquece en sal y al mismo tiempo alcanza una baja actividad de agua (0,75-0,85), lo cual asegura su conservación posterior.

Este tipo de preparación tiene una vida de mercado muy corta y es fácil su contaminación por microorganismos, fundamentalmente hongos (Panagou y cols., 2002; Değirmencioglu, 2011). La actual normativa internacional sólo exige para su consumo seguro que la concentración de cloruro sódico en el producto final sea superior a 10 %, expresado como gramos de NaCl por 100 ml de jugo de aceituna (COI, 2004).

Existe otro proceso de deshidratación de aceitunas que no es el tradicional y consiste en secar las aceitunas en un tunel de aire caliente (40-50 °C, 17-24 h) hasta alcanzar una actividad de agua <0,9 (Marsilio y cols., 2000; Mantzouridou y Tsimidou, 2011). A continuación, se envasan generalmente en bolsas de plástico.

### **1.3. Compuestos fenólicos en aceitunas**

Los compuestos polifenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos, flavonoides, etc), consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, habiéndose estimado en los años 80 en más de 8000 compuestos distintos (Harborne, 1989). Son moléculas que poseen al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y se pueden encontrar en sus formas simples de bajo peso molecular o formando agregados poliméricos que contienen varios anillos aromáticos, como los taninos condensados (Shahidi y Naczki, 1995). Al ser metabolitos secundarios, no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de la planta aunque sí son importantes en la relación que establece la planta con su entorno (Winkel-Shirley, 2002).

La aceituna es un fruto con un contenido elevado en sustancias de naturaleza fenólica. Se estima su concentración en un 2-5 % del total de la pulpa. El compuesto mayoritario es la oleuropeína que le imparte amargor a los frutos aunque estas

sustancias polifenólicas tienen también una gran importancia en el color, sabor y propiedades nutricionales de las aceitunas de mesa.

### 1.3.1. Composición fenólica del fruto fresco

Al igual que muchas frutas y verduras, la aceituna contiene una cantidad importante de polifenoles distribuidos en la piel, pulpa y hueso, los cuales tienen un importante papel en la calidad final de los alimentos derivados del fruto, aceite y aceituna de mesa. La Figura 6 muestra la estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en las aceitunas frescas.

De todos los compuestos presentes en la aceituna, la **oleuropeína** suele ser el mayoritario, el más estudiado y el que presenta mayor interés para los diferentes procesos de fabricación.

Los tratamientos aplicados durante la elaboración de las aceitunas de mesa se fundamentan en la eliminación de este glucósido fenólico, ya que es el compuesto responsable del amargor y el más abundante en la pulpa de las aceitunas frescas, cuyo contenido puede alcanzar hasta un 14 % de la materia seca en aceitunas verdes de algunas variedades (Amiot y cols., 1986).

La oleuropeína se descubrió en aceitunas y hojas de olivo debido a sus propiedades similares a la de los taninos (Bourquelot y Vintilesco, 1908), aunque no fue hasta mediados del siglo XX cuando se caracterizó su estructura completa. La molécula de oleuropeína está compuesta por ácido elenólico unido mediante un enlace éster al ortodifenol hidroxitirosol y mediante un enlace glucosídico a una molécula de glucosa (Panizzi y cols., 1960).

**Figura 6.** Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en aceitunas.

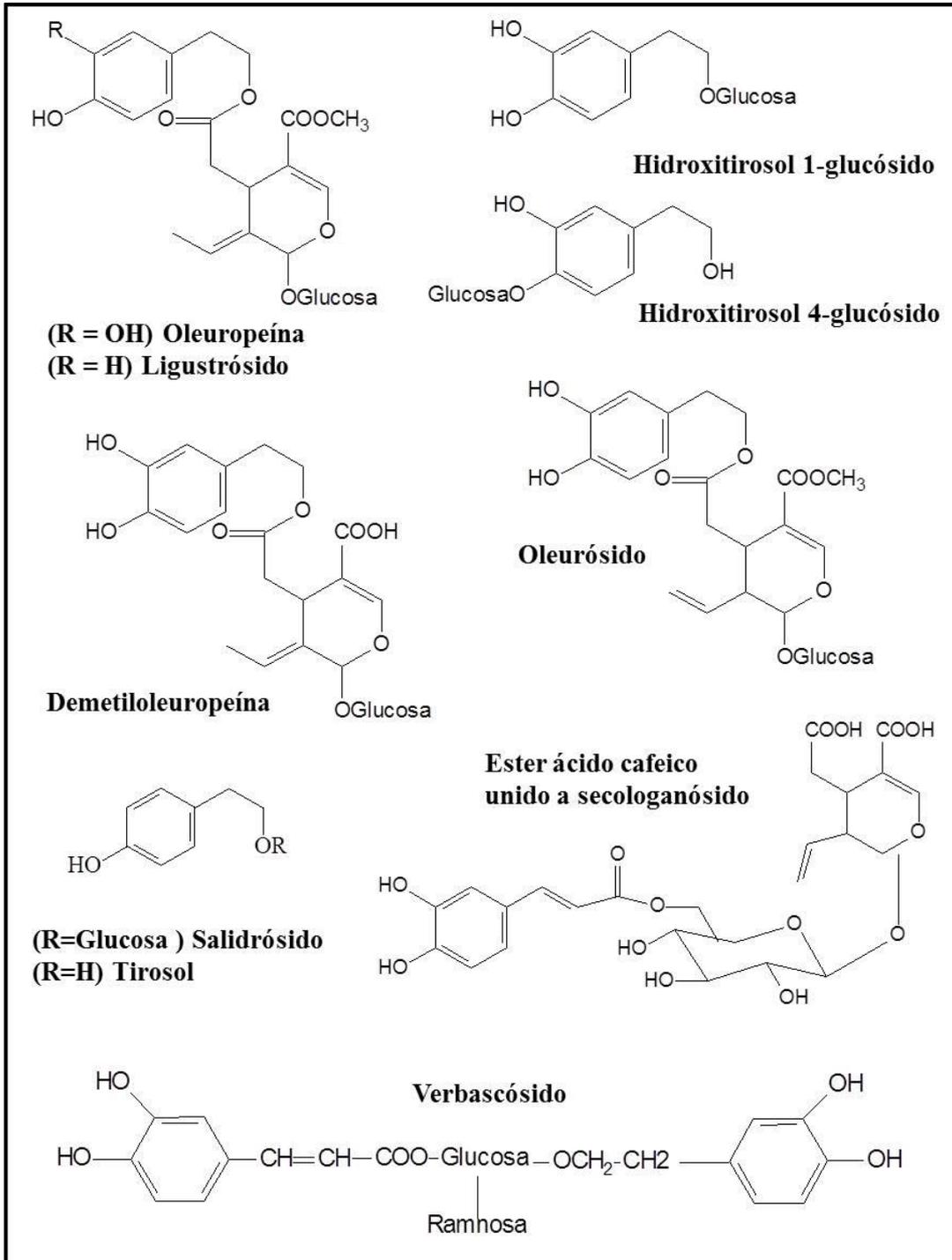
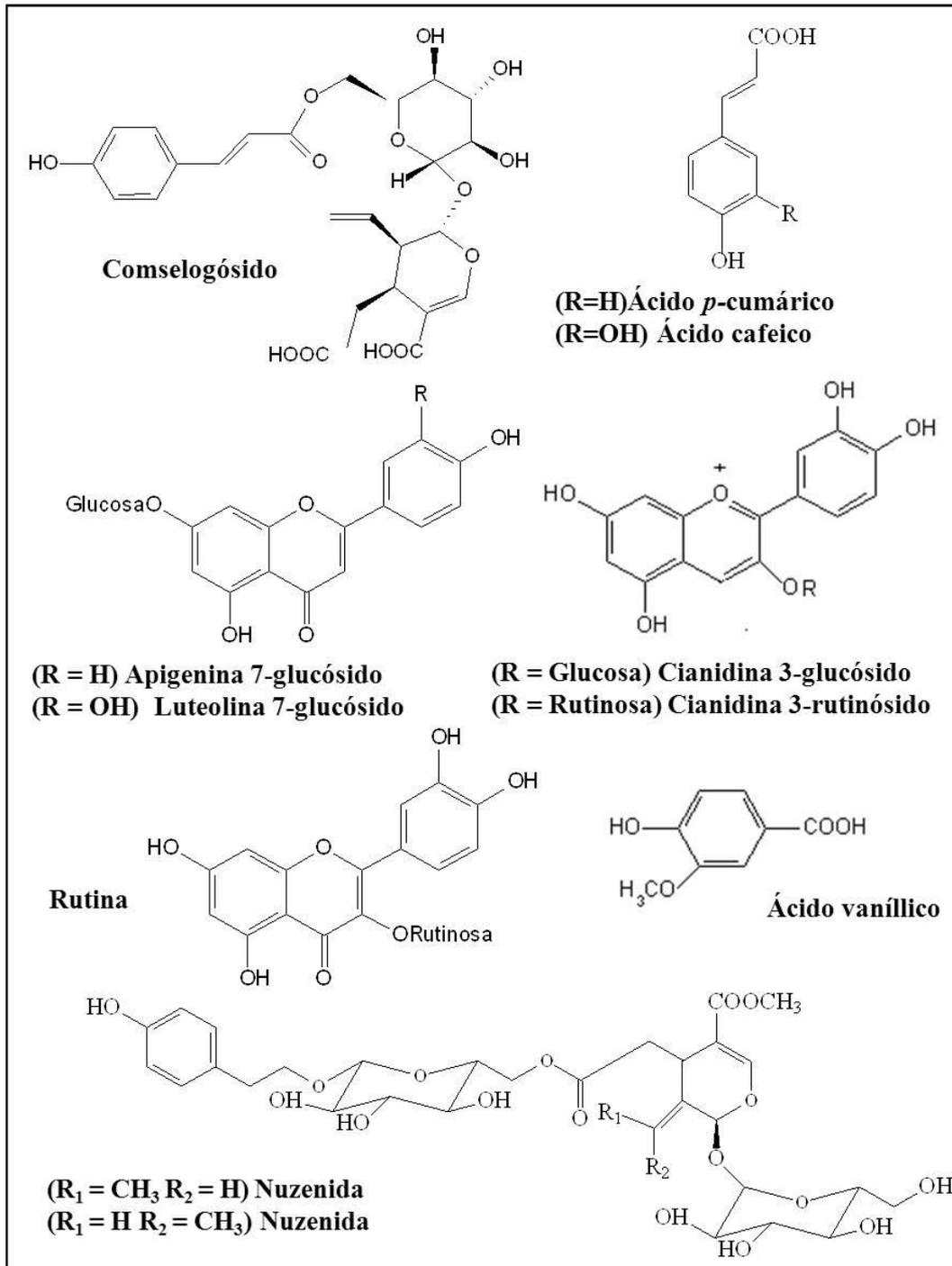


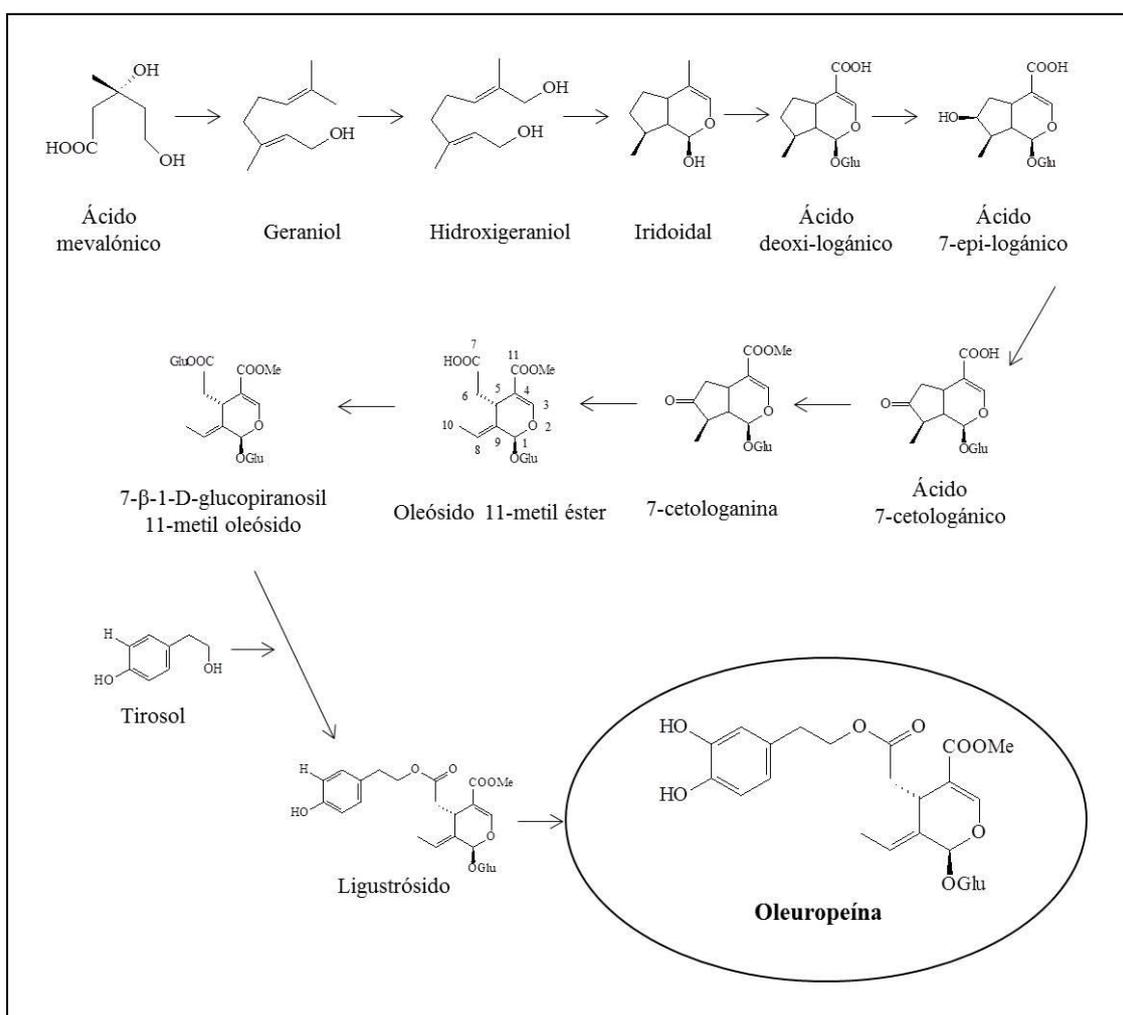
Figura 6. Continuación.



En la década de los setenta, Inouye y cols. (1971, 1974) propusieron que la biosíntesis de los glucósidos secoiridoides como la oleuropeína ocurría a través de la formación de una molécula llamada secologanina, aunque estos mismos autores indicaron que esta ruta biosintética debería ser estudiada en mayor profundidad.

Posteriormente, Damtoft y colbs. (1993, 1995) mostraron su desacuerdo con dichos investigadores y propusieron que estos glucósidos secoiridoides tienen su origen en el ácido mevalónico y su formación tiene lugar a través de una ruta metabólica compleja (Figura 7).

**Figura 7.** Ruta de biosíntesis de la oleuropeína propuesta por Damtoft y colbs. (1993, 1995).



Estos investigadores demostraron que el ácido deoxi-logánico, el ácido 7-epi-logánico, el ácido 7-cetologánico y la 7-cetologanina son compuestos intermedios que se forman en la ruta de biosíntesis del oleósido-11-metil éster, compuesto a partir del cual se formarían la oleuropeína y otros compuestos similares en la familia de las oleáceas.

Los resultados indicaron que el compuesto 7-cetologanina es el precursor inmediato del oleósido 11-metil éster y esto indica que la transformación se ajusta a una reacción de una sola etapa siguiendo una oxidación tipo Baeyer-Villiger. La biosíntesis del oleósido incluiría la ruptura del anillo ciclopentano. El grupo cetona se oxidaría obteniéndose un éster y, posteriormente, ocurriría una ruptura en el enlace entre los carbonos C7 y C8, formándose un doble enlace entre los carbonos C8 y C9 con la consecuente eliminación de un átomo de hidrógeno en el C9, lo que daría lugar al oleósido 11-metil éster. Después tendría lugar una glicosilación, formándose el compuesto 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido, el cual se esterificaría con tirosol formándose el ligustrósido, que, por hidroxilación, se transformaría en la molécula de oleuropeína, lo que indica que la biosíntesis de este glucósido secoiridoide necesita de tirosol y no de hidroxitirosol.

Recientemente, Gutiérrez-Rosales y cols. (2010, 2012) corroboraron la ruta biosintética propuesta por Damtoft y cols. (1993, 1995), aunque dichos autores especificaron que dicha ruta se mantiene en ausencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa e indicaron que la presencia de dicha enzima induce una competencia entre la ruta catabólica y la ruta metabólica de la oleuropeína en el propio fruto fresco.

Además de la oleuropeína, en la pulpa fresca de las aceitunas han sido identificados otros glucósidos tales como demetiloleuropeína (Ragazzi y Veronese, 1973), ligustrósido (Kubo y Matsumoto, 1984), verbascósido (Amiot y cols., 1986), oleurósido (Kuwajima y cols., 1988), salidrósido (Maestro y cols., 1994), hidroxitirosol 4- $\beta$ -glucósido (Romero y cols., 2002a), éster del ácido cafeico unido a secologanósido (Innocenti y cols., 2006), así como glucósidos y dímeros de oleuropeína (Cardoso y cols., 2006).

Asimismo, la presencia de otros compuestos fenólicos ha sido descrita en la pulpa fresca de las aceitunas, como es tirosol, comselogósido (Karioti y cols., 2006) y los ácidos cafeico, *p*-cumárico y vanílico (Brenes y cols., 1992). Son numerosos también los flavonoides como luteolina 7-glucósido, apigenina 7-glucósido y rutina (Vázquez y cols., 1974), así como diferentes tipos de antocianinas, tales como cianidina 3-rutinósido y cianidina 3-glucósido (Vázquez y Maestro, 1970; Romero y

colbs., 2002b), que son los compuestos responsables del cambio de color de amarillo a violeta y negro. Nuzenida y salidrósido son los compuestos mayoritarios presentes en semilla de aceitunas (Maestro y colbs., 1994; Silva y colbs., 2010).

### **1.3.2. Composición fenólica del fruto procesado**

Los compuestos polifenólicos participan directa o indirectamente en las características organolépticas del producto final (color, sabor, textura) y contribuyen a las propiedades beneficiosas que el consumo de aceitunas de mesa puede aportar a la dieta.

El procesado de las aceitunas induce una pérdida importante de la composición fenólica, difiriendo ésta enormemente de la existente en el fruto fresco, tanto cualitativa como cuantitativamente. En general, después de todas las transformaciones ocurridas según sea el procesado, se comprueba que el perfil fenólico de las aceitunas elaboradas mediante tratamiento alcalino (verdes estilo español y negras estilo californiano), está constituido principalmente por los fenoles simples, hidroxitirosol y tirosol (Romero y colbs., 2004b).

Por otra parte, el perfil fenólico de aquellas aceitunas elaboradas como naturales en salmuera, bien verdes o negras, se caracteriza por una mayor riqueza cualitativa. Estos frutos contienen fundamentalmente hidroxitirosol y en mucha menor medida tirosol, salidrósido y verbascósido (Romero y colbs., 2004a; Arroyo-López y colbs., 2005; Othman y colbs., 2009).

Asimismo, las aceitunas comerciales deshidratadas son ricas en hidroxitirosol fundamentalmente y contienen una pequeña cantidad de verbascósido y ácido cafeico, dependiendo de la variedad seleccionada (Zoidou y colbs., 2010; Soufi y colbs., 2014).

En general, la composición en fenoles totales de las aceitunas de mesa comerciales puede oscilar entre 200-1200 mg/kg de producto (Tabla 1). Además, en todas ellas, más de un 90 % de la concentración se debe a la presencia de hidroxitirosol. Si se comparan estos valores con los encontrados para el aceite de oliva, se puede decir

que las aceitunas de mesa poseen una concentración similar o incluso superior, dependiendo de la forma de preparación, que el contenido polifenólico del aceite de oliva virgen.

**Tabla 1.** Composición fenólica de productos comerciales derivados de la oliva (García y colbs., 2003; Romero y colbs., 2004b).

	<b>Fenoles Totales (mg/kg de producto)</b>	<b>mg fenoles/20 g de producto consumido</b>
Aceite de oliva virgen	400	8
Aceite de oliva	95	1,9
Aceitunas verdes al estilo español	400	8
Aceitunas negras oxidadas	200	4
Aceitunas moradas en salmuera	1200	24
Aceitunas negras naturales en salmuera	600	12

Los compuestos polifenólicos de las aceitunas se han asociado con numerosas propiedades beneficiosas para la salud, ya que pueden contribuir a la prevención de algunos cánceres, la diabetes, etc (Loru y colbs., 2009; Kountouri y colbs., 2009; Hao y colbs., 2010). Además, ejercen un efecto protector contra la degeneración neuronal y los daños cardiovasculares (Frankel, 2011; Martín-Peláez y colbs., 2013). Ciertos investigadores han encontrado una correlación entre el consumo de aceitunas de mesa y la prevención de la osteoporosis, atribuyendo este efecto a la presencia de hidroxitirosol y tirosol (Coxam y colbs., 2010). Asimismo, está bastante estudiada la capacidad antioxidante del fenol hidroxitirosol (Malheiro y colbs., 2011).

Precisamente, la Unión Europea ha aprobado recientemente el Reglamento nº 432/2012, donde se establece una lista autorizada de propiedades saludables en los alimentos. Según este Reglamento, se permite indicar en las etiquetas de los aceites de oliva la siguiente frase: “Polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección del estrés oxidativo de los lípidos de la sangre”. No obstante, esta declaración sólo puede

ser utilizada para aquellos aceites de oliva que contienen al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (por ejemplo, derivados de oleuropeína y tirosol) por cada 20 g de aceite de oliva consumido.

Si observamos los datos obtenidos por Romero y cols. (2004b), en referencia al valor total de compuestos fenólicos en aceitunas de mesa, podemos comprobar que al consumir 20 g del producto en la mayoría de las aceitunas de mesa se supera claramente el consumo de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (Tabla 1).

### **1.3.3. Influencia de los factores agronómicos sobre la composición fenólica de las aceitunas**

La variedad, el índice de madurez del fruto y las prácticas agrícolas tales como la irrigación, son los principales factores agronómicos que influyen en la composición química de las aceitunas en general y en su perfil fenólico, en particular, con la consecuente influencia en las características nutricionales y organolépticas de los productos obtenidos a partir de las mismas: aceite de oliva y aceituna de mesa.

El principal factor que determina el perfil de compuestos fenólicos de las aceitunas es la *variedad*, que está relacionado según algunos autores con la actividad enzimática (Gutiérrez-Rosales y cols., 2010). En las últimas décadas ha tenido un elevado interés el conocer el perfil fenólico en los frutos frescos por su repercusión en el perfil fenólico del producto final que se obtenga, bien aceite de oliva o aceituna de mesa. Esta caracterización en el fruto fresco se ha realizado en variedades italianas (Esti y cols., 1998; Briante cols., 2002), españolas (Romero y cols., 2002b), portuguesas (Vinha y cols., 2005), turcas (Arslan, 2012), griegas (Petridis y cols., 2012), etc.

Sin embargo, la mayoría de los investigadores han centrado sus estudios sobre las diferencias varietales en el producto comercial final, bien sea aceite de oliva (Cimato y cols., 1990; Uceda y Hermoso, 2001; García y cols., 2003; Ramos-Escudero y cols., 2015) o aceituna de mesa (Amiot y cols., 1990; Romero y cols., 2004b, Zoidou y cols., 2010; Medina y cols., 2012; Malheiro y cols., 2014). No obstante,

existen pocos estudios que comparen la composición fenólica de distintas variedades, en especial analizando un número elevado de muestras.

El *grado de madurez* es otro aspecto que influye enormemente en el perfil fenólico de los frutos. Amiot y cols. (1986) indicaron que la concentración de oleuropeína disminuía a lo largo de la maduración de los frutos y aumentaba la de demetiloleuropeína y glucósidos derivados de la misma.

Este comportamiento ha sido estudiado posteriormente por numerosos investigadores, en variedades italianas (Ranalli y cols., 2009; Cecchi y cols., 2013), tunecinas (Jemai y cols., 2009), portuguesas (Machado y cols., 2013) y españolas (Gutiérrez-Rosales y cols., 2010; Romero-Segura y cols., 2012). Todos estos autores coinciden en sus resultados, un aumento del índice de madurez en el fruto está correlacionado linealmente con una disminución en el contenido total de fenoles en el mismo. Asimismo, esta disminución drástica en la concentración de oleuropeína coincide con un aumento paralelo de la concentración de hidroxitirosol, lo cual puede considerarse un indicador de la maduración del fruto (Esti y cols., 1998; Sousa y cols., 2014).

De otra parte, también se produce un aumento con el estado de maduración de la concentración total de fenoles como consecuencia de la aparición de las antocianinas, cianidina 3-glucósido y cianidina 3-rutinósido (Vázquez y Maestro, 1970; Yorulmaz y cols., 2013), hidroxitirosol 4- $\beta$ -glucósido (Romero y cols., 2002a), demetiloleuropeína y verbascósido en la variedad Arbequina (Gómez-Rico y cols., 2008), además de ciertos flavonoides como la rutina y la luteolina 7-glucósido (Bouaziz y cols., 2004 y 2010), quercetina 7-rutinósido, apigenina 7-glucósido y quercetina 7-ramnósido (Vlahov, 1992; Yorulmaz y cols., 2013).

El estado de maduración de la aceituna también ejerce una gran influencia sobre el contenido fenólico del aceite de oliva. Brenes y cols. (1999) indicaron que en aceites monovarietales españoles se observaba una tendencia del hidroxitirosol, tirosol y luteolina a aumentar su concentración con la maduración de los frutos, mientras que las agluconas secoiridoideas disminuían, siendo esta disminución más acentuada en los

derivados de hidroxitirosol que en los de tirosol (Gómez-Rico y colbs., 2006). En general, la concentración de fenoles totales aumenta al principio de la maduración hasta llegar a un máximo y luego, en aceites obtenidos de frutos más maduros disminuye (Morello y colbs., 2004; Benito y colbs., 2013; Cevik y colbs., 2014).

Por otro lado, la *irrigación* es un factor agronómico muy importante en el desarrollo del fruto que influye también en la composición fenólica de las aceitunas. Se ha demostrado en pulpa de aceitunas y en los alimentos que de ellas se obtienen (aceite de oliva y aceitunas de mesa) que existe una correlación lineal entre la disminución en el contenido fenólico y el aumento en la intensidad del riego (Tovar y colbs., 2002; Martinelli y colbs., 2012; García y colbs., 2014; Stefanoudaki y colbs., 2009).

Por otra parte, no todos los compuestos fenólicos se ven afectados de igual forma por la disponibilidad de agua, encontrándose que mientras los fenoles simples aumentan en el aceite con la irrigación (Martinelli y colbs., 2012), otros autores indican que los derivados secoiridoides (agluconas de oleuropeína y ligustrósido) disminuyen con la misma, y los lignanos (1-acetoxipinoresinol y pinoresinol) no están influenciados por el sistema de riego del campo (Romero y colbs., 2002c; Servili y colbs., 2007; Caruso y colbs., 2014). Asimismo, un aumento de cloruro sódico en el agua de riego está relacionado con un aumento en los compuestos fenólicos totales de los aceites obtenidos, tanto de fenoles simples como de derivados secoiridoides (Ben Ahmed y colbs., 2009; Stefanoudaki y colbs., 2009).

El *área geográfica* también es un factor que influye en el perfil fenólico de las aceitunas, aunque su interés en investigación se ha centrado fundamentalmente en la composición fenólica de los aceites obtenidos de variedades procedentes de diferentes zonas, tanto italianas (Ranalli y colbs., 1999), turcas (Alkan y colbs., 2012; Arslan y colbs., 2013; Kesen y colbs., 2014) como españolas (Brenes y colbs., 1999; Criado y colbs., 2004; Bakhouché y colbs., 2013). Hay pocos estudios sobre la influencia del área geográfica sobre en el perfil fenólico de frutos frescos (Gutiérrez-Rosales y colbs., 2012) y no se conocen trabajos en relación a frutos elaborados como aceituna de mesa.

Son muchos los factores que inciden en la variable “área geográfica”: tipo de suelo, climatología, prácticas agronómicas, etc. Por tanto, es lógico pensar que existe una diferenciación fenólica en las aceitunas para la misma variedad dependiendo de su localización (Arslan y colbs., 2013). No obstante, los resultados obtenidos hasta ahora, en especial con aceite de oliva, no son muy concluyentes.

Estudios realizados con aceites de la variedad Arbequina indican que su composición fenólica depende enormemente del área geográfica (Bakhouché y colbs., 2013), siendo muy destacable que el contenido en fenoles simples, hidroxitirosol y tirosol, es muy superior en aceites obtenidos en la zona de Jaén, mientras que los de Tarragona son mucho más ricos en derivados secoiridoides (Criado y colbs., 2004). Sin embargo, otros investigadores consideran que el área geográfica no es un factor muy influyente en el perfil fenólico de los aceites (Brenes y colbs., 1999; Yorulmaz y colbs., 2012; Kesen y colbs., 2014).

La *fertilización* del olivo es otro factor importante y controlable que afecta a la composición química de los frutos y consecuentemente al producto de él obtenido. Son escasos los estudios encontrados en la literatura sobre el efecto de la fertilización de los olivos sobre la composición fenólica de los frutos. En general, los investigadores han concluido que un aumento en la concentración de nitrógeno en las hojas y los frutos del olivo está linealmente correlacionado con una disminución en la concentración de fenoles totales presente en los aceites obtenidos de dichos frutos (Erel y colbs., 2013; Tekaya y colbs., 2013 y 2014).

### **1.4. Enzimas en alimentos**

Las enzimas son biocatalizadores complejos de gran especificidad y eficiencia, producidos por organismos vivos, que aumentan la velocidad de las reacciones biológicas a través de vías bien definidas. Se encuentran localizadas en el citoplasma, en las mitocondrias, en tejidos y fluidos corporales, etc. (Schmidt y Pennacchiotti, 2001).

Algunas de las características de las enzimas incluyen la alta especificidad de sustrato y el estrecho rango de temperaturas y pH necesarios para llevar a cabo su

actividad. La mayoría de las enzimas se desnaturalizan a temperaturas superiores a 50 °C y son pocas las que muestran desnaturalización a temperaturas inferiores a 5 °C. Respecto al pH óptimo de actividad, algunas enzimas muestran una amplia tolerancia a los cambios de pH, aunque suelen trabajar en un rango estrecho, debido a que valores extremos de pH, producen la desnaturalización de la misma. Por tanto, cualquier cambio que ocurra en estos factores externos, pueden provocar inestabilidad en la integridad estructural de estas proteínas y, consecuentemente, la pérdida de la actividad enzimática (Pandey y cols., 2008).

Son numerosos los estudios científicos que evidencian la importancia de los procesos enzimáticos en la elaboración y conservación de los alimentos. Fenómenos tan importantes como las reacciones de pardeamiento (frutas y vegetales), de rancidez (grasas y aceites), de textura (salsa de tomate) son ejemplos muy conocidos de la intervención enzimática en la definición de las características organolépticas de los productos alimenticios. Generalmente, la acción enzimática en alimentos se asocia a un efecto negativo desde el punto de vista organoléptico del producto. Sin embargo, del mismo modo que hay enzimas perjudiciales que deben ser inactivadas, hay otras que la tecnología de los alimentos potencia su actividad para una mejora en el acabado del alimento, como son enzimas de filtración o de clarificación, enzimas de acción aromatizante, enzimas proteolíticas, enzimas glucosa-oxidasa, etc (Schmidt y Pennacchiotti, 2001).

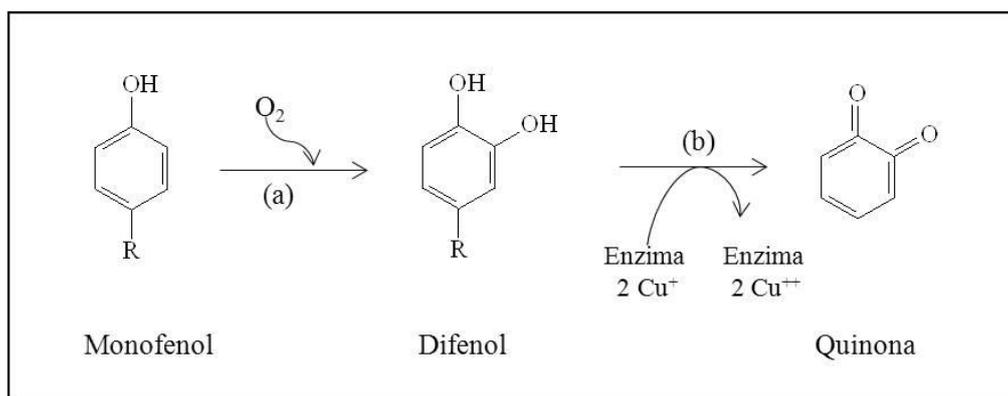
La mayoría de las enzimas se clasifican según el sustrato específico sobre el cual actúan aunque también por las reacciones que catalizan, e incluso en base a su origen histórico. La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo en 1964 una nomenclatura basada en los denominados números EC. De este modo, cada enzima se identifica con cuatro números precedidos por las letras “EC”, el primer número clasifica según el mecanismo de acción. Actualmente se consideran seis grupos principales de enzimas de acuerdo al tipo de reacción catalizada: oxidoreductasas (EC1), transferasas (EC2), hidrolasas (EC3), liasas (EC4), isomerasas (EC5) y ligasas (EC6).

### 1.4.1. Enzimas oxidoreductasas: polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD)

Las oxidasas, son enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción empleando oxígeno molecular ( $O_2$ ) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua ( $H_2O$ ) o a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Son de gran interés en la industria alimentaria, ya que están relacionadas con fenómenos tan importantes como el pardeamiento enzimático de los alimentos. Dentro de las oxidasas, encontramos las oxidasas cúpricas, como la PPO, y oxidasas férricas, como la POD.

La **PPO** es una enzima bifuncional que contiene dos átomos de cobre en su estructura, ampliamente distribuida en la escala filogenética, la cual, en presencia de oxígeno molecular, cataliza la *o*-hidroxilación de monofenoles para dar *o*-difenoles (actividad cresolasa, EC 1.14.18.1) y además la oxidación de los *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad catecolasa, EC 1.10.3.1) (Martínez y Whitaker., 1995). La doble reacción de *o*-hidroxilación y *o*-oxidación de la PPO se muestra en la Figura 8. La actividad cresolasa puede variar e incluso ser inexistente dependiendo de la procedencia de la enzima, en cambio todas tienen actividad catecolasa.

**Figura 8.** Reacción de hidroxilación (a) y oxidación (b) catalizada por la PPO (Queiroz y cols., 2008).



Las *o*-quinonas que se generan son muy inestables y rápidamente reaccionan entre ellas o con aminoácidos y proteínas, polimerizando y dando lugar a pigmentos marrones o negros responsables de la melanización en animales y del pardeamiento en vegetales. La PPO ha sido ampliamente estudiada en muchas especies de plantas,

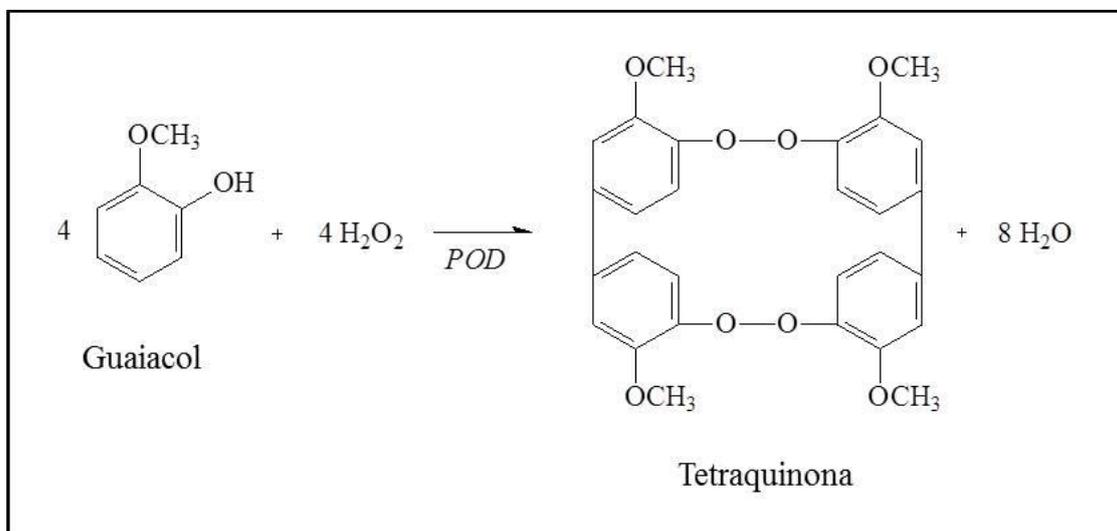
hongos y bacterias, y existe una gran variedad de propiedades cinéticas y moleculares e isoformas descritas en diferentes especies.

Con respecto a su función biológica, la PPO ha sido relacionada con la maduración de los frutos así como con el estrés biótico y abiótico. Esta enzima ha sido localizada en los cloroplastos, concretamente en las membranas inertes de los tilacoides, en el citoplasma y en vesículas situadas entre la membrana y la pared celular (Sommer y colbs., 1994; Murata y colbs., 1997). En condiciones normales, cuando la célula se encuentra sana e intacta, la PPO y sus sustratos, los fenoles, se encuentran en compartimentos separados. Sin embargo, cuando la célula se desorganiza al envejecer, o como resultado del daño físico originado durante la etapa de postcosecha o el procesamiento de los frutos o vegetales, las enzimas y sustratos entran en contacto y suceden las reacciones de pardeamiento descritas anteriormente.

Éste fenómeno de pardeamiento ha sido ampliamente estudiado en numerosos frutos y vegetales, tales como patatas (Langdon, 1987), manzanas (Janovitz-Klapp y colbs., 1990) y bananas (Wuyts y colbs., 2006), que poseen altos niveles de PPOs. También, esta actividad enzimática ha sido determinada en mora (Arslan y colbs., 2004), níspero (Ayaz y colbs., 2008), uva (Castellari y colbs., 1997), berenjena (Concellon y colbs., 2004), tomillo (Doğan y colbs., 2006), alcachofa (Espin y colbs., 1997), pera (Franck y colbs., 2007), cereza (Kumar y colbs., 2008), aguacate (Soliva-Fortuny y colbs., 2002), etc.

**La POD** (EC 1.11.1.7) está ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra en plantas, microorganismos y animales, donde catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Pandey y colbs., 2008). En plantas, esta enzima está implicada en el desarrollo, diferenciación y protección de los tejidos vegetales frente al daño e infección provocada por los microorganismos patógenos (Welinder, 1992; O'Brien, 2000). La POD utiliza como cofactor el grupo hemo y cataliza reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como sustrato, generalmente  $H_2O_2$ , que actúa como electrón aceptor, reduciéndose a  $H_2O$ , y, este a su vez, oxida al segundo sustrato, que puede ser un fenol y se forma la quinona correspondiente (Figura 9).

**Figura 9.** Reacción de oxidación catalizada por la POD (Da Cruz-Vieira y Fatibello-Filho, 1998).



Las peroxidasas son proteínas que se encuentran en forma glicosilada y asociadas a la membrana de las células (Civello y cols., 1995), muestran varias isoformas y alta resistencia térmica. Debido a esta propiedad y su fácil cuantificación, la actividad POD residual se utiliza con frecuencia para determinar si el tratamiento térmico de los vegetales ha sido adecuado (Saravia y cols., 2007).

La contribución de la POD a la oxidación de los fenoles está limitada por la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PPO y POD pueden actuar sinérgicamente, mientras la PPO puede generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto final en la oxidación de ciertos fenoles, la POD puede utilizar dicho H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y oxidar otros fenoles, formándose las correspondientes quinonas (Espinal, 2010).

En alimentos crudos y procesados la actividad POD se ha asociado con cambios en el sabor, color, textura y valor nutricional (Civello y cols., 1995; Saravia, 2010). La actividad de ésta enzima se ha determinado en frambuesa y fresa (García-Palazón y cols., 2004), pimentón (Goodwin y Hertwig, 2003), calabacín (Lebeda y cols., 1999), tomate (Lurie y cols., 1997), higo chumbo (Padiglia y cols., 1995), uva (Rivera y cols., 2004), manzana (Torres y cols., 2003), etc. Estudios realizados en fresas muestran que la actividad POD es máxima en frutos verdes disminuyendo con la

maduración del fruto (Civello y cols., 1995). Por el contrario, en nísperos la actividad aumenta en frutos maduros (Aydin y Kadioglu, 2001).

En general, el oscurecimiento producido por la acción de estas enzimas es indeseable en tecnología de alimentos porque causa una apariencia desagradable y un flavor inadecuado en los alimentos y, como consecuencia, un rechazo del consumidor, lo cual provoca un impacto económico negativo tanto para los productores como para las industrias encargadas del procesado (Doğan y cols., 2008; Kumar y cols., 2008).

### **1.4.1.1. Enzimas oxidoreductasas (PPO y POD) relacionadas con compuestos polifenólicos en aceitunas**

Investigadores israelitas fueron los primeros que estudiaron la presencia de estas enzimas en aceitunas, en particular en frutos de la variedad Manzanilla (Ben-Shalom y cols., 1977a). Aislaron catecol oxidasa en aceitunas recogidas con coloración verde y encontraron actividad oxidativa hacia ortodifenoles aunque no actividad cresolasa. Esta enzima tenía un peso molecular aproximado de 42.000 daltons y su actividad se inhibía por la presencia de tropolona y, en menor medida, por la sal. También encontraron que su actividad disminuía con el avance en la maduración de los frutos (Ben-Shalom y cols., 1977b), lo cual ha sido confirmado posteriormente por otros autores (Goupy y cols., 1991; Hornero-Méndez y cols., 2002). No obstante, otros investigadores han encontrado la tendencia opuesta, un aumento de la actividad oxidasa al aumentar el índice de madurez de los frutos (Ebrahimzadeh y cols., 2003; Ortega-García y cols., 2008).

Estudios realizados en aceitunas de la variedad Picual indicaron la presencia de actividad enzimática PPO en los tilacoides del cloroplasto y en las mitocondrias (Shomer y cols., 1979). Se ha observado que la actividad PPO es más alta en el mesocarpio de los frutos en variedades de aceitunas Arbequina y Picual, mientras que la mayor actividad POD se encuentra en la semilla (García-Rodríguez y cols., 2011), representando más del 98 % de la actividad POD total de las aceitunas (Luaces y cols., 2007). Por el contrario, hay autores que afirman que la enzima PPO se localiza en mayor cantidad en la epidermis de los frutos (Ortega-García y cols., 2008).

Desde el punto de vista de las aceitunas de mesa, los investigadores han mostrado interés en su implicación en el oscurecimiento de los frutos durante la recolección, en concreto la aparición de manchas oscuras como consecuencia de los golpes que sufren los frutos cuando son recolectados (Ben-Shalom y cols., 1978).

Sciancalepore y Longone (1984) estudiaron el oscurecimiento de la pulpa de 5 variedades de aceitunas y lo relacionaron con su contenido en PPO. Posteriormente, estos mismos investigadores encontraron que existía una correlación entre el oscurecimiento de los frutos y el contenido en ortodifenoles en los mismos, así como con la actividad de la enzima PPO, aunque no con la actividad de la enzima POD (Sciancalepore, 1985).

Estudios realizados sobre frutos de la variedad Picual, Verdial, Arbequina y Frantoio correlacionaron el aumento de la actividad PPO con la disminución en la concentración de fenoles totales durante la maduración del fruto (Ortega-García y cols., 2008; Ortega-García y Peragón, 2009). Sin embargo, estudios más recientes indican que la disminución de la concentración de oleuropeína durante la maduración del fruto no se corresponde con un incremento en la actividad PPO (Ortega-García y cols., 2010; García-Rodríguez y cols., 2011).

Por otra parte, Goupy y cols. (1991) no encontraron relación entre el oscurecimiento de la pulpa de 7 variedades de aceitunas y su contenido en PPO, aunque sí existía una correlación positiva entre el oscurecimiento y la disminución en la concentración en oleuropeína. Además, Tzika y cols. (2009) han indicado que la POD endógena de aceitunas no es capaz de oxidar a la oleuropeína.

Asimismo, estas enzimas oxidoreductasas tiene un gran interés por su participación en las características organolépticas y nutricionales del aceite de oliva, uno de los principales alimentos derivados de la aceituna.

Estudios sobre la composición fenólica de aceites de oliva vírgenes de las variedades Manzanilla, Hojiblanca y Picual han demostrado que su concentración aumentaba al eliminar el hueso de los frutos durante la etapa de molienda, como

consecuencia de la disminución de la presencia de POD endógena, muy rica en la semilla de los frutos (Luaces y cols., 2007).

Un factor determinante para la actuación de estas enzimas es la presencia de oxígeno y así se ha confirmado en estudios sobre la etapa de molienda y batido de la pasta para la obtención de aceite de oliva. La reducción o eliminación de oxígeno durante el batido de la pasta evita la oxidación de estas sustancias y, por tanto, da lugar a aceites con un mayor contenido polifenólico (García y cols., 2001b; Servili y cols., 2008).

Recientemente, se ha confirmado en soluciones modelos el papel fundamental de la acción de la POD y PPO obtenida de frutos de la variedad Arbequina y Picual en el perfil polifenólico final de los aceites de oliva (García-Rodríguez y cols., 2011). Además, estos mismos autores han demostrado a escala de laboratorio que la PPO es una enzima más implicada en la oxidación de los fenoles durante la etapa de molienda, mientras que la POD tiene una mayor influencia durante la etapa de batido de la masa de aceitunas (García-Rodríguez y cols., 2015).

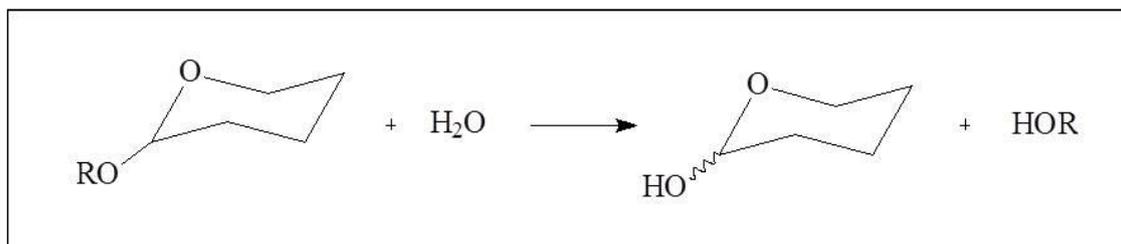
### **1.4.2. Enzimas hidrolasas: $\beta$ -glucosidasa y esterasa**

Los hidratos de carbono son los compuestos orgánicos más abundantes en el reino vegetal que intervienen en diversas funciones fisiológicas de la célula, tanto estructurales como de reserva. Esta diversidad, junto al hecho de que prácticamente cualquier tipo de molécula (proteína, lípidos, ácidos nucleicos) pueda ser glicosilada, implica la existencia de un amplio espectro de enzimas vinculadas al metabolismo de carbohidratos y de moléculas glicosiladas, tanto en su síntesis, modificación e hidrólisis.

Las **glucósido hidrolasas** son el grupo de enzimas responsables de la hidrólisis de carbohidratos, dentro del cual se encuentran las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21), que constituyen un grupo de enzimas importantes biológica e industrialmente, ya que catalizan la rotura selectiva de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos entre dos o más residuos glicona o entre la glucosa y un

grupo/radical aril o alquil aglicona. La reacción catalizada por la  $\beta$ -glucosidasa se describe en la Figura 10.

**Figura 10.** Reacción de hidrólisis catalizada por la  $\beta$ -glucosidasa (Divakar, 2013).



Las  $\beta$ -glucosidasas representan el mayor grupo de glucósido hidrolasas presentes en todos los organismos vivos desde bacterias a humanos. Estas enzimas desempeñan una función crucial tanto fisiológica como biotecnológica dependiendo de la naturaleza y diversidad de la molécula glicona o aglicona de sus sustratos (Hatibe Ertürk y colbs., 2011). Las  $\beta$ -glucosidasas en plantas desempeñan un papel importante en el crecimiento, desarrollo, detoxificación, maduración y defensa (Li y colbs., 2005; Mazzuca y colbs., 2006).

Las  $\beta$ -glucosidasas están implicadas en numerosas funciones biológicas, tales como la degradación de estructuras y almacenamiento de polisacáridos, actúan como marcadores celulares e intervienen en procesos de oncogénesis.

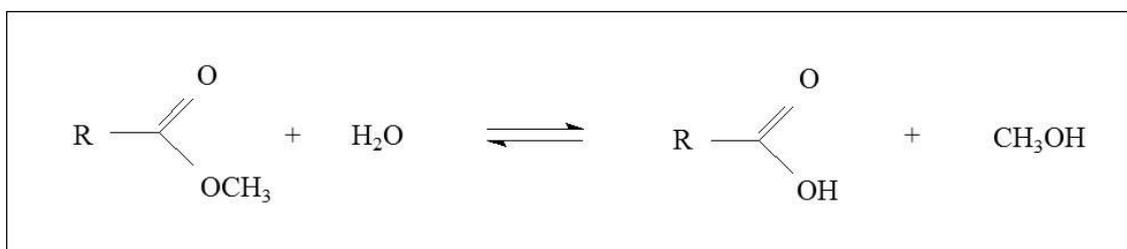
La activación de compuestos químicos procedentes del metabolismo secundario que intervienen en el mecanismo de defensa de la planta es la función de estas enzimas más estudiada en el ámbito de la alimentación, dado que algunos metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, tienen una gran repercusión en las sensaciones olfato-gustativas en alimentos de origen vegetal.

Desde el punto de vista tecnológico, estas enzimas se utilizan en múltiples aplicaciones. Generalmente, las agliconas formadas por la acción de las  $\beta$ -glucosidasas son los compuestos responsables del flavor de los alimentos y mejoran las propiedades organolépticas del producto final (Esem, 2003). Particularmente, han sido muy

estudiados los aromas producidos por la acción de las  $\beta$ -glucosidasas en las hojas de té, en zumos de frutas y vinos (Shoseyov y colbs., 1990; Guegen y colbs., 1996; Riou y colbs., 1998; Li y colbs., 2005).

Las **esterasas** o  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (EC 3.1.1.X) son enzimas que catalizan la hidrólisis y formación de enlaces ésteres (Figura 11). La rotura enzimática de un enlace éster ocurre en presencia de una molécula de agua, obteniéndose como productos de la hidrólisis un ácido y un alcohol. Existe una amplia gama de enzimas esterasas, que se diferencian por su especificidad por el sustrato, por su estructura proteica y por su función biológica. Son enzimas termoestables, sobre todo a altas temperaturas, y en medios orgánicos catalizan la esterificación, interesterificación, así como reacciones alcohólicas y ácidas (Kawamoto y colbs., 1987).

**Figura 11.** Reacción de hidrólisis catalizada por la esterasa (Panda y Gowrishankar, 2005).



Las esterasas tienen muchas aplicaciones industriales, en concreto son utilizadas en la producción de alimentos, bebidas, cosméticos, papel, detergentes, en la síntesis de derivados de carbohidratos y aditivos alimentarios (Ranjitha, 2009).

Las esterasas participan en el desarrollo del flavor de muchos alimentos, como por ejemplo en la elaboración del queso (Fenster y colbs., 2003), en la producción de los compuestos aromáticos del vino (Du Toit y colbs., 2011) y durante la producción de carne fermentada (Brod y colbs., 2010). Asimismo, las esterasas procedentes de microorganismos tienen un gran interés por su aplicación en biotecnología. Por ejemplo, Rojas y colbs. (2001) han estudiado la producción de ésteres acetatos a partir de levaduras vínicas. También se ha demostrado que esterasas procedentes de levaduras juegan un papel significativo en el flavor final de cervezas (Dufour y colbs., 2003).

### **1.4.2.1. Enzimas hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y esterasa) relacionadas con compuestos polifenólicos en aceitunas**

Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas junto con las esterasas están naturalmente presentes en las aceitunas (Briante y cols., 2002). Existen muy pocos estudios sobre la localización de las  $\beta$ -glucosidasas y ninguno sobre las esterasas relacionadas con los compuestos fenólicos de las aceitunas.

Mazzuca y cols. (2006) localizaron actividad de  $\beta$ -glucosidasa en el mesocarpio durante la maduración del fruto e indicaron que cuando los tejidos de los frutos son dañados mecánicamente o por la acción de insectos patógenos los compartimentos celulares se desorganizan y la  $\beta$ -glucosidasa es capaz de hidrolizar la oleuropeína.

Asimismo, Spadafora y cols. (2008) han comprobado que la respuesta de defensa de los frutos a un ataque por insectos induce a la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, la cual actúa rápidamente hidrolizando la molécula de oleuropeína y formando moléculas aldehídicas altamente reactivas contra estos daños ocurridos en el tejido del fruto. En este estudio se observó máxima actividad  $\beta$ -glucosidasa durante los 20 minutos posteriores al daño, existiendo después una progresiva inactivación de la enzima en los tejidos circundantes a la zona dañada e inactivándose definitivamente a las 3 horas de haberse producido el daño.

Estudios realizados en sistemas modelos han demostrado que extracto de oleuropeína obtenido de frutos verdes y de hojas de olivos se hidroliza por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, obteniéndose glucosa y la aglicona correspondiente (Walter y cols., 1973; Capasso y cols., 1997; De Leonardis y cols., 2015). Algunos investigadores han indicado que, durante la maduración de las aceitunas, la  $\beta$ -glucosidasa degrada progresivamente la oleuropeína, liberándose glucosa de la molécula y endulzándose los frutos (Konno y cols., 1999; Briante y cols., 2002). Sin embargo, otros estudios indican que la aglicona procedente de la hidrólisis de la oleuropeína tiene el mismo grado de amargor que ésta (Walter y cols., 1973).

La afinidad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa por la oleuropeína ha sido observada en variedades de aceitunas italianas Ascolana Tenera y Frantoio (Briante y colbs., 2002) y en la variedad tunecina Dhokar (Jemai y colbs., 2009). Estos investigadores han afirmado que la actividad glucosidasa aumenta durante la maduración de los frutos y, a su vez, la concentración de oleuropeína disminuye. Asimismo, más recientemente, en variedades españolas como Arbequina y Hojiblanca se ha demostrado el papel crucial de la  $\beta$ -glucosidasa en la síntesis y degradación de la molécula de oleuropeína durante la maduración de los frutos en el árbol (Gutiérrez-Rosales y colbs., 2010, 2012).

Estudios de laboratorio han demostrado la especificidad de la  $\beta$ -glucosidasa aislada de aceitunas de la variedad Picual hacia la oleuropeína y, en menor medida, por las moléculas demetiloleuropeína y ligustrósido (Romero-Segura y colbs., 2009).

Por otra parte, investigadores italianos han demostrado que durante la molturación y batido de las aceitunas, al elaborar aceite de oliva, se producen transformaciones enzimáticas de los fenoles presentes en el fruto fresco por la acción de las hidrolasas endógenas, principalmente de la oleuropeína y el ligustrósido. Ambos glucósidos son hidrolizados por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa endógena de los frutos y se transforman en sus respectivas agliconas, la forma dialdehídica decarboximetilada de la aglicona de oleuropeína (HyEDA) y de ligustrósido (TyEDA) (Ranalli y colbs., 2003).

Previamente, Montedoro y colbs. (1993) habían identificado la presencia de estas agliconas en el aceite de oliva e indicaron que no aparecería en los frutos frescos, aunque, posteriormente, Briante y colbs. (2002) postularon que en frutos maduros, las enzimas y sustratos sí entran en contacto y sí se forma una pequeña concentración de HyEDA en los mismos. Una prueba más de que estas transformaciones eran enzimáticas fue un ensayo realizado por Montedoro y colbs. (2002), donde encontraron que la concentración de HyEDA en la masa de aceituna era mínima si los frutos previos a la molturación se calentaban, lo cual indicaba que dicho calentamiento inactivaba la enzima  $\beta$ -glucosidasa y, por tanto, no podía formarse las agliconas fenólicas. Recientemente, se ha postulado que la formación de HyEDA en la obtención de aceite de oliva no se debe únicamente a la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, sino que además es

necesario la acción de una segunda enzima metilesterasa endógena (Romero-Segura y colbs., 2012).

Las esterasas en aceitunas actúan hidrolizando el enlace éster de la oleuropeína, formándose hidroxitirosol y un derivado glucosilado. Amiot y colbs. (1989) observaron que los derivados glucosilados de la oleuropeína, glucósido del ácido elenólico y demetiloleuropeína, aumentaban en los frutos durante su maduración. Además, la aparición de estos compuestos coincidía con la disminución en la concentración de oleuropeína y un aumento en la actividad esterasa endógena de los frutos.

Asimismo, se ha sugerido la posibilidad de sinergismo entre la esterasa y la  $\beta$ -glucosidasa, facilitando ésta última la acción de la primera. En primer lugar la  $\beta$ -glucosidasa rompe la unión de la glucosa con el aglicón, y posteriormente la esterasa hidroliza este último compuesto dando lugar a hidroxitirosol y ácido elenólico (Jemai y colbs., 2009).

### **1.5. Influencia de los procesos tecnológicos sobre la composición fenólica en aceitunas de mesa**

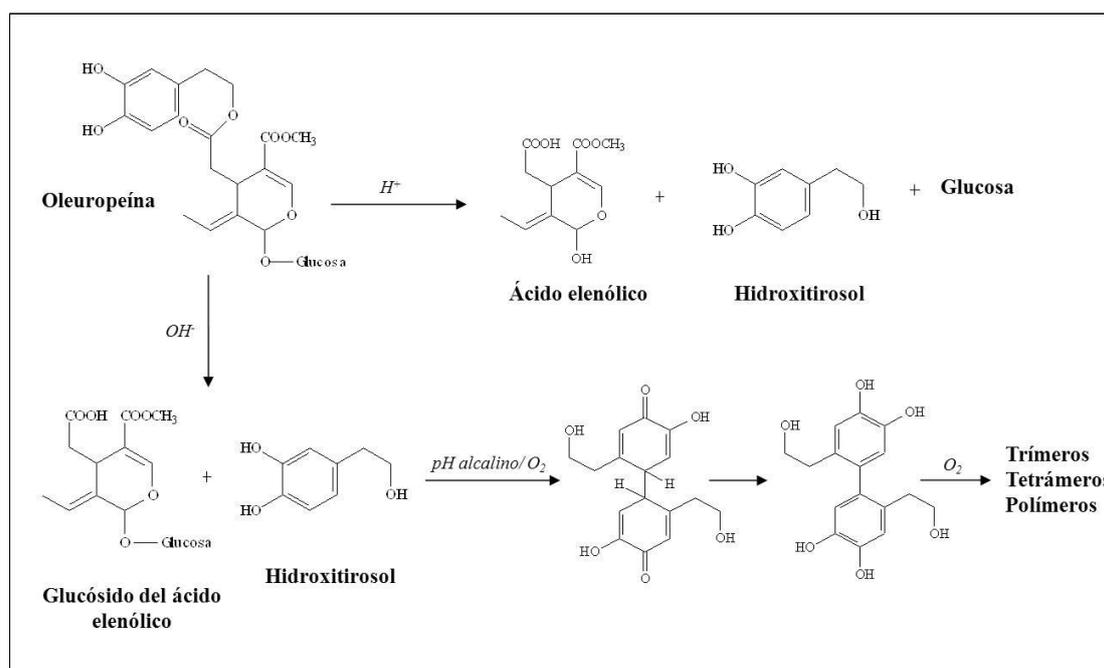
La presencia de compuestos fenólicos en el fruto fresco, concretamente el glucósido amargo oleuropeína, hace necesario el procesamiento del mismo con el objetivo de transformar dicho compuesto en otros no amargos. Estas transformaciones que implican la hidrólisis de la oleuropeína pueden ser catalizadas de forma química o enzimática. La intensidad de estas reacciones va a depender del proceso tecnológico aplicado e influirán en las características del producto final obtenido (Montedoro y colbs., 1991).

#### **1.5.1. Transformaciones químicas**

Los procesos de elaboración de aceituna de mesa comprenden numerosas etapas, siendo el valor de pH del medio uno de los parámetros más determinantes en las transformaciones químicas que suceden sobre los compuestos fenólicos presentes en las

aceitunas de mesa. En la figura 12 se muestran las principales transformaciones químicas ocurridas en la molécula de oleuropeína.

**Figura 12.** Transformaciones químicas de la oleuropeína durante la elaboración de aceitunas de mesa (Brenes y cols., 1993a y 1995a).



### 1.5.1.1. Aceitunas verdes estilo español

Si observamos el esquema de elaboración de este producto (Figura 5A), se puede afirmar que la etapa crucial de transformación química de los compuestos fenólicos es el tratamiento con hidróxido sódico. En medio alcalino, se produce la rotura del enlace éster de la oleuropeína con la consiguiente formación de hidroxitirosol y glucósido de ácido elenólico (Figura 12), compuestos no amargos (Brenes y de Castro, 1998). Asimismo, otros compuestos fenólicos presentes en la pulpa del fruto fresco se hidrolizan, liberándose un parafenol, tirosol, a partir del ligustrósido, y dos ortodifenoles, hidroxitirosol y ácido cafeico, a partir del verbascósido (Brenes y cols., 1995a).

En la siguiente etapa del proceso, el lavado, lo que se produce es una difusión de estas sustancias desde la pulpa al medio acuoso, con la consiguiente reducción en el contenido en pulpa dependiendo de la duración del lavado. A continuación, los frutos se sumergen en salmuera en la cual se produce el crecimiento de bacterias lácticas y levaduras. Pues bien, las sustancias polifenólicas presentes en la pulpa lavada se difunden al medio salino y se alcanza un equilibrio en los primeros 15-20 días sin que se detecte posteriormente ningún tipo de transformación de los polifenoles por el hecho de la acidificación del medio (Brenes y colbs., 1995a).

La concentración fenólica en el producto final envasado variará dependiendo de la forma de presentación, así los frutos enteros tendrán mayor contenido, seguidos de los deshuesados, siendo las aceitunas rellenas las que presentan menor concentración de fenoles al haber sido tratados con un mayor número de etapas de lavado durante su elaboración (Romero y colbs., 2004b).

### **1.5.1.2. Aceitunas negras oxidadas**

La elaboración de este producto implica una primera etapa de conservación de las aceitunas en un medio ácido durante la cual se produce la difusión de los compuestos polifenólicos desde la pulpa hasta el medio acuoso y la hidrólisis ácida de la oleuropeína, formándose ácido elenólico, glucosa e hidroxitirosol como productos de la reacción (Brenes y colbs., 1993a), tal como se refleja en la Figura 12.

Por otra parte, en la etapa de ennegrecimiento (Figura 5B), los tratamientos con hidróxido sódico transforman químicamente los restos de oleuropeína y otros compuestos fenólicos presentes en los frutos como verbascósido, liberándose en condiciones alcalinas compuestos como hidroxitirosol y ácido cafeico. Ambos ortodifenoles en presencia de oxígeno se oxidan y polimerizan (Figura 12) dando lugar a la formación del color negro característico de esta forma de elaboración (Brenes y colbs., 1992).

La siguiente etapa es la adición de una sal ferrosa (gluconato o lactato ferroso) para fijar el color negro formado. El hierro ferroso penetra en la pulpa de las aceitunas,

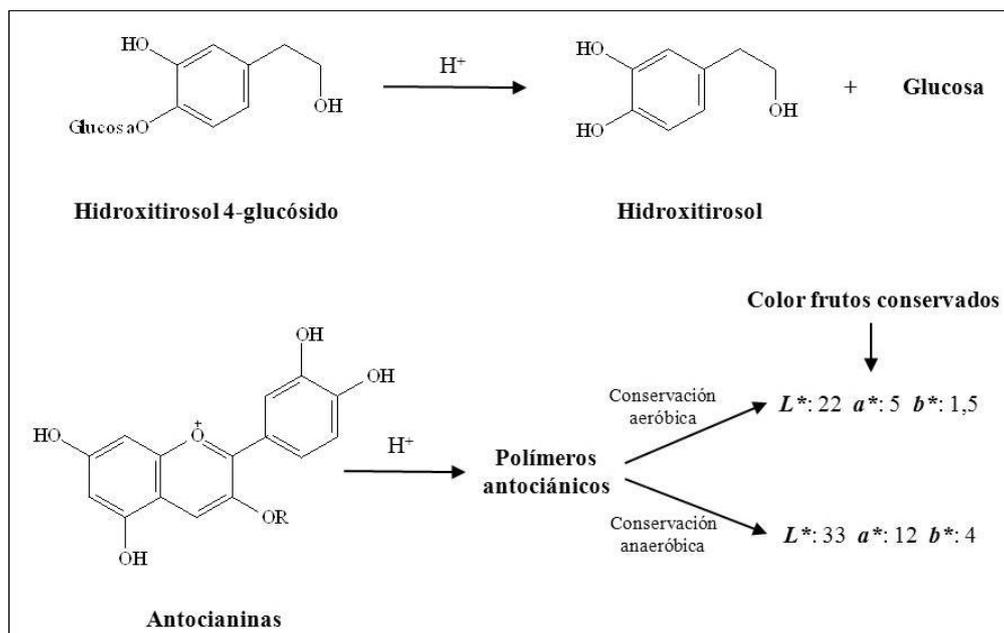
se oxida a férrico y se une a los polímeros fenólicos formados durante la fase de ennegrecimiento (Brenes y cols., 1995b). El pH del medio, la temperatura y el tipo de sal ferrosa son algunos de los factores que influyen en la eficacia de esta etapa y en la estabilidad de los complejos Fe-polímeros fenólicos (García y cols., 2001a).

### 1.5.1.3. Aceitunas naturales en salmuera

La eliminación del amargor en estas aceitunas se produce sin la intervención del hidróxido sódico. De un lado, se parte de aceitunas negras ya maduras con menor contenido en oleuropeína y, por otra parte, la difusión paulatina de esta sustancia al medio salino y su hidrólisis ácida son los factores determinantes en el endulzamiento de los frutos.

Además de oleuropeína, es importante la presencia en los frutos maduros de hidroxitirosol 4-glucósido y antocianinas (Romero y cols., 2002b). El glucósido de hidroxitirosol se hidroliza por las condiciones ácidas del medio en glucosa e hidroxitirosol (Figura 13) (Arroyo-López y cols., 2005) y las antocianinas libres tienden a polimerizarse formando complejos antociánicos coloreados (Figura 13).

**Figura 13.** Transformaciones químicas de fenoles durante la elaboración de aceitunas naturales en salmuera (Romero y cols., 2004a).



Este tipo de aceitunas se suelen conservar en condiciones anaeróbicas, aunque en ocasiones la conservación puede ser aeróbica con el objetivo de eliminar el anhídrido carbónico generado por la propia respiración de los frutos y/o producido por los microorganismos del medio. En estas condiciones de aerobiosis, el hidroxitirosol liberado se oxida lentamente debido al pH ácido del medio dando lugar al oscurecimiento de los frutos con lo que adquieren tonalidades pardas. Si las aceitunas son muy maduras, recolectadas con color negro, se produce además la oxidación y polimerización de los compuestos antociánicos (Figura 13), desapareciendo por completo las antocianinas simples del medio (Romero y cols., 2004a).

### **1.5.1.4. Aceitunas deshidratadas**

Este tipo de aceitunas de mesa se elabora a partir de frutos muy maduros, los cuales tienen una concentración de compuestos fenólicos no muy elevada y el grado de amargor no suele ser muy intenso.

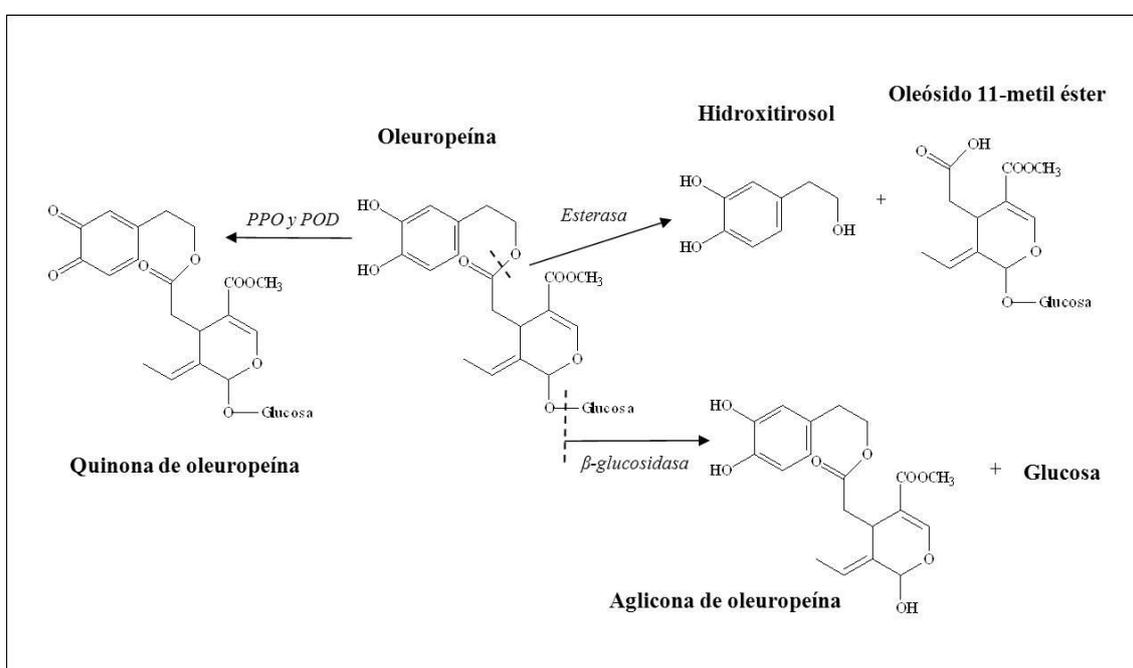
Es un producto local que también se comercializa en numerosos países aunque en pequeñas cantidades debido a los problemas de estabilidad que presenta y a los problemas de elaboración que conlleva. Por ello, son también escasas las publicaciones científicas sobre esta forma de preparación comercial y, en particular, sobre las transformaciones de los compuestos polifenólicos. La mayoría de los estudios, por tanto, se han centrado sobre la estabilidad química y microbiológica del producto ya envasado (Panagou y cols., 2002; Panagou, 2006).

Las investigaciones relacionadas con la composición fenólica de este producto elaborado son casi inexistentes, apenas se conoce el perfil fenólico de algunas variedades italianas, griegas o argelinas, deshidratadas con sal (Zoidou y cols., 2010; Soufi y cols., 2014) o deshidratadas con calor (Marsilio y cols., 2000; Mantzouridou y Tsimidou, 2011). Se asume que durante el proceso de deshidratación el endulzamiento del fruto ocurre por difusión de los compuestos fenólicos del fruto fresco hacia el líquido que resuma durante la elaboración del producto, es decir, se elimina en el jugo de las aceitunas que se filtra durante la deshidratación aunque ello no ha sido demostrado.

### 1.5.2. Transformaciones con intervención enzimática

Las investigaciones realizadas hasta ahora sobre las transformaciones de los compuestos fenólicos catalizadas enzimáticamente durante el procesado de aceitunas de mesa son muy escasas y centradas en la etapa de postrecolección. En la Figura 14 se muestran las transformaciones de la molécula de oleuropeína mediante la intervención enzimática de  $\beta$ -glucosidasas, esterases y oxidasas (PPO y POD).

**Figura 14.** Estructura de la oleuropeína y productos generados a partir de las transformaciones enzimáticas (García y cols., 2008).



#### 1.5.2.1. Aceitunas verdes estilo español

De todas las etapas del proceso de elaboración de este tipo de aceitunas (Figura 5A) es en la recolección donde se han centrado los escasos estudios que existen sobre la acción enzimática en la transformación de los compuestos polifenólicos, en particular oleuropeína. Es bien conocido que la recolección mecanizada, sobre todo con variedades tales como Manzanilla y Gordal, origina una serie de manchas oscuras en las aceitunas debido a los golpes que sufren los frutos. Por tanto, los investigadores han centrado sus estudios en cómo inhibir la acción de las oxidasas (PPO y POD) durante la

etapa de postrecolección de los frutos. Por ejemplo, conservar los frutos recolectados en soluciones de ácido ascórbico, soluciones acidificadas a pH 2,0, refrigeración, etc (Segovia-Bravo y colbs., 2007).

Por otra parte, la siguiente etapa de la elaboración de estas aceitunas consiste en el tratamiento con hidróxido sódico, lo que implica unas condiciones de pH muy elevadas, en torno a 11 unidades. La gran mayoría de las enzimas tienen un pH óptimo de actividad entre 4 y 8 unidades, y se degradan o se inactivan en ese grado de alcalinidad (Pandey y colbs., 2008), por ello ningún investigador hasta ahora ha estudiado este tipo de transformaciones en este producto. Únicamente, Medina y colbs. (2009) han indicado que el tratamiento con hidróxido sódico podría inactivar las enzimas presentes en las aceitunas, tales como la  $\beta$ -glucosidasa, ya que en estas aceitunas no aparecen compuestos antimicrobianos, los cuales sí están presentes en aceitunas no tratadas alcalinamente.

### **1.5.2.2. Aceitunas negras oxidadas y aceitunas naturales en salmuera**

Si observamos el esquema de elaboración de las aceitunas negras oxidadas y las aceitunas naturales en salmuera (Figura 5B y 5C), existe en ambas elaboraciones una etapa común que es la conservación de los frutos en una salmuera durante la cual podría existir actividad enzimática relacionada con la transformación de los compuestos polifenólicos.

Mazucca y colbs. (2006) indicaron que las agliconas fenólicas no aparecen en el fruto fresco ya que las enzimas y los sustratos no están en contacto en los frutos en el árbol. Sin embargo, en el caso de las aceitunas de mesa, el hecho de colocar las aceitunas en salmuera provoca la rotura de los tejidos del fruto y ello podría dar lugar al contacto entre los glucósidos fenólicos y las enzimas endógenas de los frutos.

Medina y colbs. (2007) han demostrado la formación de elevadas concentraciones de HyEDA en la salmuera de 17 variedades de aceitunas conservadas en condiciones asépticas durante dos meses, a la vez que disminuye considerablemente la concentración de oleuropeína en el medio (Medina y colbs., 2009). Este compuesto es

el producto de la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa endógena del fruto y no se forma si las aceitunas son tratadas térmicamente en un paso previo a la colocación en salmuera, dado que dicho tratamiento térmico provocaría la inactivación de la enzima.

Asimismo, García y cols. (2008) han propuesto la obtención de un nuevo producto por acción de una sobrepresión de oxígeno o aire durante 1-3 días. Esta forma de procesado consigue endulzar los frutos, que presentan un color oscuro, tanto externa como internamente, como consecuencia de la oxidación enzimática de los ortodifenoles como la oleuropeína por acción de la enzima PPO endógena.

Por otra parte, la pérdida de amargor en las aceitunas naturales en salmuera suele ser un proceso lento que tarda meses o años. Levaduras y bacterias lácticas son los microorganismos que se suelen desarrollar en las salmueras de éstas aceitunas y, como es bien conocido, muchos de estos microorganismos presentan actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, lo cual podría aprovecharse para actuar sobre la molécula de oleuropeína. Por ello, han sido numerosos los autores que han investigado la posibilidad de buscar un microorganismo que degrade enzimáticamente la oleuropeína, y así de este modo acelerar el periodo de endulzamiento de los frutos.

Ciafardini y cols. (1994) inocularon soluciones modelos ricas en oleuropeína con tres cepas diferentes de *Lactobacillus plantarum* (B17, B20, B21), aisladas de salmueras de aceitunas negras naturales no tratadas con NaOH, y demostraron que dichas cepas se caracterizaban por tener actividad  $\beta$ -glucosidasa e hidrolizaban el glucósido fenólico. Ensayos similares han sido realizados por otros investigadores y han demostrado que cepas de *Lactobacillus plantarum* eran capaces de hidrolizar la oleuropeína a través la acción de  $\beta$ -glucosidasa formándose su aglicona, que posteriormente por acción de esterasas daba lugar a los productos finales de la hidrólisis, hidroxitirosol y ácido elenólico (Marsilio y cols., 1996; Ghabbour y cols., 2011; Zago y cols., 2013; Tofalo y cols., 2014). Algunas de estas cepas llegaban a hidrolizar el 90 % de la oleuropeína presente en la solución modelo, obteniéndose hidroxitirosol como producto final de hidrólisis, mientras otras sólo alcanzan a la formación de un metabolito intermedio, la aglicona de la oleuropeína (Santos y cols., 2012).

También, este aspecto de las transformaciones enzimáticas de los fenoles, concretamente oleuropeína, por acción de enzimas exógenas procedentes de microorganismos ha sido abordado desde el punto de vista de cepas de levaduras procedentes de las salmueras de aceitunas elaboradas como verdes en salmuera (Bautista-Gallego y colbs., 2011; Restuccia y colbs., 2011; Tofalo y colbs., 2013) o negras naturales en salmuera (Bonatsou y colbs., 2015), destacándose *Wicheramomyces anomalus* como la especie más efectiva.

Por otra parte, son escasos los estudios a escala piloto. Únicamente Servili y colbs. (2006) seleccionaron 5 cepas aisladas de salmueras de aceitunas negras naturales italianas y encontraron que el *Lactobacillus pentosus* (1MO) era capaz de endulzar las aceitunas en apenas 8 días, haciéndolas comestibles. Asimismo, Kaltsa y colbs. (2015) aislaron cinco cepas de *Lactobacillus plantarum* procedentes de la elaboración de aceitunas verdes y negras naturales y comprobaron que el *Lactobacillus* Lp15 tenía una elevada actividad  $\beta$ -glucosidasa, mientras que el *Lactobacillus* Lp20 tiene una elevada actividad esterasa.

### **1.5.2.3. Aceitunas deshidratadas**

La humedad de los alimentos es de gran importancia en la velocidad de la reacción enzimática, a niveles muy bajos de humedad la actividad enzimática puede verse afectada cualitativamente aunque su velocidad enzimática pueda ser medible. En estas condiciones de humedad la rigidez del medio impide la difusión de las enzimas o del sustrato limitándose así la acción enzimática por no estar en contacto con el sustrato. En ocasiones, en productos con tan poca humedad son generalmente las enzimas de los mohos que se desarrollan en superficie las únicas actividades enzimáticas medibles en estos productos.

Asimismo, la concentración de cloruro sódico puede ser un factor inhibitorio de las enzimas endógenas de los frutos. Lu y colbs. (2006) demostraron que la actividad de la enzima PPO de manzana se inhibe casi totalmente al 0,058 % de NaCl por lo que la inhibición de la PPO es dependiente de la concentración de cloruro sódico presente en el medio.

Los estudios relacionados con este tipo de aceitunas son escasos, todos ellos centrados en obtener un producto seguro y organolépticamente aceptable (Panagou y colbs., 2002). Tampoco existe ninguna investigación que haya abordado las transformaciones enzimáticas de los compuestos fenólicos presentes en este tipo de aceituna de mesa.

En general, en las aceitunas de mesa, al contrario de lo que sucede con otros vegetales, **existen muy pocos estudios sobre la actividad enzimática relacionada con las transformaciones de los compuestos fenólicos y los cambios que se producen durante los diferentes procesos de elaboración.**



## **2. Objetivos**

---



En los últimos años los estudios sobre la importancia de los compuestos fenólicos en los diferentes procesos de elaboración de aceitunas de mesa han sido muy relevantes. Sin embargo, no existen precedentes de investigaciones sobre la actividad enzimática catalizadora de las reacciones de transformación de estas sustancias fenólicas.

El objetivo general de esta tesis doctoral es conocer los mecanismos de actuación de las enzimas oxidasas e hidrolasas sobre los compuestos fenólicos, en particular oleuropeína, presentes en las aceitunas, para mejorar su calidad, abaratar los costes de recolección y permitir el desarrollo de nuevos productos y preparaciones.

Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de la composición fenólica en los frutos no procesados de las variedades más empleadas para la elaboración como aceitunas de mesa: Gordal, Manzanilla y Hojiblanca.
2. Caracterizar la actividad de las enzimas oxidativas (polifenoloxidasa y peroxidasa) e hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y esterasa) relacionadas con los compuestos fenólicos de las aceitunas, en particular oleuropeína.
3. Estudiar la influencia de las enzimas catalizadoras de las reacciones de transformación de los compuestos fenólicos, sobre todo la oleuropeína, sobre los diferentes procesos de elaboración de aceitunas.
4. Desarrollar nuevos procesos de elaboración mediante la modulación de las reacciones enzimática y química de la oleuropeína que se desarrollan durante las diferentes formas de procesado de las aceitunas de mesa.



### **3. Materiales y métodos**

---



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Determinación de la concentración de cloruro sódico

Se determina valorando la concentración del ión cloruro con una solución de nitrato de plata (0,086 N) (Panreac, Barcelona, España) exactamente valorada, siendo necesario utilizar material de color topacio y una solución indicadora de cromato potásico al 5 % (p/v) en agua destilada.

##### *Salmuera de aceitunas*

Se valoran 0,5 mL de salmuera, a los que se añaden 100 mL de agua destilada, con la solución de nitrato de plata, usando como indicador la solución de cromato potásico (Panreac). La concentración de cloruro sódico (NaCl) es igual al valor del volumen gastado de la solución de nitrato de plata en la valoración y se expresa en porcentaje (p/v, gramos de NaCl por 100 mL de solución).

##### *Pulpa de aceitunas*

Se pesan 20 g de fruto y se mezclan con 20 mL de agua destilada, empleando un homogeneizador Ultra-turrax (IKA-T25, S25N-18G) la mezcla se centrifuga a 7052 x g durante 5 minutos. 0,5 mL del sobrenadante diluidos con 100 mL de agua destilada se valoran de la misma forma indicada anteriormente. El contenido en sal de las aceitunas se expresa en porcentaje (p/v, gramos de NaCl/100 mL de jugo de aceituna) teniendo en consideración la humedad de la muestra.

#### 3.2. Determinación de la acidez libre, acidez combinada y pH

La medida de la acidez libre, pH y acidez combinada de las salmueras se realiza con un titulador Metrohm 670 Titroprocessor (Herisau, Switzerland). La acidez libre se determina titulando 25 mL de salmuera con NaOH 0,2 N hasta un pH de 8,3 y se expresa como porcentaje (p/v) de ácido láctico. La acidez combinada se determina con

HCl 2 N hasta alcanzar un valor de 2,6 y se expresa como equivalentes de hidróxido sódico por litro.

El pH de la pulpa de las aceitunas se mide directamente usando un pHmetro portátil pH Tester WP Spear (Singapore). Las medidas se realizan insertando el electrodo en la pulpa de las aceitunas. Los datos de pH de la pulpa es el promedio de 3 medidas.

### **3.3. Análisis de ácidos orgánicos en salmueras y jugo de aceitunas**

Las salmueras se filtran a través de filtros de nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro antes de ser analizadas en el sistema cromatográfico. Los jugos de aceitunas se obtienen triturando las pulpas de aceitunas empleando un triturador (Braun turbo Multiquick/Minipimer 500 Watt Type 4191) y posteriormente filtrando el triturado a través de un filtro de tela. Posteriormente, se centrifuga a 10577 x g durante 5 minutos (Sánchez y cols., 2000) y el sobrenadante se filtra a través de un filtro de nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro antes de inyectarse en el sistema cromatográfico.

El sistema cromatográfico está constituido por un equipo Waters 2695 Alliance que incluye una bomba cuaternaria, inyector automático y horno en el mismo equipo. La detección de los ácidos se lleva a cabo mediante un detector de índice de refracción. Todo el proceso está controlado por el programa Millennium 32 (Waters Inc., Milford, Ma). La columna utilizada para la separación de los compuestos es una Spherisorb analítica ODS-2 (C18) de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro interno (Waters Inc.). La temperatura de la columna es 30 °C y la temperatura interna del detector 40 °C. Se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de muestra.

La separación se realiza bajo un gradiente de elución donde las fases móviles son agua acidificada con ácido fosfórico (1,5 mL/L) (A) y metanol (B). El gradiente de elución y el flujo empleado es:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1,2	100	0
15	1,2	100	0
17	0,9	100	0
19	0,9	20	80
26	0,9	20	80
28	0,9	100	0
32	1	100	0
36	1	100	0
38	1,2	100	0
83	1,2	100	0

La cuantificación se realiza mediante rectas de calibrado con ácido acético y ácido láctico al 0,5 % (p/v). Los resultados se expresan en porcentaje (p/v).

#### 3.4. Análisis del color superficial de las aceitunas

El análisis del color de las aceitunas se lleva a cabo usando un espectrofotómetro Color-view<sup>TM</sup> modelo 9000 (BYK-Gardner, USA), equipado con un Software (QC Manager) que calcula los parámetros CIE  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (rojo/verde),  $b^*$  (amarillo/azul),  $C$  (croma) y  $h$  (tono), considerando el iluminante D65 y el observador de 10°. Para evitar distorsiones en la medida, el receptáculo donde se coloca la muestra se cubre con una cápsula que tiene el interior de color negro. Los datos de cada medida son la media de 20 frutos que previamente habrán sido secados.

#### 3.5. Análisis del color de los jugos de aceitunas

El análisis del color de los jugos de aceitunas se lleva a cabo usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Kioto, Japón), con control de temperatura. Los jugos de aceitunas se obtienen según el apartado 3.3. Se mide la absorbancia entre 400 y 700 nm.

### **3.6. Determinación del contenido de humedad de las aceitunas**

El contenido de humedad se determina mediante el secado de las aceitunas en una estufa a 105 °C (Fernández y cols., 1985). Se pesan 5 g de pulpa de aceitunas trituradas empleando un triturador (Braun turbo Multiquick/Minipimer 500 Watt Type 4191) y se secan a la temperatura indicada anteriormente hasta obtener un peso constante. La humedad de las aceitunas se calcula por la pérdida de porcentaje de agua en peso debida a su eliminación por calentamiento. Las medidas se hacen por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de humedad (p/p, gramos de H<sub>2</sub>O/100 g de pulpa de aceitunas).

### **3.7. Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ ) de las aceitunas**

La actividad de agua se determina mediante el equipo Aqua Lab (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA). El análisis se realiza midiendo el punto de rocío de una aceituna partida por la mitad. El resultado es la media de 8 medidas.

### **3.8. Determinación de la textura de las aceitunas**

La textura de las aceitunas se mide usando una célula de compresión-cizallamiento tipo Kramer acoplada a un texturómetro modelo TA.TX plus (Stable Microsystems, Godalming, UK). La velocidad de bajada del pistón es de 200 mm/min y la escala de fuerza de 0 a 500 N. La textura de las aceitunas es el resultado de la media de 10 medidas realizadas con 3 aceitunas deshuesadas cada una. Los resultados se expresan en kN/100 g de fruto deshuesado.

### **3.9. Análisis microbiológico**

#### ***Salmueras***

Las muestras de salmuera y las correspondientes diluciones decimales (en agua de peptona 0,1 % estéril) se siembran utilizando un sembrador en espiral Spiral Plater (Don Whitley Sci. Ltd., Model Wasp 2, Shirpley, UK). El recuento de bacterias lácticas

se realiza en MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (Oxoid Ltd., Basingstoke, U. K.), en algunas ocasiones suplementado con azida sódica al 0,02 % e incubando las placas en anaerobiosis. El recuento de mohos y levaduras se realiza en OGYE agar (Oxoid), a veces suplementado con antibiótico oxitetraciclina (Oxoid). Ambos medios se incuban a 32 °C y las colonias se enumeran a las 24, 48 o 72 horas usando un Counterstat V.3.1. (IUL Instrument, Barcelona, España). Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de salmuera.

### *Frutos*

Para realizar el análisis microbiológico de los frutos se toman asépticamente 100 g de aceitunas, se mezclan y agitan con 400 mL de una solución salina estéril al 0,85 % de NaCl. Esta solución y sus diluciones decimales se siembran utilizando un sembrador en espiral en diferentes medios de cultivo. Para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se usa PCA (Plate Count Agar) (Oxoid), para enterobacterias se usa violeta rojo bilis glucosa agar (VRBG) (Biokar), las levaduras y mohos en OGYE agar (Oxoid), a veces suplementado con antibiótico oxitetraciclina (Oxoid) y las bacterias ácido lácticas en MRS agar (Man Rogosa Sharpe) (Biokar). Las placas se incuban a 37 °C para VRBG y a 32 °C para el resto de medios. Las colonias se enumeran a las 24, 48 o 72 horas de incubación usando un contador de colonias automático.

### **3.10. Análisis de compuestos polifenólicos**

#### **3.10.1. Preparación de la muestra**

##### **3.10.1.1. Pulpa de aceitunas**

La extracción de los compuestos fenólicos presentes en la pulpa de las aceitunas se realiza mediante la metodología propuesta por Kumral y cols. (2013) con algunas modificaciones, la cual se basa en la extracción de estas sustancias con dimetilsulfóxido (DMSO).

Se pesan 10 g de pulpa de una muestra representativa de 20 frutos a los que se añaden 30 mL de DMSO. Se tritura con ayuda de un homogeneizador-triturador Ultraturrax (IKA-T25, S25N-18G) hasta conseguir una mezcla totalmente homogénea. Después de 30 minutos de contacto, se centrifuga a 10577 x g durante 5 minutos a una temperatura de 22 °C, se recoge el sobrenadante y se pasa a través de un filtro de 0,20 µm de diámetro de poro. En un vial de cromatografía se mezclan 250 µL del filtrado, 250 µL de patrón interno (ácido siríngico 0,2 mM en DMSO) y 500 µL de DMSO y se inyectan en el sistema cromatográfico. Todas las muestras se analizan por duplicado.

La extracción de los compuestos fenólicos de la piel de las aceitunas se realiza separándola de la pulpa con la ayuda de un cúter. Se pesan 0,1 g de piel y 0,5 mL de DMSO y se procede a la extracción de los compuestos fenólicos como se ha descrito anteriormente. Todas las muestras se analizan por cuadruplicado.

La extracción de los compuestos fenólicos de pulpa de aceitunas porraceadas se realiza mezclando 0,1 g de pulpa de las áreas dañadas y no dañadas con 0,5 mL de DMSO. Se agita en el vórtex durante un minuto y se sonica durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos. Este procedimiento se repite durante 5 veces. Posteriormente la mezcla se centrifuga a 10577 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recupera el sobrenadante, se filtra y se inyecta en el sistema cromatográfico. Los análisis se realizan por triplicado.

### **3.10.1.2. Salmuera de aceitunas**

Se mezclan 250 µL de salmuera, 250 µL de patrón interno (ácido siríngico 2 mM en agua desionizada) y 500 µL de agua desionizada. Se hace pasar a través de un filtro de 0,20 µm de diámetro de poro y se inyectan en el sistema cromatográfico. Todas las muestras se analizan por duplicado.

### **3.10.2. Determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)**

El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia, con detección por absorbancia en el ultravioleta (Medina y cols., 2007).

El sistema cromatográfico se compone de una bomba Waters 600E, inyector automático Waters 717 plus, detector de fotodiodos Waters 996 y horno externo (Waters Inc. Milford, MA). El sistema está controlado por el programa Empower 2 (Waters Inc.).

La columna utilizada para la separación de compuestos es una Spherisorb analítica ODS-2 (C18) de 5 µm de tamaño de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno (Waters Inc.). El flujo de elución es de 1 mL/min, la temperatura del horno 35 °C y el volumen de inyección de la muestra 20 µL. La absorbancia en el ultravioleta de los compuestos polifenólicos se mide a una longitud de onda de 280 nm.

La separación se lleva a cabo usando un gradiente de elución en el cual las fases móviles son agua acidificada con ácido fosfórico (1,5 mL/L) (A) y metanol (B). El gradiente empleado es el siguiente:

<b>Tiempo (min)</b>	0	10	20	30	35	40	45	50	55	60	65	75
<b>A (%)</b>	90	70	70	60	60	50	50	40	30	0	90	90
<b>B (%)</b>	10	30	30	40	40	50	50	60	70	100	10	10

La cuantificación se realiza utilizando rectas de calibrado obtenidas a partir de los correspondientes patrones. Hidroxitirosol, oleuropeína, verbascósido, luteolina 7-glucósido, luteolina, rutina y apigenina adquiridos de Extrasynthese S.A. (Lyon Nord, Genay, France); tirosol, ácido cafeico y *p*-cumárico de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Hidroxitirosol 1-glucósido, éster de ácido cafeico unido a secologanósido y comselogósido se cuantifican usando los factores de respuesta de hidroxitirosol, ácido cafeico y *p*-cumárico respectivamente. Salidrósido y ligustrósido se cuantifican usando los factores de respuesta de tirosol. Los compuestos hidroxitirosol 4-glucósido y HyEDA se obtienen mediante un sistema de CLAE preparativo. Se emplea como patrón interno ácido siríngico 0,2 mM en el caso de la pulpa de las aceitunas y ácido siríngico 2 mM para las salmueras. Los resultados se expresan en concentración mM.

### 3.11. Análisis de compuestos cloroplásticos

#### 3.11.1. Preparación de la muestra

La extracción de compuestos cloroplásticos presentes en la pulpa de las aceitunas se realiza mediante la metodología propuesta por Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989), ligeramente modificada por Gandul-Rojas y cols. (2012).

Se pesan 10 g de pulpa de una muestra representativa de 15-20 aceitunas a los que se le añaden 50 mL de N, N-dimetilformamida (N, N-DMF) saturada con  $MgCO_3$ . La mezcla se tritura y homogeneiza con ayuda de un homogeneizador-triturador (IKA-T25, S25N-18G) durante 1 minuto, y se filtra a vacío. El residuo sólido se recoge y la operación se repite hasta que el filtrado es incoloro. Los filtrados se depositan en un embudo de decantación y se tratan con 70 mL de hexano. Se agita durante un minuto y se deja en reposo para conseguir la separación de las fases. En la fase de hexano, capa superior quedan los lípidos y carotenos, mientras que en la fase de N, N-DMF se retienen las clorofilas y xantofilas. Esta operación se repite 3 veces.

La fase de N, N-DMF se transfiere a un embudo de decantación que contiene 400 mL de una solución de NaCl al 10 % a una temperatura de 0 °C. Se añaden 70 mL de hexano y 70 mL de éter etílico, se agita y se deja reposar hasta la separación de las fases. La fase inferior, fase acuosa, se desprecia, y la fase superior, fase orgánica, se lava varias veces con una solución acuosa de  $Na_2SO_4$  al 2 % y finalmente se filtra a través de un lecho de  $Na_2SO_4$  anhidro. La solución libre de agua, se concentra en un rotavapor hasta sequedad a una temperatura de 30 °C y el residuo seco se disuelve en 1,5 mL de acetona. Posteriormente, se centrifuga a 13000 x g durante 10 minutos, para su análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

Las fases de hexano se lavan con 50 mL de N, N-DMF y se transfieren a 100 mL de éter etílico en un embudo de decantación y se saponifican con 100 mL de una solución de KOH al 20 % (p/v) en metanol. Se agita y después de una hora se añade agua destilada para romper las fases. La fase de éter se lava hasta la neutralidad, se seca con la solución acuosa de  $Na_2SO_4$  al 2 %, se filtra a través de un lecho de  $Na_2SO_4$

anhidro, se concentra en un rotavapor hasta sequedad a una temperatura de 30 °C y el residuo seco se disuelve en acetona.

Todo el procedimiento se realiza bajo la misma intensidad de luz verde para evitar la fotooxidación de clorofilas y carotenoides.

### 3.11.2. Determinación de compuestos cloroplásticos

El  $\beta$ -caroteno se cuantifica directamente en la fase de hexano por la medida de la absorbancia a 450 nm usando un espectrofotómetro UV/Vis Hewlett Packard 8452.

El sistema cromatográfico está compuesto por un equipo HP 1100 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) que consta de una bomba cuaternaria e inyector automático y un detector de fotodiodos. La separación de pigmentos se realiza a través de una columna de acero inoxidable (20 x 4,6 mm de diámetro interno) C18 Mediterranea<sup>TM</sup> Sea, con un tamaño de partícula de 18,3  $\mu$ m (Teknokroma, Barcelona, España). El flujo es de 1,25 mL/min y el volumen de inyección 20  $\mu$ L. La detección espectrofotométrica de los pigmentos se realiza a 410, 430, 450 y 666 nm. El sistema está controlado por el programa LC HP ChemStation (Rev. A. 05. 04).

La separación se realiza usando un gradiente de elución donde las fases móviles son agua/reactivo de par de iones/metanol (1/1/8, v/v/v) (A) y metanol/acetona (1/1, v/v) (B). El reactivo de par de iones está compuesto por tetrabutilamonio 50 mM y de acetato de amonio 100 mM en agua. El esquema de gradiente usado es una modificación del de Mínguez-Mosquera y cols. (1991) como se muestra a continuación:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
8	25	75
10	25	75
11	19	81
13	14	86
15	11	89
18	10	90
21	10	90
22	8	92
22,5	6	94
23	0	100
35	0	100
40	75	25

Los pigmentos se cuantifican utilizando rectas de calibrado obtenidas a partir de patrones externos purificados de cada pigmento. Para los compuestos clorofílicos con Mg en su estructura (*a* y *b*): clorofila, derivados alomerizados de clorofila (DA), éster Mg-15<sup>2</sup>-Me-fitol-clorina e<sub>6</sub>, Mg-15<sup>2</sup>-Me-fitol-rodina g<sub>7</sub>. Los derivados clorofílicos libres de Mg (*a* y *b*): feofitina, DA, éster 15<sup>2</sup>-Me-fitol-clorina e<sub>6</sub>, 15<sup>2</sup>-Me-fitol-rodina g<sub>7</sub>, pirofeofitina, feoforbida, pirofeoforbida. Los compuestos carotenoides: luteína, β-caroteno, violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteoxantina, auroxantina, neocromo y mutatoxantina. Los análisis del fruto fresco se realizan por triplicado, y en aceitunas procesadas por cuadruplicado. Los resultados se expresan en concentración μM.

### 3.12. Determinación de la actividad enzimática en aceitunas

#### 3.12.1. Obtención del material enzimático o polvo cetónico

Se utiliza el método propuesto por Sciancalapore y Longone (1984), el cual se basa en la obtención del material enzimático triturando en frío 50 g de pulpa fresca, procedente de distintas aceitunas de una misma partida, en 100 mL de acetona con polietilenglicol al 2,5 % (p/v), a baja temperatura. La trituración se realiza con un homogeneizador-triturador Ultra-turrax (IKA-T25, S25N-18G), hasta obtener una pasta totalmente homogénea que se filtra a vacío a través de un filtro Whatman 40 de 110 mm

de diámetro acoplado a un kitasato. El precipitado se lava tres veces con 100 mL de acetona a -30 °C. Finalmente, el residuo de color blanco y pulverulento se deja secar a temperatura ambiente durante 24 horas y conserva a -40 °C hasta su uso.

### **3.12.2. Determinación de la actividad de las enzimas oxidoreductasas: PPO y POD**

#### **3.12.2.1. Obtención del extracto enzimático**

La obtención del extracto enzimático se realiza en base a la metodología propuesta por Hornero-Méndez y colbs. (2002).

Se pesan 0,5 g de polvos cetónicos y se suspenden en 20 mL de una solución tampón de fosfato sódico 100 mM, con NaCl al 5,84 %, ajustando el pH a 6,2 unidades con hidróxido sódico. La suspensión se agita durante 30 minutos a 4 °C en una cámara termostática y luego se centrifuga a 15500 x g durante 20 minutos a la misma temperatura. Se separa el sobrenadante del pellet y se divide en dos alícuotas, una se utiliza como extracto enzimático crudo y la otra como extracto enzimático desnaturalizado, después de su calentamiento en un baño a 90 °C durante 30 minutos.

#### **3.12.2.2. Condiciones de reacción para la PPO**

La evaluación de la actividad enzimática PPO se basa en el método desarrollado por Hornero-Méndez y colbs. (2002). La solución tampón utilizada es citrato sódico 100 mM, ajustada a pH 5 con hidróxido sódico y almacenada a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción está formada por 2,5 mL del sustrato 4-metilcatecol 20 mM en la solución tampón y 0,5 mL del extracto enzimático. El volumen total es de 3 mL. La reacción se inicia en el momento que se añade el extracto enzimático. El blanco contiene 2,5 mL de sustrato 4-metilcatecol 20 mM en la solución tampón y 0,5 mL de extracto enzimático desnaturalizado.

### 3.12.2.3. Condiciones de reacción para la POD

La evaluación de la actividad enzimática de la POD se desarrolla de acuerdo al método de Civello y cols. (1995). La solución tampón utilizada para la medición de la POD está formada por fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 20 mM y fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 80 mM, ajustada a pH 6 con hidróxido sódico y almacenada a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción contiene 2,7 mL de sustrato guaiacol 40 mM y peróxido de hidrógeno 26 mM en la solución tampón. Esta mezcla se incuba a una temperatura de 30 °C durante 15 minutos y, transcurrido este tiempo, se inicia la reacción por adición de 0,3 mL del extracto enzimático. El volumen total es 3 mL. El blanco contiene 2,7 mL de sustrato guaiacol 40 mM y peróxido de hidrógeno 26 mM en la solución tampón y 0,3 mL de extracto enzimático desnaturalizado.

### 3.12.2.4. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría

La reacción enzimática para ambas oxidasas, PPO y POD, se lleva a cabo en una cubeta espectrofotométrica a 25 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Kioto, Japón), con control de temperatura. La actividad enzimática se evalúa mediante la medición del incremento de la absorbancia durante el tiempo de reacción a una longitud de onda de 410 nm y 470 nm para la PPO y POD respectivamente. Las mediciones se realizan a intervalos de 5 segundos durante 10 minutos para la PPO, y a intervalos de un minuto durante 10 minutos para la POD. Todos los análisis se realizan por duplicado.

La representación de los datos obtenidos, incremento de absorbancia frente al tiempo, nos permite evaluar la actividad enzimática de ambas enzimas calculando el valor de la pendiente correspondiente a la zona inicial lineal con un valor de  $R^2 \geq 0,97$ .

Se define una unidad de actividad PPO como la cantidad de enzima necesaria para que se produzca un cambio de 0,05 unidades de Abs (410 nm)/min. Por otra parte, una unidad de actividad POD corresponde a la cantidad de enzima necesaria para que se

produzca un cambio de 0,001 unidades de Abs (470 nm)/min. Los resultados se expresan en unidad de actividad enzimática/mL de extracto enzimático (U/mL e.e.).

### **3.12.3. Determinación de la actividad de las enzimas hidrolasas: $\beta$ -glucosidasa y esterasa**

#### **3.12.3.1. Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa**

##### **3.12.3.1.1. Obtención del extracto enzimático**

Para la obtención del extracto enzimático se suspenden 0,14 g de polvos cetónicos obtenidos según el apartado 3.12.1. en 10 mL de una solución tampón de carbonato sódico 10 mM, compuesta por bicarbonato de sodio 100 mM y carbonato de sodio 100 mM, que contiene 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 % de 2-mercaptoetanol ajustado a un pH de 9,0 unidades con una solución de hidróxido sódico. La mezcla se agita durante 1 hora a 4 °C en una cámara termostática y se centrifuga a 15500 x g durante 20 minutos a la misma temperatura. Se separa el sobrenadante del pellet, se llevan hasta un pH de 5,4 unidades mediante la adición de ácido acético y se divide en dos alícuotas, una se utiliza como extracto enzimático crudo y la otra como extracto enzimático desnaturalizado, después de su calentamiento en un baño a 90 °C durante 30 minutos.

##### **3.12.3.1.2. Condiciones de reacción para la $\beta$ -glucosidasa**

La evaluación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se realiza según la metodología desarrollada por Romero-Segura y cols. (2009) con algunas modificaciones.

La mezcla de reacción está formada por 100  $\mu$ L de una solución tampón de acetato sódico 50 mM ajustada a pH 5,4 y almacenada a temperatura ambiente, que contiene 15 mM de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (*p*-NPG) como sustrato y 100  $\mu$ L de extracto enzimático. Esta mezcla se incuba durante 30 minutos a 45 °C y seguidamente la reacción se paraliza con 1 mL de una solución de carbonato sódico 500 mM. El volumen total de reacción es de 1,2 mL. El

blanco contiene 100  $\mu$ L del sustrato *p*-NPG 15 mM en la solución tampón de acetato sódico y 100  $\mu$ L de extracto enzimático desnaturalizado. Tanto la mezcla de reacción que contiene el extracto enzimático como el blanco se miden con respecto a una cubeta espectrofotométrica que contiene 1,2 mL de agua destilada.

### **3.12.3.1.3. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría**

La reacción enzimática tiene lugar en una cubeta espectrofotométrica a 45 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Kioto, Japón), con control de temperatura. La actividad enzimática se evalúa mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. Todos los análisis se llevan a cabo por duplicado.

La diferencia entre la absorbancia obtenida al emplear el extracto enzimático desnaturalizado y la obtenida al usar el extracto enzimático crudo nos permite calcular la absorbancia real de nuestra muestra.

La actividad  $\beta$ -glucosidasa se calcula frente a una curva estándar usando *p*-nitrofenol (*p*-NP) en una concentración de 0-0,3 mM. Se define una unidad de actividad  $\beta$ -glucosidasa como la cantidad de enzima necesaria para formar un  $\mu$ mol de *p*-NP por minuto. Los resultados se expresan en unidad de actividad enzimática/mL de extracto enzimático (U/mL e.e.).

### **3.12.3.2. Determinación de la actividad esterasa**

#### **3.12.3.2.1. Obtención del extracto enzimático**

El extracto enzimático se obtiene en base a las metodologías propuestas por Briante y cols. (2002) y Jemai y cols. (2009), con algunas modificaciones. Se pesan 0,25 g de polvos cetónicos obtenidos según el apartado 3.12.1. y se suspenden en 10 mL de una solución tampón de borato 10 mM que contiene 5 mM de EDTA y 1 mM de PMSF ajustada a pH 9,0 con hidróxido sódico a temperatura ambiente. La suspensión se agita durante 1 hora a 4 °C en una cámara termostática y luego se centrifuga a 15500 x g

durante 20 minutos a la misma temperatura. Se separa el sobrenadante del pellet y se divide en dos alícuotas, una se utiliza como extracto enzimático crudo y la otra como extracto enzimático desnaturalizado, después de su calentamiento en un baño a 90 °C durante 30 minutos.

### **3.12.3.2.2. Condiciones de reacción para la esterasa**

La actividad esterasa se evalúa según la metodología propuesta por Koufi y colbs. (2011). La solución tampón utilizada es Tris-HCl 9,2 mM ajustada a pH 7,5 con una solución de HCl al 37 %, y mantenida a temperatura ambiente. La mezcla de reacción está formada por 2,9 mL de tampón Tris-HCl a pH 7,5 y 50 µL de una solución 150 mM de sustrato *p*-nitrofenil acetato (Sigma Aldrich) (*p*-NPA) en etanol. La reacción se inicia por la adición de 50 µL del extracto enzimático. El volumen total es de 3 mL.

El blanco contiene 2,9 mL de la solución tampón de Tris-HCl, 50 µL de sustrato *p*-NPA en etanol y 50 µL del extracto enzimático desnaturalizado. Tanto la mezcla de reacción que contiene el extracto enzimático como el blanco se midieron con respecto a una cubeta que contenía 3 mL agua destilada.

### **3.12.3.2.3. Cuantificación de la actividad enzimática mediante espectrofotometría**

La reacción enzimática se lleva a cabo en una cubeta espectrofotométrica a 40 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Kioto, Japón), con control de temperatura. La actividad enzimática de la esterasa es evaluada mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, realizando las mediciones en intervalos de 5 segundos durante 10 minutos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La diferencia entre la absorbancia obtenida al emplear el blanco y la obtenida al usar el extracto enzimático crudo nos permite calcular la absorbancia real de nuestra muestra.

La actividad esterasa se calcula frente a una curva estándar usando *p*-NP en una concentración de 0-0,03 mM. Se define una unidad de actividad esterasa como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de *p*-NP por minuto. Los resultados se expresan en unidad de actividad enzimática/mL de extracto enzimático (U/mL e.e.).

### **3.13. Evaluación subjetiva de la calidad de las aceitunas**

El análisis lo realiza un panel de 4 expertos en aceitunas. El tamaño de muestra evaluada es de 500 g y la escala utilizada se basa en lo establecido por el COI (2004). Los frutos se clasifican en función del tamaño (mm) de la superficie dañada. Se consideran 3 grados de intensidad de daño:

- Grado A, aceitunas con manchas oscuras cuyo tamaño es inferior a  $3 \text{ mm}^2$ .
- Grado B, aceitunas con manchas oscuras cuyo tamaño oscila entre 3 y  $9 \text{ mm}^2$ .
- Grado C, aceitunas con manchas oscuras cuyo tamaño es superior a  $9 \text{ mm}^2$ .

Los resultados se expresan como porcentaje de aceitunas correspondiente a cada categoría.

### **3.14. Evaluación de la composición fenólica y actividad enzimática en fruto fresco**

#### **3.14.1. Materia prima**

Las muestras de aceitunas utilizadas pertenecen a las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca, recolectadas durante los meses de septiembre y octubre en la provincia de Sevilla en dos campañas consecutivas 2010-2011 y 2011-2012. Todas fueron partidas comerciales de diversas cooperativas y centros de recepción destinadas a su elaboración como verdes estilo español o negras estilo californiano, con un índice de madurez de 1 (color verde) de acuerdo con el método utilizado por Hermoso y cols. (2001), basado en la pigmentación extendida en el epicarpio y mesocarpio en 100 frutos procedentes de una muestra.

La nomenclatura de las muestras viene recogida en la Tabla 2. Las muestras de cada variedad se identifican con una letra correspondiente a la inicial de la variedad y un número referente al orden de recepción.

**Tabla 2.** Identificación de muestras de aceitunas frescas de cada variedad.

<i>Campaña 2010-2011</i>			<i>Campaña 2011-2012</i>		
<b>GORDAL</b>	<b>MANZANILLA</b>	<b>HOJIBLANCA</b>	<b>GORDAL</b>	<b>MANZANILLA</b>	<b>HOJIBLANCA</b>
G1	M10	H24	G1	M1	H1
G2	M12	H25	G2	M2	H2
G3	M13	H26	G3	M3	H3
G4	M15	H27	G4	M4	H4
G5	M16	H28	G5	M5	H5
G6	M17	H29		M6	H6
G7	M19	H30			
G8	M23	H31			
G9	M33	H42			
G11	M35	H43			
G18	M38	H44			
G21		H45			

### **3.14.2. Identificación de compuestos fenólicos y actividad enzimática en fruto fresco**

Todas las muestras se procesan el mismo día de llegada al laboratorio. Se analizan los compuestos fenólicos en las muestras directamente sin almacenar, siguiendo la metodología comentada en el apartado 3.10. y se prepara el material enzimático según la metodología explicada en el apartado 3.12.1. Posteriormente, se analiza la actividad enzimática de todas las muestras según los métodos específicos descritos en los apartados 3.12.2. y 3.12.3.

### **3.14.3. Influencia de la temperatura y pH sobre la actividad de las diferentes enzimas estudiadas**

Los ensayos se realizan sobre 3 extractos enzimáticos de aceitunas frescas, uno de la variedad Gordal, uno de Manzanilla y uno de Hojiblanca. Los extractos utilizados

se obtienen según la metodología específica descrita en los apartados 3.12.2.1., 3.12.3.1.1. y 3.12.3.2.1.

Se emplean diferentes soluciones tampones para ajustar el valor del pH de los extractos. En el caso de las oxidasas se utiliza una solución tampón de citrato sódico 100 mM, para los pH 4 y 5, y un tampón de fosfato sódico 100 mM para los pH 7 y 8. Respecto al efecto del pH sobre la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa y esterasa se determina con una solución tampón de ácido acético y acetato sódico trihidratado 50 mM, fosfato sódico 50 mM y Tris-HCl 9,2 mM, para los pH 4-5, 6-7 y 7,5-8, respectivamente. En todos los casos se comprueba que el pH es el adecuado o se ajusta el mismo empleando soluciones de NaOH 100 mM y HCl 100 mM.

Para el estudio de la temperatura, la evaluación de la actividad se mide en un rango de temperaturas comprendido entre 10-70 °C. En aquellas enzimas que requieren de un periodo de incubación, como es el caso de la POD y  $\beta$ -glucosidasa, se utiliza la misma temperatura durante el periodo de incubación y el de medida.

La evaluación de la actividad enzimática se realiza de la forma específica descrita en los apartados 3.12.2.4., 3.12.3.1.3. y 3.12.3.2.3. variando los valores de pH y las temperaturas de medida. Todos los ensayos se realizan por duplicado.

### **3.15. Influencia de las enzimas oxidativas en los procesos de elaboración de las aceitunas de mesa**

#### **3.15.1. Postrecolección**

##### **3.15.1.1. Efecto del “golpeado” en aceitunas sobre el contenido de compuestos fenólicos**

Se emplean aceitunas de la variedad Manzanilla recolectadas manualmente de olivos procedentes de la provincia de Sevilla y transportadas al laboratorio en menos de una hora. Se recogieron los frutos aparentemente sanos, ausentes de daños y con un color en la superficie verde-amarillento. Las aceitunas se golpean de manera controlada

arrojando los frutos desde una altura de 2,5 metros hasta un suelo de cemento para simular la recolección mecánica. Posteriormente, las aceitunas golpeadas se someten a distintos tratamientos y se le mide la composición fenólica de la pulpa de las áreas dañadas y sanas como se describe en el apartado 3.10.1.1.

### ***Experimento A***

Las aceitunas golpeadas se dejan expuestas al aire a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 0, 2, 4 y 24 horas.

### ***Experimento B***

Se colocan 100 g de frutos golpeados en contenedores cilíndricos de acero inoxidable de 250 mL de capacidad cerrados herméticamente. Se inyecta nitrógeno durante 2 minutos aproximadamente hasta alcanzar una sobrepresión de 0,2 bares. Las aceitunas se mantienen en esta atmósfera y a temperatura ambiente durante 5 horas. Posteriormente, unos contenedores se abren y los frutos se exponen durante una hora al aire y otros se someten a un calentamiento a 90 °C durante 45 minutos previo a la exposición de los mismos durante una hora al aire a temperatura ambiente.

### ***Experimento C***

Las aceitunas golpeadas se exponen al aire durante 1 y 24 horas, o se conservan bajo atmósfera de nitrógeno a una sobrepresión de 0,2 bares durante 23 horas y después se exponen durante 1 hora al aire.

### ***Experimento D***

Se realizan un par de experimentos para ver la influencia del uso de películas protectoras bajo atmósferas de N<sub>2</sub> sobre la composición fenólica.

D1) Las aceitunas golpeadas se someten a distintos tratamientos:

1. Almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno durante 23 horas.
2. Almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno durante 23 horas y exposición 1 hora al aire.
3. Inmersión de las aceitunas en la solución de Citrosol 642 al 100% durante 5 segundos previo al almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno durante 23 horas y exposición 3 horas al aire.

D2) Los frutos golpeados se tratan de distinta forma:

1. Exposición aire durante 24 horas.
3. Almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno durante 23 horas y exposición 1 hora al aire.
4. Inmersión de las aceitunas en la solución de Citrosol 642 al 100% durante 5 segundos previo al almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno durante 23 horas y exposición 3 horas al aire.

En esta ocasión, se evalúa además en las áreas dañadas y no dañadas la actividad PPO como se describe en los apartados 3.10.1.1. y 3.12.2.

### **3.15.1.2. Experiencias para la reducción de la formación de manchas oscuras debido al “golpeado” durante la recolección mecanizada en aceitunas verdes estilo español**

#### **3.15.1.2.1. Efecto de la recolección mecánica sobre la calidad de aceitunas**

Las aceitunas de la variedad Manzanilla, recolectadas mecánicamente mediante vibradores de troncos, proceden de cultivos localizados en la provincia de Sevilla durante tres campañas consecutivas, 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013. Los frutos presentan un color verde-amarillento en la superficie y se transportan a la industria en menos de 30 minutos desde su recolección. Todos los experimentos se realizan por duplicado.

### *Almacenamiento de los frutos bajo atmósferas inertes*

Se colocan 4 kg de aceitunas en cuatro contenedores herméticos de acero inoxidable de 5 L de capacidad y se inyectan los distintos gases ensayados (Carburos metálicos, Barcelona, España) durante 2 minutos hasta alcanzar una sobrepresión de 0,2 bares distintos gases:

- Nitrógeno.
- Nitrógeno con 0,01 % de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>).
- Nitrógeno con 0,05 % de SO<sub>2</sub>.
- Argón.

Los contenedores se mantienen a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente, 3,3 kg de aceitunas de cada contenedor, se trasladan a los fermentadores de polietileno correspondientes y, transcurridos 15 minutos de exposición al aire, se procesan como aceitunas verdes estilo español. Las aceitunas se cubren con 2,1 L de una solución de NaOH 2 % y se mantienen hasta que la lejía penetra 2/3 partes de la pulpa, aproximadamente 7 horas. Seguidamente, los frutos se lavan con agua de la red durante 8 horas y luego se cubren con una salmuera del 12 % en NaCl. La fermentación ácido láctica tiene lugar espontáneamente durante los meses siguientes. Como control, se emplean aceitunas que se tratan directamente con la solución de NaOH sin ningún tratamiento en atmósferas controladas. Las aceitunas permanecen en la salmuera durante 8 meses y, después de este tiempo, se mide el pH y acidez de las salmueras según el apartado 3.2. y se evalúa su calidad según la metodología descrita en el apartado 3.13.

### *Aplicación de soluciones después del almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno*

Se colocan 4 kg de aceitunas en contenedores herméticos y se someten a una atmósfera de nitrógeno durante 6 horas bajo una sobrepresión de 0,2 bares. Posteriormente los contenedores se abren y se realizan dos experimentos:

### ***Experimento A***

Las aceitunas se someten a diversos tratamientos:

1. Control, sin ningún tratamiento en atmósfera controlada.
2. Exposición al aire durante 3 minutos después de abrir el contenedor.
3. Exposición al aire durante 30 minutos después de abrir el contenedor.
4. Inmersión en una solución de ácido ascórbico al 0,5 % a 6 °C durante 1 minuto y posterior exposición al aire durante 30 minutos.

### ***Experimento B***

Las aceitunas se someten a diversos tratamientos:

1. Control, sin ningún tratamiento en atmósfera controlada.
2. Inmersión en una solución de ácido ascórbico al 0,5 % durante 1 hora.
3. Inmersión en una solución de NaOH al 0,3 % durante 1 hora.
4. Inmersión en una solución de SO<sub>2</sub> al 0,05 % durante 1 hora, obtenido a partir de metabisulfito sódico (Sigma, St. Louis, MO).

En los casos 2, 3 y 4 después de la hora de inmersión en la solución correspondiente los frutos se exponen al aire durante 15 minutos.

En los dos experimentos después de cada tratamiento, las aceitunas se preparan según la elaboración al estilo español en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Transcurridos 8 meses, se mide el pH y acidez de las salmueras según el apartado 3.2. y se evalúa su calidad según la metodología descrita en el apartado 3.13.

### ***Aplicación de soluciones previas al almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno***

Las aceitunas recolectadas mecánicamente se sumergen en distintas soluciones durante 5 segundos:

1. Agua.
2. Solución de ácido ascórbico al 0,5 %.
3. Solución de SO<sub>2</sub> al 0,05 %.
4. Solución de glicerol al 1 %.

Posteriormente, se colocan en contenedores herméticos bajo atmósfera controlada de nitrógeno (0,2 bares de sobrepresión) durante 6 horas. Seguidamente, todos los contenedores se abren y las aceitunas se dejan al aire durante 3 minutos. Finalmente, las aceitunas se preparan según la elaboración al estilo español en las mismas condiciones descritas en apartados anteriores. Además, como control se emplean aceitunas que se tratan directamente con la solución de NaOH sin ningún tratamiento en atmósferas controladas. Transcurridos 8 meses, se mide el pH y acidez de las salmueras según el apartado 3.2. y se evalúa su calidad según la metodología descrita en el apartado 3.13.

### **3.15.1.2.2. Aplicación de películas protectoras previas al almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno. Estudio sobre la calidad de la aceituna procesada como verde estilo español**

Se hacen dos experimentos distintos:

#### ***Experimento A***

Los frutos golpeados artificialmente según la metodología del apartado 3.15.1.1. se sumergen en películas protectoras durante 5 segundos y se almacenan en contenedores herméticos bajo atmósfera de nitrógeno a una sobrepresión de 0,2 bares durante 3 horas. Las películas protectoras usadas en este experimento fueron: solución con el 1 % de glicerol y varios productos comerciales de la empresa Productos Citrosol S. A. (Valencia, España), Citrosol 686 (Carnauba + Goma laca), Citrosol 680 (Carnauba + Goma laca), Citrosol 652 (Polietileno + Goma laca) y Citrosol 642 (Polietileno + Goma laca).

Seguidamente, las aceitunas se exponen al aire durante 15 minutos y, a continuación, se tratan con una solución de hidróxido sódico (NaOH) al 2 % durante 7 horas hasta que la lejía penetra 2/3 en la pulpa. Finalmente, las aceitunas son lavadas con agua de red durante 12 horas y expuestas al aire durante 15 minutos. Se evalúa la calidad de los frutos visualmente.

### ***Experimento B***

Las aceitunas de la variedad Manzanilla, recolectadas mecánicamente mediante vibradores de troncos, proceden de cultivos localizados en la provincia de Sevilla durante la campaña 2012-2013. Los frutos presentan un color verde-amarillento en la superficie y se transportan a la industria en menos de 30 minutos desde su recolección. Todos los experimentos se realizan por duplicado.

B1) Las aceitunas se someten a distintos tratamientos:

1. Sin tratamiento, colocación de las aceitunas directamente en la solución de NaOH al 2 %.
2. Exposición al aire durante 5 horas antes del tratamiento con NaOH.
3. Inmersión de los frutos en glicerol al 5 %.
4. Inmersión de los frutos en Citrosol 642 al 50 %.
5. Inmersión de los frutos en Citrosol 642 al 100 %.

Las aceitunas permanecen inmersas en estas soluciones durante 5 segundos, posteriormente, se almacenan bajo atmósferas de nitrógeno durante 5 horas y se exponen al aire durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las aceitunas se elaboran como aceitunas verdes estilo español como se describe en apartados anteriores.

B2) Este experimento se lleva a cabo con aceitunas de dos partidas distintas (A y B). Los frutos se someten a 4 tratamientos:

1. Sin tratamiento, colocación de las aceitunas directamente en la solución de NaOH.

2. Almacenados bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 horas y expuestas 15 minutos al aire.
3. Inmersión de las aceitunas en Citrosol 642 al 50 durante 5 segundos previo al almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno durante 5 horas y expuestas 15 minutos al aire.
4. Inmersión de las aceitunas en Citrosol 642 al 100 % durante 5 segundos previo al almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno durante 5 horas y expuestas 15 minutos al aire.

Las aceitunas se elaboran como aceitunas verdes estilo español de acuerdo al tratamiento indicado en experiencias anteriores.

En los dos experimentos (B1 y B2), transcurridos los 8 meses de fermentación-conservación de las aceitunas, se evalúa la calidad de los frutos según la metodología descrita en el apartado 3.13. Se determina el color y la textura de los frutos según lo descrito en los apartados 3.4. y 3.8. respectivamente.

### **3.15.2. Aceitunas verdes estilo español y aceitunas verdes naturales en salmuera**

#### **3.15.2.1. Influencia del proceso de elaboración en el color de los frutos procesados**

Se seleccionan aceitunas de la variedad Manzanilla y Hojiblanca en un estado de maduración correspondiente al color verde-amarillento en la superficie de los frutos procedentes de fincas de la provincia de Sevilla.

Se emplean fermentadores de policloruro de vinilo (PVC) de 3 L de capacidad, que contienen 1,7 kg de aceitunas y 1,2 L de salmuera. La superficie de los fermentadores se cubre con un tapón flotador que favorece un ambiente anaerobio en el que tiene lugar la fermentación por microorganismos. La experiencia se realiza por duplicado a temperatura ambiente (22-28 °C) y tiene una duración de 6 meses. Se realizan dos tipos de tratamientos:

- Aceitunas verdes estilo español: se colocan aceitunas en los fermentadores y se someten a un tratamiento alcalino con una solución de NaOH al 1,9 % (p/v) hasta que la lejía penetra 2/3 partes de la pulpa, aproximadamente 7 horas. Seguidamente, las aceitunas son lavadas con agua de la red durante 14 horas y se cubren con una salmuera al 11 % en NaCl.
- Aceitunas verdes naturales en salmuera: se colocan aceitunas en los fermentadores y se cubren con una salmuera al 10 % en NaCl y 0,4 % en ácido acético.

Se hace un seguimiento periódico durante los seis meses de la concentración de cloruro sódico, pH, acidez libre en las salmueras. Por otra parte, también se analiza la concentración de compuestos fenólicos en los líquidos de procesado (lejía, agua de lavado, salmuera). Asimismo, se analizan los pigmentos cloroplásticos en las pulpas de aceitunas, el color de los frutos y el color de los jugos.

También, se determina la actividad PPO tanto en fruto fresco de la variedad Hojiblanca como en el fruto sometido a los distintos tratamientos.

Todos los análisis se realizan siguiendo las metodologías correspondientes descritas en apartados previos de esta sección de materiales y métodos.

### **3.15.2.2. Aceitunas verdes preparadas en condiciones asépticas**

Esta experiencia se lleva a cabo con aceitunas de la variedad Manzanilla, sometidas a dos tratamientos distintos:

- a) No tratadas térmicamente.
- b) Sometidas a un tratamiento térmico de 90 °C durante 30 minutos.

Con el objeto de eliminar la interferencia de microorganismos y enzimas exógenas oxidativas procedentes de éstos, las aceitunas son preparadas en condiciones asépticas (Medina y cols., 2007). Para ello, se escogen los frutos sanos desechando

aquellos que contienen golpes, cortes o están dañados por insectos. Posteriormente, las aceitunas se lavan con agua de la red (vigorosamente al chorro e inmersión) y después se sumergen en una solución de hipoclorito sódico 100 ppm (200 mg/L de cloro activo) a 35 °C durante 15 minutos (Beuchat, 1998). Para eliminar los restos de hipoclorito, se procede a dos lavados de los frutos con agua del grifo esterilizada en autoclave.

A continuación, en cabina de flujo laminar, las aceitunas se introducen en frascos ISO de 250 mL (190 g de fruto/frasco aprox.) previamente esterilizados en autoclave. Se cubren con una salmuera estéril al 5 % en NaCl y 0,5 % en ácido acético. Los frascos se almacenan asépticamente a temperatura ambiente durante 1 mes. Posteriormente, las aceitunas se exponen al aire durante 0 y 24 horas. Todos los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

Los frascos se analizan visualmente para observar la ausencia de turbidez debido al crecimiento microbiano. Además, para confirmar la ausencia de crecimiento microbiano en las salmueras, se realizan siembras en superficie de 0,1 mL de salmuera en medio de cultivo PCA (Plate Count Agar) (Oxoid).

Se evalúa la actividad PPO en el fruto antes y después del tratamiento térmico, se determinan los parámetros de color, así como la concentración de compuestos fenólicos en la piel de los frutos expuestos al aire durante 0 y 24 horas tras un mes de almacenamiento en condiciones asépticas siguiendo las metodologías descritas en apartados previos.

### **3.15.3. Aceitunas deshidratadas**

Se emplean aceitunas negras de la variedad Manzanilla recolectadas en el mes de noviembre en una finca localizada en la provincia de Sevilla y transportadas al laboratorio en menos de 24 horas desde su recolección. Las aceitunas presentan un estado de madurez avanzado. Se realizan dos experimentos (A y B) correspondientes a dos años consecutivos de campaña (2011 y 2012).

### ***Experimento A***

Se colocan en cuatro fermentadores de PVC 3,7 kg de aceitunas con 3,3 kg de sal común uniformemente dispersa entre los frutos con una relación sal/aceitunas de 0,88. Los frutos se cubren con una capa de sal de 2-3 cm para impedir el crecimiento de hongos en la superficie. Los fermentadores se mantienen a temperatura ambiente. El agua y demás componentes solubles drenan a través de un orificio situado en la parte inferior del fermentador y son recolectados a diferentes intervalos de tiempo. Se retira un fermentador cada semana durante un mes.

### ***Experimento B***

Se colocan en tres fermentadores de PVC 3,5 kg de aceitunas con 1,4; 2,0 y 3,0 kg de sal común uniformemente dispersa entre los frutos con una relación sal/aceitunas de 0,40; 0,57 y 0,86 respectivamente. El resto de las condiciones son las mismas que las descritas en el experimento A. Los fermentadores se retiran a los 42, 47 y 48 días, según la relación sal/aceitunas de 0,86; 0,57 y 0,40, respectivamente.

Paralelamente, 3,5 kg de aceitunas se someten a un calentamiento a 90 °C durante 20 minutos, se enfrían con agua y se colocan en un fermentador al que se añaden 2 kg de sal común con una relación sal/aceitunas de 0,57. La deshidratación finaliza después de 36 días.

En ambos experimentos se estudian los parámetros físicoquímicos tales como el color, actividad de agua, humedad, pH, sal del jugo, concentración de fenoles en pulpa y líquido de drenaje de cada fermentador, la actividad PPO en pulpa de aceitunas, además del análisis microbiológico.

Todos los análisis se realizan siguiendo las metodologías correspondientes descritas en apartados previos de esta sección de materiales y métodos.

### 3.15.4. Nuevo proceso de eliminación del amargor basado en la oxidación enzimática de la oleuropeína

#### *Equipo de oxidación*

Contenedor cilíndrico de acero inoxidable cerrado herméticamente con indicador de presión (Figura 15). En el interior del contenedor se añade una pequeña cantidad de agua para evitar la resecación de los frutos durante el proceso de oxidación. Se introduce oxígeno a través de una válvula de entrada, manteniendo la válvula de salida abierta durante 5 minutos. Tras éste tiempo, la válvula de salida se cierra hasta alcanzar una sobrepresión de 0,3 bares de oxígeno. El recipiente dispone de un dispositivo automático que lo hace girar un minuto cada 3 horas para permitir la oxidación de forma homogénea en todo el fruto. El proceso de oxidación se realiza a temperatura ambiente durante 6 días.

**Figura 15.** Equipo de oxidación.



### *Experimentos con muestras a escala piloto*

Se realizan diversos experimentos:

#### *Experimento A*

Durante la campaña 2012-2013 se recolectan dos partidas de aceitunas de la variedad Manzanilla (M 1 y M 2) con un color verde-morado en la superficie del fruto. Las aceitunas se colocan en una salmuera al 9 % en NaCl y 0,4 % en ácido acético. A los 4 meses de conservación en salmuera, las aceitunas se someten al proceso de oxidación.

En la misma campaña, se seleccionan muestras de aceitunas industriales conservadas en salmueras que contienen baja concentración en cloruro sódico. Se retira la salmuera original y se les añade una salmuera blanca para que las condiciones en el equilibrio alcanzado después de 15 días sean de una concentración en NaCl al 6 % y ácido acético al 0,3 % y transcurridos estos 15 días de equilibrio se someten al proceso de oxidación. El ensayo se realiza con 5 partidas de aceitunas de la variedad Manzanilla que han estado conservadas en la industria durante 7 meses (M 3, M 4, M 5, M 6 y M 7) y 3 de la variedad Hojiblanca que han estado conservadas en fermentadores industriales durante 6 meses (H 1, H 2 y H 3).

#### *Experimento B*

Durante la campaña 2013-2014 se seleccionan nuevas partidas de aceitunas industriales que se han conservado durante un mes en una salmuera con una alta concentración en ácido acético. Se someten al proceso de oxidación 4 partidas de aceitunas de la variedad Manzanilla (A, B, C y D) y 4 partidas de la variedad Hojiblanca (E, F, G y H).

### *Experimento C*

Se recolectan aceitunas de la variedad Hojiblanca de la provincia de Sevilla durante la campaña 2013-2014 con un color en la superficie del fruto que va del verde al morado. Los frutos se colocan en 6 fermentadores de 5 L de capacidad con una salmuera que contiene el 9 % en NaCl y el 0,3 % en ácido acético a temperatura ambiente. Se oxidan 3 fermentadores al mes y se vuelven a conservar en la misma salmuera durante 1, 3 y 6 meses. De otra parte, se oxida 1 fermentador después de 1, 3 y 6 meses de conservación en salmuera.

En este último experimento, las aceitunas oxidadas se someten a un proceso de deshidratación con calor a una temperatura de 50 °C durante 2 días. Posteriormente, las aceitunas se envasan en botes de cristal. La mitad de los botes se someten a un tratamiento térmico a 80 °C durante 10 minutos. Todos los botes se conservan a temperatura ambiente durante 8 meses, tras los cuales los botes se abren y se analizan microbiológicamente como se describe en el apartado 3.9., previo al análisis de las características organolépticas por expertos en aceitunas de mesa.

En todos estos ensayos realizados de eliminación del amargor por oxidación enzimática de la oleuropeína se analizan los compuestos fenólicos de la pulpa de aceitunas antes y después de someterlas al proceso de oxidación. Se analiza la concentración de cloruro sódico, pH y acidez libre de las salmueras, así como el color de los frutos. Además, se analizan las características organolépticas de las aceitunas por expertos en aceitunas de mesa. Todas las medidas se realizan por duplicado.

### **3.16. Transformaciones de los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceitunas verdes naturales**

#### **3.16.1. Hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas de mesa**

##### **3.16.1.1. Hidrólisis química de la oleuropeína**

Se realizan dos experimentos:

### ***Experimento A***

Se prepara una solución con oleuropeína comercial (Sigma Aldrich) a una concentración 5 mM y a distintas concentraciones en cloruro sódico y ácido acético:

- Solución A: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético.
- Solución B: 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético.

Ambas soluciones se distribuyen en viales herméticamente cerrados, y se les inyecta nitrógeno durante 10-15 minutos reemplazando al oxígeno del interior para evitar la oxidación de la oleuropeína. Los viales se almacenan a tres temperaturas distintas: 10 °C, T<sup>a</sup> ambiente (21±2 °C) y 40 °C. Se analiza la composición de fenoles a los 1,5; 3 y 5 meses conforme al apartado 3.10. Los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

### ***Experimento B***

Se utiliza una salmuera de aceitunas asépticas después de 15 días de conservación con una concentración de oleuropeína de 4,7 mM, una concentración de NaCl del 3,4 %, ácido acético del 0,33 % y un valor de pH de 3,9 unidades.

B1) La salmuera se filtra a través de un filtro de nylon de 0,20 µm y se distribuye en viales que se conservan a 3 temperaturas distintas (10 °C, T<sup>a</sup> ambiente (22±2 °C) y 40 °C).

B2) La salmuera inicial filtrada se le ajusta el pH a distintos valores: 3,5; 3,8; 3,9 y 4,3 empleando solución es de NaOH y HCl.

Los viales se cierran herméticamente y se les inyectan nitrógeno durante 10-15 minutos como en el experimento anterior. Los viales se conservan a temperatura ambiente.

En ambos experimentos, los viales se retiran al mes y a 2 meses para el análisis de los compuestos fenólicos como se describe en el apartado 3.10. Todos los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

### **3.16.1.2. Hidrólisis enzimática de la oleuropeína**

#### **3.16.1.2.1. Experiencias para demostrar la participación de enzimas endógenas en la hidrólisis de la oleuropeína durante el almacenamiento de los frutos en salmuera**

Las aceitunas se recolectan manualmente y presentan un color verde-amarillento en la superficie del fruto.

Con objeto de eliminar la interacción microbiana, en los experimentos se emplean frascos ISO de 250 mL de capacidad previamente esterilizados donde se colocan aceitunas preparadas en condiciones asépticas tal y como se describe en el apartado 3.15.2.2. La salmuera estéril empleada para su conservación tiene una concentración de NaCl del 5 % y ácido acético del 0,5 %.

Se realizan dos experimentos distintos:

#### ***Experimento A***

Las aceitunas de la variedad Hojiblanca recolectadas durante la campaña 2011-2012 y conservadas en salmuera se someten a distintos tratamientos:

- 1) Aceitunas no tratadas en condiciones asépticas (N), los frascos permiten una entrada y salida de aire a través del tapón.
- 2) Aceitunas preparadas asépticamente (T), los frascos están cerrados herméticamente.
- 3) Aceitunas sometidas a un tratamiento térmico a 90 °C durante 10 minutos antes de conservarse como T (C).

En todos los casos se realiza una conservación a temperatura ambiente durante 6 meses. Los frascos se retiran para la toma de muestra a los 1, 2, 4 y 6 meses.

### ***Experimento B***

Las aceitunas de la variedad Manzanilla recolectadas durante la campaña 2012-2013 y conservadas en salmuera se someten a distintos tratamientos:

- 1) Aceitunas sin tratamiento térmico.
- 2) Aceitunas sometidas a un tratamiento térmico a 60 °C durante 10 minutos.
- 3) Aceitunas sometidas a un tratamiento térmico a 90 °C durante 30 minutos.

Los frascos se almacenan a temperatura ambiente durante 2 meses.

En ambos experimentos y en cada punto, se analizan los compuestos fenólicos de las salmueras y de la pulpa de las aceitunas. Además, se analiza la concentración de cloruro sódico, acidez libre y pH de salmueras, así como el pH y color superficial de los frutos como se describe en apartados anteriores. Se hace un análisis microbiológico de las salmueras en medio PCA conforme a lo descrito en el apartado 3.15.2.2. Todos los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

Paralelamente a estos experimentos se realiza un ensayo con aceitunas frescas procedentes de dos campañas, de las variedades Manzanilla, Hojiblanca y Gordal durante la campaña 2011-2012, y Manzanilla y Hojiblanca durante el 2012-2013 para comprobar el efecto de los tratamientos térmicos sobre la composición fenólica antes de conservarse los frutos en salmuera. Durante la primera campaña, las aceitunas se someten a un calentamiento de 60 °C/15 minutos, mientras que en la segunda campaña el calentamiento se realiza a 90 °C/30 minutos. Como control, se definen los frutos no sometidos a tratamientos térmicos.

Una vez realizados los tratamientos térmicos se analiza de inmediato la composición fenólica de los frutos, tanto los controles como los tratados térmicamente. No existe etapa de colocación en salmuera en este experimento.

### **3.16.1.2.2. Factores que intervienen en la hidrólisis enzimática de las aceitunas no tratadas con NaOH**

#### ***Temperatura***

##### ***a) Estabilidad térmica de la $\beta$ -glucosidasa y esterasa en sistemas modelo***

La evaluación de la estabilidad térmica de la  $\beta$ -glucosidasa se realiza sobre un extracto enzimático de aceituna de la variedad Manzanilla y para la esterasa con un extracto de la variedad Gordal, obtenidos según el apartado 3.12.3.1.1. y 3.12.3.2.1., respectivamente. El pH de ambos extractos enzimáticos se ajusta a 5 unidades con ácido acético para simular las condiciones en las que se encuentran estas enzimas en la pulpa de las aceitunas. El extracto enzimático se divide en varias alícuotas y se incuban a distintas temperaturas: 10, 20, 30 y 40 °C durante distintos intervalos de tiempo.

La actividad enzimática se determina conforme a los apartados 3.12.3.1.3. y 3.12.3.2.3. Los experimentos se realizan por duplicado.

##### ***b) Influencia de la temperatura sobre la actividad hidrolasa de aceitunas conservadas en condiciones asépticas***

#### ***Experimento A***

Se colocan en frascos ISO de 250 mL de capacidad aceitunas de la variedad Manzanilla de la campaña 2011-2012 preparadas en condiciones asépticas y conservadas con dos salmueras distintas:

- A) Salmuera al 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético.
- B) Salmuera al 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético.

Los frascos se conservan a cuatro temperaturas: 10, 20, 30 y 40 °C durante 8 meses.

Del mismo modo se conservan con las mismas salmueras descritas dos nuevas partidas de aceitunas Manzanilla (partida 1 y 2), a las dos temperaturas extremas, 10 y 40 °C durante 10 días.

En ambos casos, se analiza la concentración de los compuestos fenólicos en pulpa conforme al apartado 3.10. Todos los experimentos se realizan por duplicado.

### ***Experimento B***

Aceitunas de la variedad Manzanilla correspondientes a la campaña 2013-2014 preparadas en condiciones asépticas se conservan en una salmuera al 6 % en cloruro sódico y 0,6 % en ácido acético. Los frascos se conservan a dos temperaturas 10 y 40 °C durante 1,5 meses.

Se estudia la evolución de los compuestos fenólicos en la pulpa de las aceitunas, así como la actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, conforme a los apartados 3.10. y 3.12.3., respectivamente. En ambos experimentos y en cada punto, se analizan los compuestos fenólicos de las salmueras y de la pulpa de las aceitunas. Además, se analiza la concentración de cloruro sódico, acidez libre y pH de salmueras, así como el pH y color superficial de los frutos como se describe en apartados anteriores. Se hace un análisis microbiológico de las salmueras en medio PCA conforme a lo descrito en el apartado 3.15.2.2.

Todos los experimentos se realizan por duplicado

### ***c) Efecto de la congelación***

Dos partidas de aceitunas Manzanilla y Hojiblanca, se someten a un tratamiento térmico de 60 °C/15 minutos. Posteriormente, tanto aceitunas tratadas térmicamente como no tratadas (control) se congelan a -30 °C y -80 °C durante tres meses. Transcurrido ese tiempo se determina la concentración de compuestos fenólicos en los frutos según la metodología descrita en el apartado 3.10.

***Características químicas: sal, pH y acidez***

***a) Estudio de la velocidad de penetración de la sal y el ácido en la pulpa de las aceitunas***

Se colocan aceitunas de la variedad Manzanilla en frascos ISO de 100 mL de capacidad en una salmuera al 6 % en NaCl y 0,6 % en ácido acético. Los frascos se almacenan a 10 °C. Se realiza el análisis de la concentración de cloruro sódico y ácido acético, y el pH tanto en la salmuera como en el jugo de las aceitunas, conforme a los apartados 3.1., 3.3. y 3.2., respectivamente. Los análisis se llevan a cabo por duplicado a lo largo de un mes de almacenamiento.

***b) Estudio en soluciones modelo de la influencia de sal y acidez sobre la estabilidad de las hidrolasas***

La evaluación de la estabilidad de las hidrolasas en función de la concentración de NaCl y ácido acético se realiza sobre un extracto enzimático de aceitunas de la variedad Manzanilla para la  $\beta$ -glucosidasa y con un extracto de la variedad Gordal para la esterasa, obtenidos según el apartado 3.12.3.1.1. y 3.12.3.2.1., respectivamente. A los extractos enzimáticos obtenidos, se añade el 3 % de NaCl, 0,3 % de ácido acético y se ajusta el pH hasta 4,2 unidades con HCl. Los extractos se incuban a 10 °C, durante distinto tiempo.

La actividad enzimática se determina conforme a los apartados 3.12.3.1.3. y 3.12.3.2.3. Los experimentos se realizan por duplicado.

***c) Influencia de las características químicas sobre la hidrólisis de oleuropeína en frutos almacenados en condiciones asépticas***

Aceitunas de las variedades Manzanilla, Hojiblanca y Gordal correspondientes a la campaña 2012-2013 se conservan en salmuera y en condiciones asépticas.

Para la variedad Hojiblanca se realiza un diseño factorial  $2^2$  en el que se estudia el efecto de la concentración de cloruro sódico y ácido acético sobre la concentración de compuestos fenólicos presentes en las aceitunas. Las concentraciones de NaCl utilizadas son el 6 % y 14 %, mientras que las de ácido acético son el 0,2 % y 1,6 %.

Las aceitunas de las variedades Manzanilla y Gordal sólo se conservan con las salmueras extremas: 6 % de en NaCl y 0,2 % en ácido acético; y 14 % de en NaCl y 1,6 % en ácido acético.

Los frascos se cierran herméticamente y se conservan a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 8 meses. Se analiza la evolución de los compuestos fenólicos de las salmueras y pulpa de aceitunas conforme al apartado 3.10. Asimismo, se determina la actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa según la metodología descrita en el apartado 3.12.3. Se analiza la concentración de cloruro sódico, acidez libre y pH de salmueras, así como el pH y color superficial de los frutos como se describe en apartados anteriores. Se hace un análisis microbiológico de las salmueras en medio PCA conforme a lo descrito en el apartado 3.15.2.2.

### ***Estudio de las condiciones óptimas de hidrólisis de oleuropeína durante la conservación de aceitunas verdes a escala piloto***

Se colocan en fermentadores de PVC de 5,6 kg de capacidad 3,3 kg de aceitunas de la variedad Manzanilla correspondientes a la campaña 2013-2014 no preparadas asépticamente con una salmuera al 6 % en NaCl y 0,6 % en ácido acético. Se realizan dos tratamientos:

- A) Conservación durante 15 días a una temperatura de 10 °C y seguidamente se mantienen a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C), durante 6 meses.
- B) Conservación a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C), durante 6 meses.

Paralelamente, se repite la experiencia en fermentadores de PVC con aceitunas de la variedad Hojiblanca, las cuales se conservan durante 3 meses en salmuera.

De cada fermentador se retira una pequeña cantidad de aceitunas a distintos tiempos para el análisis de compuestos fenólicos en pulpa conforme al apartado 3.10. Asimismo, se analiza la concentración de cloruro sódico, acidez libre y pH de salmueras, así como el pH y color superficial de los frutos como se describe en apartados anteriores. Todos los experimentos se realizan por duplicado.

### 3.16.2. Estudios para el diseño de un nuevo proceso de elaboración de aceitunas verdes naturales

#### 3.16.2.1. Inactivación de enzimas hidrolíticas

##### *Experimento A*

El experimento se realiza con aceitunas de la variedad Manzanilla (100 g) que se sumergen en agua a diferentes temperaturas y tiempos, y posteriormente se enfrían rápidamente en agua. Los tratamientos térmicos realizados son:

Temperatura (°C)	50	50	60	60	60	70	70	70
Tiempo (min)	15	40	5	10	15	3	5	10

A continuación, 10 de gramos de pulpa de aceitunas se trituran con 10 mL de agua destilada con ayuda de un Ultra-turrax (IKA-T25, S25N-18G). La mezcla se agita y centrifuga a 13386 x g durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. Se separa la fase acuosa y se filtra a través de un filtro de nylon de 0,20 µm de diámetro de poro.

Se analiza la concentración de compuestos fenólicos en la fase acuosa siguiendo el método descrito en el apartado 3.10.

##### *Experimento B*

Aceitunas de la variedad Manzanilla y Hojiblanca se someten a distintos tratamientos:

- Sin tratamiento térmico (Control).
- Tratadas térmicamente a 60 °C/10 minutos.
- Tratadas térmicamente a 70 °C/5 minutos.
- Tratadas térmicamente a 80 °C/5 minutos.

Una vez realizado el tratamiento térmico las aceitunas se colocan en fermentadores de 3 L de capacidad con 1,8 kg de aceitunas y 1,2 L de salmuera (5 % de NaCl y 0,5 % de ácido acético) y se inoculan a las 24 horas con un cóctel de 4 cepas de bacterias lácticas (*Lactobacillus brevis* Z17BP, *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, *Lactobacillus plantarum* ATCC 19417 y *Leuconostoc mesenteroides* LM51)

Las aceitunas se conservan durante 6 meses. Se analizan los compuestos fenólicos, ácidos, concentración de cloruro sódico, pH, acidez libre de las salmueras, así como el color y la textura de los frutos conforme a lo descrito anteriormente.

### **3.16.2.2. Estudio de la capacidad hidrolítica de las BAL sobre la molécula de oleuropeína**

#### **3.16.2.2.1. Aislamiento de cepas y mantenimiento**

Las BAL utilizadas tienen distintas procedencias (Tabla 3). Algunas cepas fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) así como de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), mientras que la mayoría de ellas fueron aisladas de diferentes fuentes, principalmente de aceitunas fermentadas de diversas variedades, localización y métodos de elaboración. Se emplea un total de 105 cepas.

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las cepas fue MRS bajo condiciones de anaerobiosis utilizando cajas de anaerobios con sobres de Anaerogen (Oxoid). Las bacterias que crecieron en MRS agar suplementado con azida sódica (0,02 %) y que dieron negativo a las pruebas de la catalasa fueron consideradas BAL.

**Tabla 3.** Relación de cepas y origen de las BAL empleadas.

CEPA	ORIGEN	CEPA	ORIGEN
BAL 1-3	Salmueras Hojiblancas naturales	ATCC 14431	Colección ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
BAL 4-9	Alpeorujo	ATCC 49445	Colección ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
BAL 10-13	Orujo	ATCC 8014	Colección ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
BAL 14-15	Agua de conservación	ATCC 8041	Colección ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )
BAL 16-17	Salmueras alcaparrones envasados	ATCC 10241	Colección ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
BAL 18-24	Salmueras envasado aceitunas verdes industria	CECT 748	Colección ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
BAL 25	Salmueras envasado aceitunas verdes deshuesadas	CECT 4023	Colección ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )
BAL 26-34	Salmueras Gordales cocidas	CECT 5138	Colección ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )
BAL 35-41	Interior Gordalillas naturales en salmuera	CECT 5138	Colección ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )
BAL 42	Salmueras Gordalillas	CNRZ 1885	Colección ( <i>Lactobacillus paraplantarum</i> )
BAL 43-46	Salmueras Gordales naturales		
BAL 47-64	Salmueras Manzanillas cocidas		
BAL 65-80	Salmueras negras naturales		
BAL 81-92	-		
BAL 93	Salmueras Hojiblancas cocidas		
BAL 94	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
BAL 95	Producto lácteo		

**3.16.2.2.2. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en soluciones modelos**

***Solución de oleuropeína comercial***

Se elabora un medio mínimo para simular las condiciones en las que se encuentran las BAL en las salmueras de aceitunas naturales. El medio mínimo está compuesto por una solución tampón a pH 4 que contiene el 41 % de ácido acético 200 mM, 9 % de acetato sódico 200 mM y 50 % de agua destilada. A esta solución tampón se le añade 0,1 % de glucosa (Panreac, Barcelona, España), 1 % de peptona bacteriológica neutralizada (Oxoid), 0,4 % de extracto de levadura (Oxoid), 5 % de NaCl (Panreac) y 0,5 % de oleuropeína (Sigma Aldrich). El medio se esteriliza mediante filtración y se distribuye en volúmenes de 250 µL en viales estériles.

Se realiza una aclimatación para el crecimiento de las cepas partiendo de caldos MRS sin cloruro sódico hasta alcanzar una concentración del 5 %. A partir de caldos incubados durante toda la noche a 30 °C, se centrifuga 1 mL de cada cultivo a 9000 g durante 5 minutos. El pellet se lava con 1 mL de una solución salina (0,9 % de NaCl), y

se centrifuga de nuevo. Por último, los pellets se resuspenden en 0,5 mL de solución salina y 10 µL de la suspensión se inocula en cada vial para obtener una concentración de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. La incubación se realiza a 32 °C durante 10 días en condiciones anaeróbicas. Se realiza una enumeración en placa para saber el número de células inoculadas inicialmente ( $N_0$ ) a los 4 y 10 días. Se analiza la concentración de oleuropeína a los 4 y 10 días como se describe en el apartado 3.10. Como control se utiliza el medio mínimo sin inocular.

Todos los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

### *Salmuera de aceitunas tratadas térmicamente*

Se utiliza una salmuera de aceitunas tratadas térmicamente y preparadas de manera aséptica a los dos meses de almacenamiento que contiene una concentración de oleuropeína de 11,36 mM. La salmuera se esteriliza a través de filtros de 0,20 µm de tamaño de poro y se distribuye en volúmenes de 250 µL en viales estériles. Del mismo modo que en el apartado anterior, se inoculan 10 µL de una suspensión de las cepas: CECT 748, BAL 64, BAL 94, BAL 80 y BAL 46 para obtener un número inicial de células de  $5,4 \times 10^7$  UFC/mL aproximadamente. Los viales se incuban a 32 °C durante 10 días. Posteriormente, se realiza una enumeración de células en placa y se analiza la concentración existente de oleuropeína conforme al apartado 3.10. Como control se utiliza salmuera sin inocular.

Todos los experimentos se llevan a cabo por duplicado.

### **3.16.2.2.3. Evolución de la oleuropeína durante la fermentación de aceitunas verdes naturales en salmuera**

#### *Experimento A*

Aceitunas de la variedad Manzanilla se colocan en fermentadores de PVC de 3 L de capacidad con 1,8 kg de fruto en una salmuera con el 10 % de NaCl y 0,3 % de ácido acético.

Se realiza un tratamiento previo a la colocación en salmuera:

- Sin tratamiento (Control en salmuera).
- Tratadas térmicamente a 60 °C/15 min.

Por otra parte, las tratadas térmicamente fueron:

- No inoculadas (Control tratado térmicamente).
- Inoculadas con CECT 748.
- Inoculadas con BAL 80.
- Inoculadas con BAL 64.
- Inoculadas con BAL 46.

### ***Experimento B***

Aceitunas de las variedades Manzanilla, Hojiblanca, Gordal y Aloreña se colocan en fermentadores de PVC de 3 L de capacidad con 1,8 kg de fruto en una salmuera con el 10 % de NaCl y 0,3 % de ácido acético.

Para cada variedad se dispone de 2 fermentadores de aceitunas en salmuera no inoculadas, y otros 2 de aceitunas que han sido tratadas térmicamente (60 °C/15 min) antes de la colocación en salmuera y, después de 7 días de conservación, inoculadas con BAL 80.

En los dos experimentos, para los fermentadores inoculados se realiza una aclimatación previa de las cepas hasta alcanza una concentración de NaCl al 5 % como se describe en el apartado 3.16.2.2.2. La inoculación de los fermentadores se realiza a los 7 días. Los fermentadores se dejan a temperatura ambiente y se analizan periódicamente su evolución microbiológica y química (concentración de cloruro sódico, pH, acidez, concentración de fenoles en salmuera y frutos, textura y color de los frutos).

Después de 6 meses de conservación las aceitunas se deshuesan y se les realiza dos lavados durante 14 horas con agua. Las aceitunas se conservan durante un mes en una salmuera nueva en la que en el equilibrio la concentración alcanzada en las aceitunas sea del 6,5 % de NaCl y el 0,6 % de ácido acético. Se realiza el análisis de las características organolépticas por expertos en aceitunas de mesa.

Todos los experimentos se realizan por duplicado.

### **3.17. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realiza mediante el software Statistical 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA). Los estadísticos calculados son las medias, desviación estándar y errores estándar. Se aplica el Test de Duncan para la comparación de las medias, con un nivel de probabilidad del 5 %. El análisis de la varianza (ANOVA) se aplica en los diseños factoriales.

## **4. Resultados y discusión**

---



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evaluación de la composición fenólica y actividad enzimática en fruto fresco

#### 4.1.1. Identificación de compuestos fenólicos en pulpa de aceitunas frescas

Las tres variedades más empleadas en España para la elaboración de aceitunas de mesa son Manzanilla, Hojiblanca y Gordal (Figura 16). Existen datos parciales de la concentración en compuestos polifenólicos de la pulpa de estas variedades (Brenes y colbs., 1993a; Bastoni y colbs., 2001; Romero y colbs., 2002b; Gutiérrez-Rosales y colbs., 2010), aunque no se conoce de forma exhaustiva la concentración total e individualizada de los mismos con un número significativo de muestras. Es decir, no solo para estas variedades sino para otras muchas se dispone en la literatura científica de datos de algunas partidas, aunque no de datos sistemáticos de varias campañas y un mínimo significativo de muestras del que se puedan extraer conclusiones generales.

En las Tablas 4, 5 y 6, se recogen las concentraciones medias de los diferentes compuestos fenólicos identificados en pulpa de aceitunas frescas de las tres variedades durante dos campañas consecutivas. Todas ellas tenían un índice de maduración 1, es el estado de maduración con el cual se recolectan los frutos destinados a las dos formas de preparación comercial más importantes en España: aceitunas verdes estilo español y negras oxidadas.

**Figura 16.** Aceitunas frescas de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca.



**Tabla 4.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) en pulpas de aceitunas frescas de la variedad Gordal durante dos campañas.

	CÓDIGO	Hidroxitirosol 1-glucósido		Hidroxitirosol 4-glucósido		Salidrósido		Ácido cafeico		Ácido <i>p</i> -cumárico		Verbascósido		Luteolina 7-glucósido		Oleuropeína	
<b>Campaña 2010-2011</b>	G1	0,16	(0,02)*	0,92	0,08	(0,01)	(0,01)	0,08	(0,01)	0,53	(0,00)	0,38	(0,08)	0,11	(0,02)	1,76	(0,11)
	G2	0,11	(0,02)	0,73	0,07	(0,00)	(0,00)	0,07	(0,00)	0,44	(0,02)	0,17	(0,00)	0,06	(0,01)	1,76	(0,01)
	G3	0,26	(0,02)	0,85	0,08	(0,01)	(0,07)	0,08	(0,01)	0,61	(0,00)	0,33	(0,06)	0,13	(0,01)	2,44	(0,08)
	G4	0,44	(0,08)	0,68	0,06	(0,00)	(0,06)	0,06	(0,00)	0,45	(0,02)	0,58	(0,03)	0,23	(0,04)	4,07	(0,34)
	G5	0,30	(0,02)	0,62	0,10	(0,01)	(0,03)	0,10	(0,01)	0,63	(0,01)	0,21	(0,06)	0,18	(0,01)	4,40	(0,07)
	G6	0,27	(0,07)	0,92	0,07	(0,02)	(0,01)	0,07	(0,02)	0,45	(0,03)	0,41	(0,04)	0,08	(0,01)	2,47	(0,51)
	G7	0,12	(0,02)	0,94	0,08	(0,01)	(0,01)	0,08	(0,01)	0,53	(0,02)	0,28	(0,04)	0,04	(0,00)	2,10	(0,08)
	G8	0,16	(0,02)	0,77	0,10	(0,01)	(0,01)	0,10	(0,01)	0,61	(0,06)	0,23	(0,02)	0,08	(0,01)	2,08	(0,12)
	G9	0,19	(0,03)	1,06	0,11	(0,01)	(0,02)	0,11	(0,01)	0,55	(0,02)	0,20	(0,02)	0,03	(0,00)	2,34	(0,10)
	G11	0,15	(0,01)	1,28	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,59	(0,08)	0,59	(0,11)	0,04	(0,01)	3,32	(0,13)
	G18	0,32	(0,06)	0,80	0,12	(0,02)	(0,01)	0,12	(0,02)	0,68	(0,08)	0,29	(0,07)	0,13	(0,02)	1,98	(0,21)
G21	0,19	(0,09)	0,63	0,11	(0,00)	(0,01)	0,11	(0,00)	0,53	(0,08)	0,28	(0,03)	0,04	(0,01)	1,72	(0,09)	
<b>Campaña 2011-2012</b>	G1	0,12	(0,01)	5,93	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	1,29	(0,81)	0,00	(0,00)	15,81	(0,84)
	G2	0,10	(0,04)	5,71	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,62	(0,21)	0,00	(0,00)	12,99	(3,43)
	G3	0,08	(0,02)	4,77	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,43	(0,15)	0,00	(0,00)	15,52	(0,58)
	G4	0,15	(0,01)	4,99	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	2,02	(1,20)	0,00	(0,00)	17,59	(3,93)
	G5	0,02	(0,03)	3,66	0,00	(0,00)	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,42	(0,09)	0,00	(0,00)	13,26	(1,74)

\* Desviación estándar de duplicados

Tabla 4. Continuación.

	CÓDIGO	Rutina	Éster de ácido cafeico unido a secologanósido	Comselogósido	Luteolina	Apigenina	Ligustrósido	FENOLES TOTALES
<b>Campaña 2010-2011</b>	G1	0,18 (0,02)*	0,04 (0,01)	0,09 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,02 (0,00)	4,43 (0,06)
	G2	0,12 (0,02)	0,04 (0,00)	0,08 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,03 (0,01)	3,73 (0,02)
	G3	0,20 (0,02)	0,05 (0,00)	0,10 (0,00)	0,03 (0,00)	0,02 (0,00)	0,03 (0,01)	5,38 (0,24)
	G4	0,25 (0,03)	0,05 (0,00)	0,11 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,11 (0,02)	7,32 (0,41)
	G5	0,28 (0,05)	0,06 (0,00)	0,11 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,06 (0,01)	7,22 (0,07)
	G6	0,20 (0,01)	0,05 (0,00)	0,07 (0,00)	0,02 (0,00)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	5,20 (0,57)
	G7	0,10 (0,01)	0,05 (0,00)	0,10 (0,01)	0,03 (0,01)	0,02 (0,00)	0,01 (0,00)	4,53 (0,15)
	G8	0,19 (0,01)	0,04 (0,01)	0,08 (0,00)	0,02 (0,00)	0,00 (0,00)	0,02 (0,01)	4,58 (0,01)
	G9	0,09 (0,00)	0,05 (0,01)	0,05 (0,00)	0,09 (0,00)	0,01 (0,00)	0,00 (0,00)	4,94 (0,32)
	G11	0,13 (0,02)	0,05 (0,00)	0,11 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,02 (0,00)	6,28 (0,28)
	G18	0,19 (0,04)	0,03 (0,00)	0,06 (0,00)	0,03 (0,00)	0,01 (0,00)	0,04 (0,02)	4,92 (0,42)
G21	0,12 (0,00)	0,05 (0,02)	0,10 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,98 (0,20)	
<b>Campaña 2011-2012</b>	G1	0,18 (0,02)	0,04 (0,01)	0,15 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,32 (0,06)	23,85 (1,35)
	G2	0,08 (0,03)	0,02 (0,00)	0,10 (0,04)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,26 (0,09)	19,88 (5,40)
	G3	0,01 (0,02)	0,04 (0,01)	0,05 (0,05)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,22 (0,03)	21,13 (0,18)
	G4	0,00 (0,00)	0,06 (0,02)	0,22 (0,04)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,35 (0,04)	25,38 (6,50)
	G5	0,00 (0,00)	0,03 (0,00)	0,10 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,25 (0,00)	17,74 (1,00)

\* Desviación estándar de duplicados

En la variedad Gordal (Tabla 4) los compuestos mayoritarios son la oleuropeína y el hidroxitirosol 4-glucósido, presentando una gran diferencia de concentraciones entre ambas campañas. Asimismo, es destacable la ausencia total de tirosol, y la ausencia en las muestras de la campaña 2011-2012 de los ácidos cafeico y *p*-cumárico, así como de luteolina 7-glucósido, luteolina, apigenina y salidrósido, hecho ya observado con anterioridad (Medina y cols., 2009). Sin embargo, es de destacar la presencia de hidroxitirosol 1-glucósido en ambas campañas que nunca se había indicado para la variedad Gordal. Los flavonoides, luteolina y apigenina, son los compuestos fenólicos que se encuentran en menor concentración.

Por otra parte, la variedad Manzanilla contiene una elevada concentración de oleuropeína (Tabla 5), y en menor medida de hidroxitirosol 4-glucósido, hidroxitirosol 1-glucósido y verbascósido, observándose una gran diferencia en las concentraciones de estos compuestos entre ambas campañas. Es interesante destacar la concentración elevada de los glucósidos de hidroxitirosol que, como se ha indicado previamente (Romero y cols., 2002a), pueden llegar a ser mayoritarios en aceitunas ya maduras con coloración negra. Ligustrósido, tirosol y salidrósido también presentan una concentración superior en esta variedad frente a Gordal y Hojiblanca.

El resto de los compuestos fenólicos evaluados tienen una concentración muy variable y siempre inferior a 1 mM. También, el ácido cafeico no se detectó en ninguna de las pulpas analizadas de esta variedad. Además, el ácido *p*-cumárico, luteolina 7-glucósido, luteolina y apigenina son compuestos no presentes en las partidas de la campaña 2011-2012. Si observamos los datos individuales, en general, podemos comprobar que es enorme la variabilidad entre partidas de aceitunas, dentro de la misma campaña, por ejemplo, tenemos una partida de Manzanilla con apenas 6,65 mM de oleuropeína (M10/2010-2011) y otra con 4 veces más concentración, 24,40 mM de oleuropeína (M12/2010-2011). Sorprendentemente y a pesar de la gran cantidad de estudios existentes sobre compuestos fenólicos en aceitunas, nunca se había llevado a cabo de forma sistemática un estudio con un número elevado de muestras, con el mismo estado de maduración y en diferentes campañas. La conclusión es que en una misma campaña nos podemos encontrar partidas de aceitunas con valores tan diferentes como 13,06 mM y 40,59 mM, hecho que repercutirá indudablemente en el proceso de elaboración de la aceituna de mesa y en el producto final obtenido.

**Tabla 5.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) en pulpas de aceitunas frescas de la variedad Manzanilla durante dos campañas.

	CÓDIGO	Hidroxitirosol 1-glucósido	Hidroxitirosol 4-glucósido	Salidrósido	Tirosol	Ácido <i>p</i> -cumárico	Verbascósido	Luteolina 7-glucósido	Oleuropeína
<b>Campaña 2010-2011</b>	M10	3,24 (0,60)*	1,72 (0,14)	0,50 (0,05)	0,10 (0,00)	0,05 (0,00)	0,22 (0,04)	0,00 (0,00)	6,65 (0,33)
	M12	8,63 (0,22)	2,65 (0,03)	1,11 (0,02)	0,25 (0,01)	0,16 (0,01)	1,93 (0,18)	0,00 (0,00)	24,40 (0,54)
	M13	6,58 (0,88)	3,98 (0,21)	0,44 (0,03)	0,18 (0,01)	0,15 (0,02)	0,72 (0,08)	0,21 (0,02)	10,93 (0,47)
	M15	7,59 (0,04)	5,90 (0,33)	0,39 (0,02)	0,20 (0,01)	0,06 (0,01)	2,88 (0,33)	0,13 (0,01)	14,32 (0,63)
	M16	7,81 (0,81)	3,99 (0,84)	0,79 (0,01)	0,16 (0,02)	0,13 (0,01)	1,91 (0,14)	0,00 (0,00)	12,59 (0,05)
	M17	8,93 (0,93)	3,31 (0,54)	0,84 (0,09)	0,17 (0,03)	0,17 (0,01)	3,16 (0,35)	0,56 (0,08)	13,59 (0,25)
	M19	6,88 (1,16)	6,15 (0,73)	0,32 (0,04)	0,19 (0,04)	0,07 (0,00)	2,92 (0,46)	0,28 (0,05)	11,48 (1,01)
	M23	2,87 (0,12)	2,15 (0,03)	0,38 (0,05)	0,00 (0,00)	0,10 (0,01)	0,43 (0,01)	0,00 (0,00)	10,60 (1,05)
	M33	1,34 (0,09)	3,02 (0,60)	0,19 (0,03)	0,11 (0,04)	0,11 (0,02)	0,54 (0,13)	0,18 (0,01)	8,11 (1,00)
	M35	1,96 (0,28)	3,79 (0,40)	0,21 (0,02)	0,13 (0,01)	0,11 (0,01)	0,82 (0,18)	0,12 (0,00)	11,23 (1,18)
M38	5,22 (0,26)	3,74 (0,38)	0,30 (0,02)	0,22 (0,02)	0,05 (0,01)	2,16 (0,25)	0,52 (0,03)	13,76 (0,39)	
<b>Campaña 2011-2012</b>	M1	1,05 (0,07)	9,61 (0,61)	0,12 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,32 (0,19)	0,00 (0,00)	48,26 (2,12)
	M2	1,69 (0,35)	13,29 (1,25)	0,19 (0,04)	0,15 (0,03)	0,00 (0,00)	1,86 (0,20)	0,00 (0,00)	38,35 (2,93)
	M3	2,91 (0,57)	10,34 (2,09)	0,27 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,15 (0,51)	0,00 (0,00)	71,55 (8,96)
	M4	1,44 (0,03)	10,50 (0,13)	0,10 (0,01)	0,10 (0,14)	0,00 (0,00)	1,72 (0,23)	0,00 (0,00)	36,15 (2,93)
	M5	1,03 (0,12)	12,28 (0,07)	0,18 (0,02)	0,12 (0,01)	0,00 (0,00)	1,61 (0,18)	0,00 (0,00)	31,65 (0,46)
	M6	0,29 (0,22)	6,13 (1,25)	0,06 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,73 (0,15)	0,00 (0,00)	38,07 (3,72)

\* Desviación estándar de duplicados

Tabla 5. Continuación.

	CÓDIGO	Rutina	Éster de ácido cafeico unido a secologanósido	Comselogósido	Luteolina	Apigenina	Ligustrósido	FENOLES TOTALES
<b>Campaña 2010-2011</b>	M10	0,15 (0,02)*	0,13 (0,01)	0,12 (0,01)	0,04 (0,00)	0,07 (0,00)	0,07 (0,06)	13,06 (0,83)
	M12	0,75 (0,00)	0,18 (0,01)	0,37 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,15 (0,01)	40,59 (0,97)
	M13	0,59 (0,00)	0,21 (0,01)	0,35 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,16 (0,01)	24,51 (0,14)
	M15	0,46 (0,04)	0,20 (0,03)	0,45 (0,03)	0,05 (0,01)	0,07 (0,01)	0,19 (0,06)	32,89 (1,50)
	M16	0,62 (0,00)	0,18 (0,01)	0,30 (0,03)	0,02 (0,00)	0,05 (0,00)	0,12 (0,01)	28,69 (1,88)
	M17	0,86 (0,06)	0,19 (0,01)	0,36 (0,04)	0,05 (0,00)	0,06 (0,01)	0,23 (0,07)	32,49 (2,32)
	M19	0,68 (0,08)	0,18 (0,02)	0,43 (0,05)	0,03 (0,00)	0,05 (0,00)	0,18 (0,05)	29,83 (3,58)
	M23	0,33 (0,01)	0,15 (0,01)	0,25 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,13 (0,05)	17,40 (0,98)
	M33	0,44 (0,07)	0,14 (0,02)	0,29 (0,05)	0,03 (0,00)	0,06 (0,00)	0,23 (0,02)	14,78 (2,04)
	M35	0,79 (0,09)	0,15 (0,02)	0,31 (0,05)	0,03 (0,00)	0,05 (0,01)	0,17 (0,04)	19,86 (2,21)
M38	0,79 (0,04)	0,11 (0,01)	0,35 (0,06)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,24 (0,03)	27,46 (1,43)	
<b>Campaña 2011-2012</b>	M1	0,00 (0,00)	0,11 (0,02)	0,35 (0,05)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,83 (0,03)	63,65 (2,55)
	M2	0,00 (0,00)	0,10 (0,02)	0,33 (0,06)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,57 (0,13)	56,54 (4,98)
	M3	0,00 (0,00)	0,17 (0,02)	0,44 (0,02)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,57 (0,15)	90,41 (12,03)
	M4	0,29 (0,02)	0,11 (0,00)	0,31 (0,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,88 (0,13)	51,60 (3,35)
	M5	0,25 (0,04)	0,17 (0,01)	0,33 (0,04)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,68 (0,04)	48,29 (0,52)
	M6	0,45 (0,05)	0,16 (0,00)	0,26 (0,04)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,73 (0,06)	46,87 (5,38)

\* Desviación estándar de duplicados

En el caso de la variedad Hojiblanca (Tabla 6) el compuesto mayoritario también fue la oleuropeína, aunque la concentración es muy similar a la del hidroxitirosol 4-glucósido, sobre todo para la campaña 2011-2012. Por tanto, para esta variedad y con aceitunas verdes poco maduras la concentración de hidroxitirosol 4-glucósido puede llegar a ser incluso superior a la de oleuropeína, lo cual no ha sido detectado para ninguna otra variedad (Bastoni y colbs., 2001; Gutiérrez-Rosales y colbs., 2010). Le siguen en importancia de concentración el verbascósido, hidroxitirosol 1-glucósido, luteolina 7-glucósido y rutina. El resto de los compuestos fenólicos se encuentran en una concentración inferior a 0,50 mM, destacando por su baja concentración los ácidos cafeico y *p*-cumárico, al igual que sus derivados, el éster de ácido cafeico unido a secologanósido y comselogósido. Al igual que en la variedad Gordal y Manzanilla, los flavonoides, luteolina y apigenina prácticamente son inexistentes.

Por consiguiente, el compuesto fenólico mayoritario identificado en todas las variedades y partidas estudiadas ha sido, tal como era de esperar por estudios previos (Amiot y colbs., 1986) el glucósido amargo oleuropeína, seguido de los derivados glucosilados de hidroxitirosol (hidroxitirosol 1-glucósido e hidroxitirosol 4-glucósido), verbáscosido y salidrósido. En menor concentración, se encuentra el tirosol, ligustrósido, los ácidos cafeico y *p*-cumárico y sus derivados (el éster del ácido cafeico unido a secologanósido y comselogósido), rutina, luteolina 7-glucósido, y los flavonoides, luteolina y apigenina.

Como se puede observar en la Figura 17, existen grandes diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos entre campañas, siendo estas concentraciones más elevadas en la campaña 2011-2012, excepto para hidroxitirosol 1-glucósido y salidrósido. Estas diferencias se pueden deber al conjunto de factores (área geográfica, irrigación, fertilización, condiciones climáticas, etc) que contribuyen a la presencia de dichas sustancias en los frutos (Gutiérrez-Rosales y colbs., 2010; García y colbs., 2014). De hecho, en la campaña 2010-2011 las precipitaciones medias en la provincia de Sevilla fueron de 932 mm mientras que en la campaña 2011-2012 fueron de 372 mm (MAGRAMA, 2014). Esta menor pluviometría justificaría una mayor concentración fenólica en los frutos de la campaña 2011-2012, tal como han afirmado algunos investigadores (Tovar y colbs., 2002).

**Tabla 6.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) en pulpas de aceitunas frescas de la variedad Hojiblanca durante dos campañas.

	CÓDIGO	Hidroxitirosol 1-glucósido		Hidroxitirosol 4-glucósido		Salidrósido		Tirosol		Ácido cafeico		Ácido <i>p</i> -cumárico		Verbascósido		Luteolina 7-glucósido	
<b>Campaña 2010-2011</b>	H24	0,47	(0,03)*	6,66	(0,69)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,04	(0,01)	0,10	(0,00)	0,23	(0,03)	0,31	(0,08)
	H25	0,99	(0,19)	7,84	(1,86)	0,30	(0,03)	0,11	(0,00)	0,05	(0,01)	0,08	(0,01)	1,72	(0,28)	0,87	(0,07)
	H26	0,91	(0,00)	5,68	(1,13)	0,33	(0,05)	0,09	(0,00)	0,00	(0,00)	0,07	(0,01)	1,86	(0,32)	0,41	(0,02)
	H27	0,90	(0,09)	6,34	(0,54)	0,19	(0,00)	0,05	(0,06)	0,00	(0,00)	0,05	(0,01)	2,86	(0,05)	0,76	(0,04)
	H28	0,62	(0,03)	4,66	(0,67)	0,29	(0,01)	0,06	(0,01)	0,03	(0,00)	0,10	(0,01)	0,77	(0,07)	0,33	(0,04)
	H29	0,82	(0,02)	4,14	(0,24)	0,23	(0,03)	0,07	(0,02)	0,02	(0,00)	0,09	(0,02)	2,95	(0,04)	0,41	(0,01)
	H30	0,79	(0,07)	3,72	(0,18)	0,25	(0,04)	0,06	(0,01)	0,03	(0,00)	0,06	(0,00)	1,74	(0,15)	0,59	(0,02)
	H31	0,54	(0,01)	4,54	(0,67)	0,27	(0,01)	0,07	(0,01)	0,03	(0,00)	0,07	(0,00)	0,96	(0,01)	0,59	(0,11)
	H42	0,72	(0,03)	7,20	(0,53)	0,25	(0,04)	0,09	(0,01)	0,00	(0,00)	0,07	(0,01)	2,34	(0,40)	0,80	(0,11)
	H43	1,01	(0,13)	6,93	(0,90)	0,29	(0,00)	0,08	(0,02)	0,03	(0,00)	0,09	(0,02)	0,89	(0,13)	0,86	(0,17)
	H44	0,78	(0,11)	6,17	(0,53)	0,26	(0,03)	0,09	(0,01)	0,00	(0,00)	0,09	(0,01)	0,80	(0,12)	0,60	(0,08)
H45	1,26	(0,15)	6,77	(1,09)	0,30	(0,04)	0,10	(0,01)	0,00	(0,00)	0,10	(0,01)	3,53	(0,70)	0,60	(0,12)	
<b>Campaña 2011-2012</b>	H1	0,21	(0,00)	16,03	(0,66)	0,12	(0,01)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	2,96	(0,48)	0,10	(0,01)
	H2	0,11	(0,01)	21,01	(0,96)	0,11	(0,01)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	1,80	(0,11)	0,06	(0,00)
	H3	0,30	(0,00)	16,32	(0,12)	0,15	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	3,26	(0,01)	0,11	(0,00)
	H4	0,20	(0,00)	21,04	(0,43)	0,15	(0,03)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	3,91	(0,34)	0,14	(0,02)
	H5	0,20	(0,01)	17,71	(0,95)	0,13	(0,02)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	3,32	(0,56)	0,09	(0,02)
	H6	0,12	(0,03)	27,78	(1,04)	0,14	(0,01)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	1,16	(0,01)	0,00	(0,00)

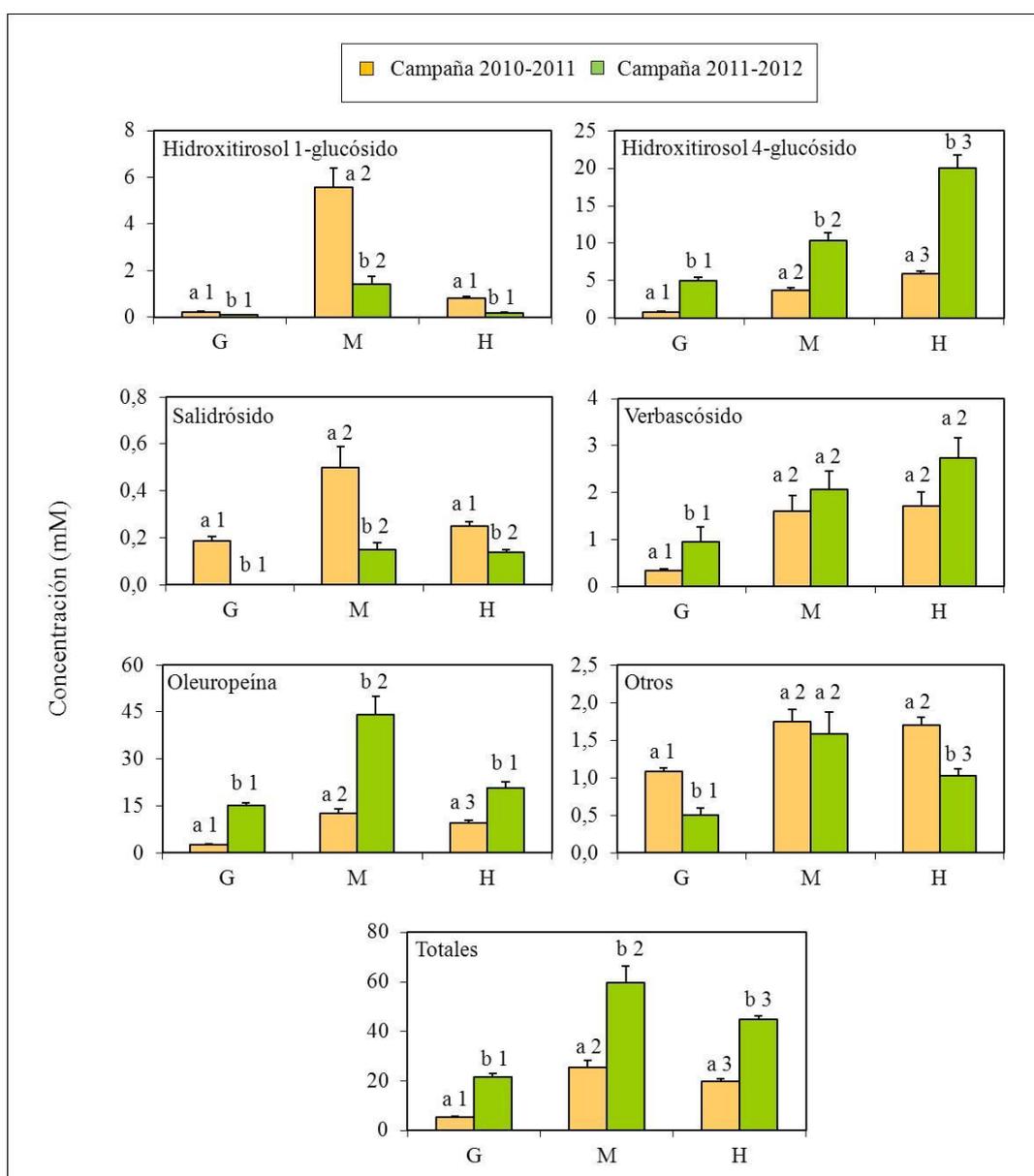
\* Desviación estándar de duplicados

Tabla 6. Continuación.

	CÓDIGO	Oleuropeína	Rutina	Éster de ácido cafeico unido a secologanósido	Comselogósido	Luteolina	Apigenina	Ligustrósido	FENOLES TOTALES
<b>Campaña 2010-2011</b>	H24	7,46 (0,16)*	0,36 (0,00)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,09 (0,01)	0,00 (0,00)	0,07 (0,06)	15,88 (0,65)
	H25	6,44 (0,77)	0,51 (0,01)	0,08 (0,02)	0,05 (0,01)	0,17 (0,02)	0,00 (0,00)	0,15 (0,01)	19,34 (3,27)
	H26	10,05 (1,35)	0,45 (0,05)	0,05 (0,00)	0,03 (0,01)	0,17 (0,01)	0,00 (0,00)	0,16 (0,01)	20,24 (2,97)
	H27	8,42 (0,70)	0,56 (0,07)	0,05 (0,00)	0,03 (0,00)	0,07 (0,01)	0,00 (0,00)	0,19 (0,06)	20,49 (0,96)
	H28	8,51 (1,17)	0,39 (0,01)	0,05 (0,01)	0,03 (0,01)	0,11 (0,00)	0,00 (0,00)	0,12 (0,01)	16,06 (1,88)
	H29	12,35 (1,46)	0,52 (0,05)	0,06 (0,01)	0,04 (0,01)	0,11 (0,02)	0,00 (0,00)	0,23 (0,07)	22,03 (1,79)
	H30	8,13 (0,99)	0,47 (0,01)	0,05 (0,00)	0,03 (0,01)	0,18 (0,04)	0,02 (0,00)	0,18 (0,05)	16,30 (1,13)
	H31	8,26 (0,30)	0,47 (0,06)	0,04 (0,01)	0,03 (0,01)	0,22 (0,04)	0,02 (0,00)	0,13 (0,05)	16,23 (1,17)
	H42	10,21 (0,85)	0,65 (0,09)	0,08 (0,01)	0,06 (0,01)	0,18 (0,02)	0,00 (0,00)	0,23 (0,02)	22,88 (1,00)
	H43	7,37 (1,01)	0,59 (0,11)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,19 (0,03)	0,03 (0,01)	0,17 (0,04)	18,61 (2,51)
	H44	15,89 (1,46)	0,52 (0,06)	0,13 (0,02)	0,09 (0,02)	0,15 (0,01)	0,00 (0,00)	0,24 (0,03)	25,79 (2,25)
	H45	11,17 (1,73)	0,55 (0,01)	0,09 (0,02)	0,09 (0,00)	0,09 (0,01)	0,00 (0,00)	0,22 (0,08)	24,86 (3,79)
<b>Campaña 2011-2012</b>	H1	25,19 (0,00)	0,59 (0,02)	0,07 (0,01)	0,05 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,48 (0,05)	45,82 (1,17)
	H2	15,20 (0,32)	0,38 (0,06)	0,05 (0,00)	0,03 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,27 (0,05)	39,01 (1,34)
	H3	21,29 (0,05)	0,54 (0,01)	0,06 (0,00)	0,03 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (0,02)	42,42 (0,06)
	H4	21,72 (0,42)	0,37 (0,06)	0,05 (0,01)	0,03 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,38 (0,04)	47,99 (1,32)
	H5	26,10 (1,78)	0,46 (0,04)	0,06 (0,02)	0,03 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,46 (0,03)	48,55 (3,37)
	H6	14,57 (2,95)	0,46 (0,10)	0,04 (0,01)	0,02 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,33 (0,08)	44,61 (4,19)

\* Desviación estándar de duplicado

**Figura 17.** Valores medios de concentración (mM) de diferentes compuestos fenólicos presentes en pulpa de aceitunas frescas de las variedades Gordal (G), Manzanilla (M) y Hojiblanca (H) evaluadas durante dos campañas 2010-2011 y 2011-2012. Las barras de error indican el error estándar. Las columnas con la misma letra para la misma variedad entre campañas no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Las columnas con el mismo número entre variedades para la misma campaña no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Otros:  $\Sigma$  concentración de tirosol, luteolina 7-glucósido, rutina, ácidos cafeico y *p*-cumárico, éster de ácido cafeico unido a secologanósido, comselogósido, luteolina, apigenina y ligustrósido.



Las aceitunas de la variedad Manzanilla mostraban la concentración más alta en compuestos fenólicos totales 25,60 mM y 59,56 mM, seguido por la variedad Hojiblanca, 19,89 mM y 44,73 mM, y por último por la variedad Gordal 5,21 mM y 21,60 mM, en las dos campañas 2010-2011 y 2011-2012 respectivamente (Ramírez y colbs., 2014a). Estas diferencias entre variedades fueron estadísticamente significativas según el test de Duncan aplicando una probabilidad del 5 %.

De otra parte, se encuentran también diferencias importantes en el contenido individualizado de estos compuestos polifenólicos para cada variedad (Figura 17). Mientras, la variedad Manzanilla destaca por una elevada concentración en oleuropeína, en la variedad Hojiblanca es más representativo el hidroxitirosol 4-glucósido, siendo estos valores significativamente distintos según el test de Duncan.

Asimismo, hay una mayor coincidencia entre las variedades Manzanilla y Hojiblanca en compuestos menos significativos como son salidrósido y verbascósido en la campaña 2011-2012, mientras que las coincidencias entre las variedades Gordal y Hojiblanca aparecen sólo en compuestos de menor concentración, hidroxitirosol 1-glucósido y salidrósido en la campaña 2010-2011, y no existe ninguna coincidencia estadística entre Gordal y Manzanilla.

Por otra parte, al igual que existe diferencia en la concentración de compuestos fenólicos entre campañas y variedades, podría también existir diferencias entre las distintas partes del fruto. Como muestra la Tabla 7, para la variedad Manzanilla, la concentración de compuestos fenólicos en la piel es más elevada que en la pulpa,  $143,27 \pm 19,40$  y  $53,72 \pm 8,37$  mM respectivamente. Estas diferencias en la concentración de fenoles en piel y pulpa también se han observado en varias partidas de aceitunas de la variedad Picual, existiendo un comportamiento similar tanto en frutos verdes como en frutos totalmente maduros (Ramírez y colbs., 2014b). Comparando los compuestos de forma individualizada destaca la alta concentración de oleuropeína que se concentra en la piel. El resto de compuestos fenólicos, hidroxitirosol 1-glucósido, hidroxitirosol 4-glucósido y salidrósido, también se encuentran en mayor concentración en la piel, mientras que solamente el verbascósido está en mayor concentración en la pulpa de las aceitunas (Ramírez y colbs., 2014a). Estos resultados pueden considerarse previsibles

ya que una de las funciones que se le atribuye a los fenoles en las plantas es la defensa frente a los rayos ultravioleta, por lo que es razonable encontrar una mayor concentración de los mismos en la piel de los frutos, pero hasta ahora nadie lo había documentado.

**Tabla 7.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) en piel y pulpa de aceitunas frescas de la variedad Manzanilla. Otros:  $\Sigma$  concentración de rutina, éster de ácido cafeico unido a secologanósido, comselogósido y ligustrósido.

COMPUESTO	PIEL	PULPA
<b>Hidroxitirosol 1-glucósido</b>	2,68 (0,10)*	0,59 (0,21)
<b>Hidroxitirosol 4-glucósido</b>	3,82 (0,75)	2,16 (0,71)
<b>Salidrósido</b>	0,23 (0,06)	0,15 (0,07)
<b>Verbascósido</b>	0,30 (0,14)	2,41 (0,42)
<b>Oleuropeína</b>	129,39 (18,43)	45,93 (8,62)
<b>Otros</b>	6,83 (1,76)	2,47 (0,23)
<b>FENOLES TOTALES</b>	<b>143,27 (19,40)</b>	<b>53,72 (8,37)</b>

\* Desviación estándar de cuadruplicados

Resumiendo, podría decirse que el compuesto fenólico mayoritario identificado en todas las variedades y partidas estudiadas ha sido el glucósido amargo oleuropeína. El perfil fenólico de las diferentes variedades evaluadas es similar cualitativa aunque no cuantitativamente, siendo muy diferente la distribución cuantitativa desde el punto de vista de los fenoles individuales. La variedad Gordal tiene una menor concentración de compuestos fenólicos seguida de la Hojiblanca, siendo la variedad Manzanilla la que tiene una concentración significativamente más elevada en las tres variedades estudiadas. Otro hecho destacable son las diferencias cuantitativas encontradas entre campañas y la variabilidad existente dentro de una misma variedad en relación a la concentración de compuestos polifenólicos.

### **4.1.2. Enzimas endógenas relacionadas con las transformaciones de la oleuropeína**

La evaluación de la actividad de las enzimas oxidasas e hidrolasas presentes en aceitunas frescas es de gran importancia para conocer su implicación sobre las transformaciones de los compuestos fenólicos en las aceitunas de mesa procesadas. Es de destacar la ausencia de estudios relevantes previos sobre la actividad de esas enzimas en un número significativo de muestras de aceitunas de mesa.

#### **4.1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas oxidasas**

En este apartado se estudia la actividad de las enzimas oxidasas en las tres variedades de aceitunas de mesa más representativas, Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Estas enzimas están implicadas en la aparición de manchas oscuras en la pulpa de las aceitunas durante el “golpeado” de los frutos en la etapa de postrecolección (Ben-Shalom y cols., 1978) y también probablemente son responsables de las diferentes coloraciones oscuras encontradas en los frutos procesados, lo cual no ha sido estudiado previamente. Los valores de actividad PPO se encuentran reflejados en la Tabla 8. Existe una alta variabilidad de la actividad PPO entre las diferentes partidas de una misma variedad durante las dos campañas. Concretamente, el rango de actividad es de 0,68-11,87 y 5,16-19,22 U/mL e.e., 0,43-7,29 y 1,70-12,36 U/mL e.e. y, 0,43-6,29 y 0,57-1,01 U/ml e.e. para las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante las campañas 2010-2011 y 2011-2012 respectivamente (Ramírez y cols., 2014a).

No obstante, esta variabilidad depende de la variedad, tal como se observa en la Figura 18. La variedad Gordal es la que presenta mayor variabilidad con un valor del error estándar de 1,28 y 2,61 U/mL e.e. para los valores medios de cada campaña, mientras que la variedad Hojiblanca es la que presenta una variabilidad menor, 0,63 y 0,06 U/mL e.e.. En general, la variedad Gordal es la que tiene una mayor actividad PPO, seguida de la Manzanilla y por último la Hojiblanca. En la segunda campaña se obtuvieron valores de actividad mayores para las variedades Gordal y Manzanilla que en la primera y al revés para la Hojiblanca. Además, los valores medios de actividad para la variedad Hojiblanca son significativamente distintos a los de la Manzanilla y Gordal según el test de Duncan.

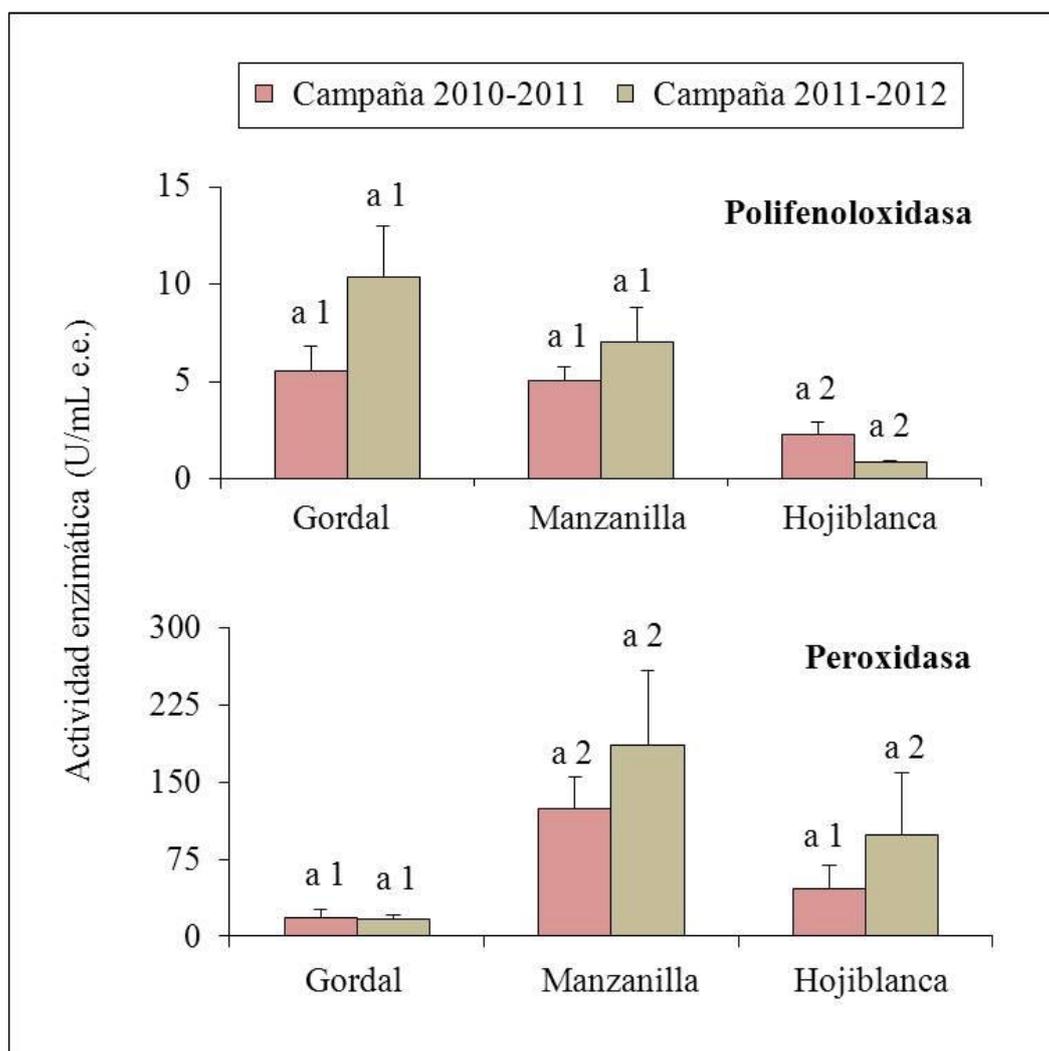
**Tabla 8.** Actividad PPO (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante dos campañas.

Campaña 2010-2011						Campaña 2011-2012											
<b>G1</b>	2,74	(0,27)*	<b>M10</b>	3,43	(0,18)	<b>H24</b>	0,51	(0,03)	<b>G1</b>	13,08	(0,03)	<b>M1</b>	2,20	(0,05)	<b>H1</b>	0,87	(0,08)
<b>G2</b>	3,17	(0,12)	<b>M12</b>	7,27	(0,12)	<b>H25</b>	0,94	(0,12)	<b>G2</b>	8,43	(0,08)	<b>M2</b>	12,36	(0,18)	<b>H2</b>	0,90	(0,40)
<b>G3</b>	4,56	(0,25)	<b>M13</b>	7,06	(0,55)	<b>H26</b>	6,29	(0,21)	<b>G3</b>	5,91	(0,05)	<b>M3</b>	6,65	(0,05)	<b>H3</b>	0,96	(0,05)
<b>G4</b>	1,43	(0,01)	<b>M15</b>	6,03	(0,49)	<b>H27</b>	6,07	(0,11)	<b>G4</b>	19,22	(0,85)	<b>M4</b>	10,43	(0,01)	<b>H4</b>	0,57	(0,10)
<b>G5</b>	0,68	(0,00)	<b>M16</b>	6,09	(0,10)	<b>H28</b>	0,43	(0,08)	<b>G5</b>	5,16	(0,16)	<b>M5</b>	1,70	(0,11)	<b>H5</b>	0,87	(0,05)
<b>G6</b>	0,76	(0,01)	<b>M17</b>	4,94	(0,02)	<b>H29</b>	4,03	(0,01)				<b>M6</b>	8,69	(0,06)	<b>H6</b>	1,01	(0,05)
<b>G7</b>	3,43	(0,08)	<b>M19</b>	7,29	(0,24)	<b>H30</b>	0,81	(0,08)									
<b>G8</b>	4,82	(0,07)	<b>M23</b>	0,43	(0,19)	<b>H31</b>	0,76	(0,01)									
<b>G9</b>	10,02	(1,10)	<b>M33</b>	2,69	(0,09)	<b>H42</b>	3,65	(0,59)									
<b>G11</b>	11,61	(0,27)	<b>M35</b>	4,73	(0,43)	<b>H43</b>	1,10	(0,11)									
<b>G18</b>	11,87	(0,05)	<b>M38</b>	5,90	(0,19)	<b>H44</b>	1,02	(0,18)									
<b>G21</b>	11,55	(0,16)				<b>H45</b>	1,55	(0,04)									

\* Desviación estándar de duplicados

Esta alta variabilidad también se ha confirmado en estudios realizados sobre diversas variedades de aceitunas italianas (De Stefano y Sciancalepore, 1993) y otras frutas como melocotones (Chang y cols., 2000).

**Figura 18.** Valores medios de actividad PPO y POD en aceitunas frescas de tres variedades, Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante dos campañas. Los valores están expresados en U/mL e.e. Las barras de error indican el error estándar. Las columnas con la misma letra para la misma variedad entre campañas no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Las columnas con el mismo número entre variedades para la misma campaña no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



En España, la variedad Hojiblanca cuando se destina a la elaboración de aceitunas de mesa se recolecta de forma mecanizada. En cambio, variedades como Manzanilla y Gordal se recogen de forma manual, ya que son más propensas al oscurecimiento en las zonas golpeadas. Algunos autores como Jiménez-Jiménez y cols. (2013) encontraron que la variedad Hojiblanca era menos susceptible al oscurecimiento aunque no dieron una explicación clara a este fenómeno. El oscurecimiento se ha relacionado directamente con la presencia de compuestos fenólicos en el fruto (Goupy y cols., 1991) y también con la actividad de las enzimas oxidativas (Sciencalepore y Longone, 1984).

El “golpeado” de los frutos durante la recolección rompe los tejidos y facilita el contacto entre los compuestos polifenólicos y las enzimas, lo que origina la oxidación y posterior polimerización de los compuestos polifenólicos que da lugar a la aparición de manchas oscuras en la piel del fruto. La variedad Hojiblanca contiene una elevada concentración de compuestos fenólicos (Figura 17) aunque es la que tiene una menor actividad PPO (Figura 18), lo cual podría explicar que esta variedad sea menos propensa a desarrollar manchas oscuras durante el golpeado de los frutos en comparación con las variedades Manzanilla y Gordal. Estas últimas tienen una elevada actividad PPO y la aparición de manchas oscuras es muy intensa durante la postrecolección de las aceitunas.

Curiosamente, el estudio llevado a cabo para analizar la actividad PPO en las diferentes partes de aceitunas de la variedad Manzanilla reveló que la pulpa de las aceitunas presenta mayor actividad PPO que la piel,  $19,46 \pm 0,40$  U/mL e.e. y  $4,32 \pm 0,10$  U/mL e.e. respectivamente. Estos datos están de acuerdo con los mostrados por otros investigadores, los cuales han indicado que en cinco variedades de melocotones es superior la actividad PPO en la pulpa frente a la encontrada en la piel (Chang y cols., 2000).

Sin lugar a duda, a pesar de ser cuatro veces menor la actividad PPO en la piel que en la pulpa de las aceitunas Manzanilla, esta actividad debe ser suficiente, siempre superior que al valor medio observado para la variedad Hojiblanca (Figura 18), y unido al hecho de contener una elevada concentración de compuestos polifenólicos en la piel

de los frutos tal como se indica en la Tabla 7, podría justificar la mayor tendencia de esta variedad a oscurecerse con el “golpeado” durante la etapa de postrecolección, frente a la variedad Hojiblanca.

Por otra parte, la otra enzima oxidativa evaluada es la POD, cuyos valores de actividad enzimática se muestran en la Tabla 9. La variabilidad de los valores en una misma variedad es muy elevada, siendo los rangos de actividad POD muy amplios, 0-99,20 y 3,33-27,17 U/mL e.e., 6,70-293,50 y 6,00-438,67 U/mL e.e., 0-254,80 y 0-378,33 U/mL e.e. para Gordal, Manzanilla y Hojiblanca y para las dos campañas respectivamente (Ramírez y colbs., 2014a).

Se puede observar que algunas partidas dentro de una misma variedad no presentan actividad POD y otras poseen una actividad 100-400 veces superior. Estas diferencias tan grandes dentro de una misma variedad pueden estar relacionadas con numerosos aspectos: el propio fruto, las condiciones agronómicas de los olivos, clima, entre otros.

El 33 % de las partidas evaluadas de la variedad Hojiblanca no presentan actividad POD. Por el contrario, el 100 % de las partidas evaluadas de la variedad Manzanilla analizadas presentan un mínimo de actividad POD.

Los valores medios reflejan que la variedad Manzanilla es la que presenta mayor actividad POD, 123,41 y 185,08 U/mL e.e. para la primera y segunda campaña respectivamente, seguida de la Hojiblanca, siendo la variedad Gordal la que presenta menor actividad (Figura 18). Además, se encuentra similitud estadística entre las tres variedades, mostrándose significativamente diferente el valor medio de actividad para la variedad Manzanilla durante la campaña 2010-2011.

No se conoce la influencia de esta enzima en el oscurecimiento de las aceitunas y únicamente existen estudios que indican una mayor concentración de esta enzima en la semilla de los frutos, siendo casi nula su concentración en la pulpa de los mismos (Luaces y colbs., 2007; García-Rodríguez y colbs., 2011). Sí se ha determinado la participación de esta enzima en la oxidación de los fenoles durante la etapa de batido en la elaboración de aceite de oliva (García-Rodríguez y colbs., 2015).

**Tabla 9.** Actividad POD (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante dos campañas.

Campaña 2010-2011						Campaña 2011-2012											
<b>G1</b>	0,00	(0,00)*	<b>M10</b>	248,50	(3,54)	<b>H24</b>	7,30	(0,94)	<b>G1</b>	3,33	(0,00)	<b>M1</b>	60,00	(3,77)	<b>H1</b>	13,67	(3,30)
<b>G2</b>	4,00	(0,00)	<b>M12</b>	293,50	(3,06)	<b>H25</b>	158,30	(14,61)	<b>G2</b>	10,83	(1,65)	<b>M2</b>	214,33	(15,56)	<b>H2</b>	43,33	(1,89)
<b>G3</b>	26,50	(1,18)	<b>M13</b>	39,50	(1,18)	<b>H26</b>	78,50	(3,54)	<b>G3</b>	16,33	(1,41)	<b>M3</b>	46,00	(0,00)	<b>H3</b>	153,33	(3,77)
<b>G4</b>	4,00	(0,47)	<b>M15</b>	181,20	(2,12)	<b>H27</b>	254,80	(2,12)	<b>G4</b>	26,00	(4,71)	<b>M4</b>	438,67	(8,49)	<b>H4</b>	0,00	(0,00)
<b>G5</b>	0,00	(0,00)	<b>M16</b>	174,80	(4,95)	<b>H28</b>	0,00	(0,00)	<b>G5</b>	27,17	(2,12)	<b>M5</b>	345,50	(5,89)	<b>H5</b>	0,00	(0,00)
<b>G6</b>	0,70	(0,00)	<b>M17</b>	202,50	(2,59)	<b>H29</b>	39,30	(1,89)				<b>M6</b>	6,00	(0,00)	<b>H6</b>	378,33	(5,66)
<b>G7</b>	5,80	(1,65)	<b>M19</b>	13,50	(0,71)	<b>H30</b>	1,70	(0,00)									
<b>G8</b>	9,00	(0,94)	<b>M23</b>	6,70	(4,71)	<b>H31</b>	0,00	(0,00)									
<b>G9</b>	7,20	(0,71)	<b>M33</b>	37,00	(5,66)	<b>H42</b>	0,00	(0,00)									
<b>G11</b>	26,50	(1,18)	<b>M35</b>	28,70	(0,47)	<b>H43</b>	2,00	(0,47)									
<b>G18</b>	99,20	(1,18)	<b>M38</b>	131,70	(2,36)	<b>H44</b>	0,00	(0,00)									
<b>G21</b>	31,20	(0,71)				<b>H45</b>	7,70	(0,94)									

\* Desviación estándar de duplicados

Por tanto, la alta actividad POD encontrada para la variedad Manzanilla podría también relacionarse con la mayor facilidad que presenta esta variedad al oscurecimiento durante el “golpeado” de los frutos durante la etapa de postrecolección.

En general, los resultados obtenidos indican que la variedad Manzanilla presenta una mayor actividad oxidasa, tanto PPO como POD. Sin embargo, la variedad Gordal presenta menor actividad POD y una actividad PPO elevada, mientras que la variedad Hojiblanca presenta menor actividad PPO que las anteriores y actividad POD moderada. En la variedad Hojiblanca encontramos menor problema de “golpeado” frente a las variedades Manzanilla y Gordal, por lo que cabe pensar que se debe a la menor actividad PPO en frutos ya que el contenido en compuestos polifenólicos es similar entre Hojiblanca y Manzanilla. Sin embargo, existen otra serie de factores que pueden influir en el oscurecimiento de los frutos como la textura de las aceitunas que como afirman De Castro y cols. (2007) es inferior en las aceitunas Manzanilla. Es decir, una mayor textura implica un menor porcentaje de rotura de tejidos en el fruto y, por tanto, menor posibilidad de reacciones oxidativas y oscurecimiento.

#### **4.1.2.2. Evaluación de la actividad de las enzimas hidrolasas**

La acción de las enzimas hidrolasas endógenas,  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, relacionadas con las transformaciones que se producen en los compuestos fenólicos de las aceitunas han sido escasamente estudiadas. Sólo existen estudios parciales sobre caracterización en el fruto fresco de algunas variedades (Briante y cols., 2002; Jemai y cols., 2009) y sobre las transformaciones producidas en los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceite de oliva (Ranalli y cols., 2003; Romero-Segura y cols., 2012). Sin embargo, no existe ningún estudio sobre su participación en las transformaciones de los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceitunas de mesa.

En la Tabla 10 se observa que los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa presentan una alta variabilidad entre distintas variedades, campañas e incluso entre partidas de una misma variedad. La variedad Gordal presenta una mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa, seguida de la Manzanilla y Hojiblanca.

**Tabla 10.** Actividad  $\beta$ -glucosidasa (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante dos campañas.

Campaña 2010-2011						Campaña 2011-2012											
<b>G1</b>	0,09	(0,02)*	<b>M10</b>	0,92	(0,00)	<b>H24</b>	0,18	(0,01)	<b>G1</b>	0,88	(0,12)	<b>M1</b>	0,49	(0,01)	<b>H1</b>	0,15	(0,02)
<b>G2</b>	0,10	(0,02)	<b>M12</b>	0,89	(0,00)	<b>H25</b>	0,30	(0,05)	<b>G2</b>	1,20	(0,16)	<b>M2</b>	0,87	(0,02)	<b>H2</b>	0,21	(0,02)
<b>G3</b>	0,21	(0,00)	<b>M13</b>	0,43	(0,00)	<b>H26</b>	0,34	(0,00)	<b>G3</b>	0,16	(0,02)	<b>M3</b>	0,84	(0,13)	<b>H3</b>	0,38	(0,03)
<b>G4</b>	0,17	(0,01)	<b>M15</b>	1,11	(0,01)	<b>H27</b>	1,57	(0,31)	<b>G4</b>	9,55	(1,62)	<b>M4</b>	0,76	(0,03)	<b>H4</b>	0,21	(0,02)
<b>G5</b>	0,09	(0,02)	<b>M16</b>	0,67	(0,06)	<b>H28</b>	0,21	(0,01)	<b>G5</b>	0,43	(0,02)	<b>M5</b>	0,92	(0,08)	<b>H5</b>	0,22	(0,00)
<b>G6</b>	0,05	(0,01)	<b>M17</b>	0,79	(0,01)	<b>H29</b>	0,28	(0,03)				<b>M6</b>	1,62	(0,07)	<b>H6</b>	0,34	(0,00)
<b>G7</b>	1,71	(0,02)	<b>M19</b>	0,90	(0,03)	<b>H30</b>	0,04	(0,00)									
<b>G8</b>	0,41	(0,06)	<b>M23</b>	0,18	(0,04)	<b>H31</b>	0,15	(0,00)									
<b>G9</b>	0,23	(0,06)	<b>M33</b>	0,46	(0,01)	<b>H42</b>	0,09	(0,03)									
<b>G11</b>	3,47	(0,34)	<b>M35</b>	0,46	(0,04)	<b>H43</b>	0,11	(0,04)									
<b>G21</b>	0,43	(0,01)	<b>M38</b>	0,97	(0,05)	<b>H44</b>	0,29	(0,07)									
						<b>H45</b>	0,13	(0,01)									

\* Desviación estándar de duplicados

Para la Gordal los valores se sitúan en un rango de 0,05-3,47 y 0,16-9,55 U/mL e.e.; 0,43-1,11 y 0,49-1,62 U/mL e.e. para la Manzanilla y 0,04-1,57 y 0,15-0,38 U/mL e.e. para la Hojiblanca durante las campañas 2010-2011 y 2011-2012, respectivamente (Ramírez y colbs., 2014a).

Estudios previos sobre la enzima  $\beta$ -glucosidasa en variedades de aceitunas destinadas a aceite de oliva no reflejaron esta variabilidad, si bien fueron estudios realizados solamente durante una campaña, procedentes de una sola finca y se llevó a cabo con pocas partidas de cada variedad (Briante y colbs., 2002; Jemai y colbs., 2009; Romero-Segura y colbs., 2009; Gutiérrez-Rosales y colbs., 2012).

Los valores medios para cada una de las variedades en las dos campañas se encuentran recogidos en la Tabla 11. Estos datos reflejan que las variedades Manzanilla y Gordal son las que presentan mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa comparadas con la Hojiblanca que es la variedad con menor actividad, no siendo estas diferencias entre variedades significativas según el test de Duncan para las dos campañas estudiadas. Asimismo, y como se ha descrito con las enzimas oxidasas, la actividad es más alta durante la segunda campaña, sobre todo para la variedad Gordal, mientras que para la Hojiblanca es similar en ambas campañas.

**Tabla 11.** Valores medios de actividad  $\beta$ -glucosidasa en pulpa de aceitunas frescas de tres variedades (Gordal, Manzanilla y Hojiblanca) durante dos campañas. Los valores están expresados como U/mL e.e. Entre paréntesis se indica el error estándar. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

	<b><math>\beta</math>-glucosidasa</b>	
	<i>2010-2011</i>	<i>2011-2012</i>
<b>Gordal</b>	0,63 (0,32) <i>a</i>	2,45 (1,79) <i>a</i>
<b>Manzanilla</b>	0,71 (0,09) <i>a</i>	0,92 (0,15) <i>a</i>
<b>Hojiblanca</b>	0,31 (0,12) <i>a</i>	0,25 (0,04) <i>a</i>

Los datos de actividad esterasa para las tres variedades de aceitunas y las dos campañas se muestran en la Tabla 12. Como se puede observar, los valores de actividad son muy bajos, existiendo un amplio número de partidas en la variedad Manzanilla y Hojiblanca que presentan actividad nula, sin embargo, la variedad Gordal presenta actividad durante las dos campañas en todas sus partidas.

La variedad Gordal es la que tiene mayor actividad esterasa durante las dos campañas, siendo los valores más elevados en la campaña 2011-2012 y significativamente distintos a los de la primera campaña estudiada según el test de Duncan (Tabla 13). Concretamente, la variedad Gordal es la que tiene mayor actividad esterasa y además contiene una menor concentración de compuestos fenólicos (Tabla 4). Un comportamiento similar ha sido observado en aceitunas de la variedad Dhokar, en las que existía una correlación entre una baja concentración de oleuropeína con una alta actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa (Jemai y cols., 2009).

Por el contrario, las variedades Manzanilla y Hojiblanca tienen altas concentraciones en compuestos fenólicos (Tablas 5 y 6) y son precisamente las que presentan menor actividad esterasa. Además, no existe diferencia significativa entre la actividad esterasa de ambas variedades, aunque sí respecto a la variedad Gordal, según el test de Duncan (Tabla 13).

Los resultados obtenidos muestran una alta variabilidad en la actividad de las enzimas oxidasas e hidrolasas en las diferentes variedades evaluadas y entre las diferentes partidas de aceitunas a pesar de presentar el mismo grado de maduración. La variedad Manzanilla presenta una mayor actividad oxidasa, tanto PPO como POD lo que sugiere que esta variedad sería más propensa a presentar daños y oscurecimiento durante la postrecolección de los frutos. Además, esta variedad es la que posee mayor concentración en compuestos fenólicos que las otras dos variedades. Con respecto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, la variedad Gordal es la que presenta mayor actividad seguida de la variedad Manzanilla, siendo menor para la variedad Hojiblanca. Finalmente, hay que resaltar la mayor actividad encontrada en general para todas estas enzimas en la campaña 2011-2012 frente a la 2010-2011, lo cual coincide también con una mayor concentración en los compuestos polifenólicos y que puede estar relacionado con la menor pluviometría de la campaña 2011-2012.

**Tabla 12.** Actividad esterasa (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca durante dos campañas.

Campaña 2010-2011						Campaña 2011-2012											
<b>G1</b>	0,94	(0,03)*	<b>M10</b>	0,05	(0,00)	<b>H24</b>	0,02	(0,01)	<b>G1</b>	2,63	(0,06)	<b>M1</b>	0,00	(0,00)	<b>H1</b>	0,00	(0,00)
<b>G2</b>	1,19	(0,01)	<b>M12</b>	0,07	(0,05)	<b>H25</b>	0,03	(0,02)	<b>G2</b>	1,68	(0,02)	<b>M2</b>	0,11	(0,01)	<b>H2</b>	0,03	(0,02)
<b>G3</b>	1,67	(0,02)	<b>M13</b>	0,00	(0,00)	<b>H26</b>	0,00	(0,00)	<b>G3</b>	1,77	(0,07)	<b>M3</b>	0,00	(0,00)	<b>H3</b>	0,05	(0,02)
<b>G4</b>	0,76	(0,05)	<b>M15</b>	0,04	(0,03)	<b>H27</b>	0,01	(0,00)	<b>G4</b>	2,07	(0,06)	<b>M4</b>	0,00	(0,00)	<b>H4</b>	0,03	(0,02)
<b>G5</b>	0,64	(0,02)	<b>M16</b>	0,11	(0,04)	<b>H28</b>	0,00	(0,00)	<b>G5</b>	1,88	(0,05)	<b>M5</b>	0,00	(0,00)	<b>H5</b>	0,02	(0,01)
<b>G6</b>	0,58	(0,00)	<b>M17</b>	0,10	(0,03)	<b>H29</b>	0,02	(0,00)				<b>M6</b>	0,00	(0,00)	<b>H6</b>	0,03	(0,01)
<b>G7</b>	1,32	(0,06)	<b>M19</b>	0,03	(0,01)	<b>H30</b>	0,00	(0,00)									
<b>G8</b>	1,04	(0,01)	<b>M23</b>	0,00	(0,00)	<b>H31</b>	0,00	(0,00)									
<b>G9</b>	0,82	(0,00)	<b>M33</b>	0,00	(0,00)	<b>H42</b>	0,05	(0,01)									
<b>G11</b>	1,56	(0,02)	<b>M35</b>	0,03	(0,02)	<b>H43</b>	0,03	(0,02)									
<b>G21</b>	2,81	(0,00)	<b>M38</b>	0,03	(0,01)	<b>H44</b>	0,03	(0,01)									
						<b>H45</b>	0,07	(0,03)									

\* Desviación estándar de triplicados

**Tabla 13.** Valores medios de actividad esterasa en pulpa de aceitunas frescas de tres variedades (Gordal, Manzanilla y Hojiblanca) durante dos campañas. Los valores están expresados como U/mL e.e. Entre paréntesis se indica el error estándar. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

	<b>Esterasa</b>	
	<i>2010-2011</i>	<i>2011-2012</i>
<b>Gordal</b>	1,21 (0,19) <i>a</i>	2,01 (0,17) <i>b</i>
<b>Manzanilla</b>	0,04 (0,01) <i>c</i>	0,02 (0,02) <i>c</i>
<b>Hojiblanca</b>	0,02 (0,01) <i>c</i>	0,03 (0,01) <i>c</i>

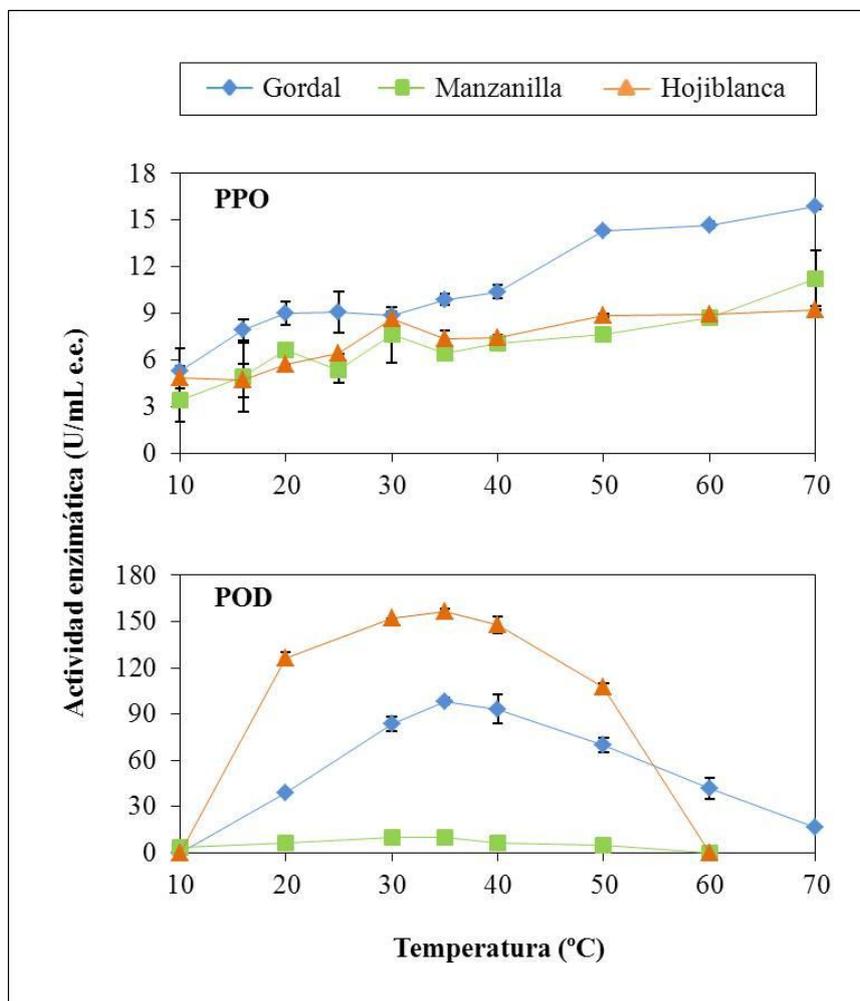
#### **4.1.3. Influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad de las diferentes enzimas estudiadas**

Existen numerosos factores que pueden afectar a la estructura conformacional de la enzima causando pérdida de su actividad. Dependiendo de la magnitud de los agentes desnaturizantes, la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria de la enzima puede verse afectada, siendo irreversible la alteración y alcanzándose una inactivación total de la enzima. Entre los factores que pueden afectar a la capacidad catalítica de la enzima se encuentra la temperatura y el pH, cuyos valores óptimos de actividad pueden variar sustancialmente de unas enzimas a otras.

En la Figura 19 se representa el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática PPO y POD en las diferentes variedades de aceitunas de mesa evaluadas. Para la PPO podemos observar que las tres variedades estudiadas tienen un comportamiento similar, aumenta la actividad enzimática con la temperatura. Estos resultados están en desacuerdo con lo afirmado por algunos autores que fijan la temperatura máxima en valores entre 30-50 °C (Ünal y colbs., 2011; Taticchi y colbs., 2013). No tenemos explicación para estos resultados. Podría pensarse que alguna reacción no enzimática de oscurecimiento tuviera lugar durante el análisis realizado a alta temperatura, aunque la actividad PPO fue calculada mediante la diferencia de

absorbancias originadas por el extracto enzimático y el extracto enzimático desnaturalizado, que actúa como control. Hay que tener en cuenta que según algunos investigadores (Gençer y colbs., 2012; Taticchi y colbs., 2013) la actividad PPO se activa rápidamente al aumentar la temperatura, y el análisis ocurre en muy pocos minutos.

**Figura 19.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de las oxidasas (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.

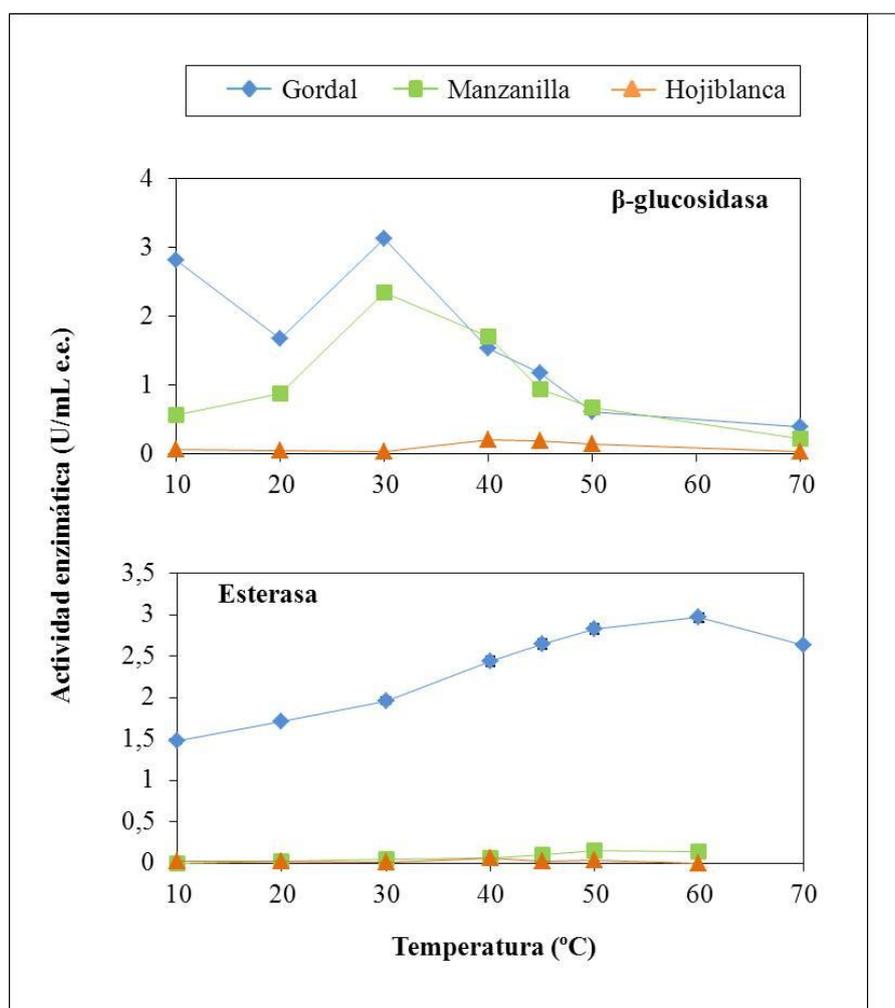


Asimismo, la actividad POD presenta un máximo de actividad en un rango de temperatura de 30-40 °C a partir del cual la enzima baja su actividad hasta llegar a valores de 0 U/mL e.e. a temperaturas superiores a los 60-70 °C, lo cual coincide con el

rango de temperatura de 30-35 °C indicado por diversos autores (Saravia y cols., 2007; Tzika y cols., 2009).

El efecto de la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa se encuentra representado en la Figura 20. La actividad en la variedad Gordal presenta dos máximos, uno situado en 10 °C y otro en 30 °C, el primer máximo es un resultado no esperado mientras que el segundo coincide con el máximo de actividad para la Manzanilla y con el de otras variedades (Kara y cols., 2011).

**Figura 20.** Efecto de la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados para la  $\beta$ -glucosidasa y de triplicados para la esterasa.



Sin embargo, en el caso de la variedad Hojiblanca, el máximo de actividad se sitúa a una temperatura más alta entre 40-45 °C, valores que coinciden con resultados encontrados para la variedad Picual (Romero-Segura y cols., 2009).

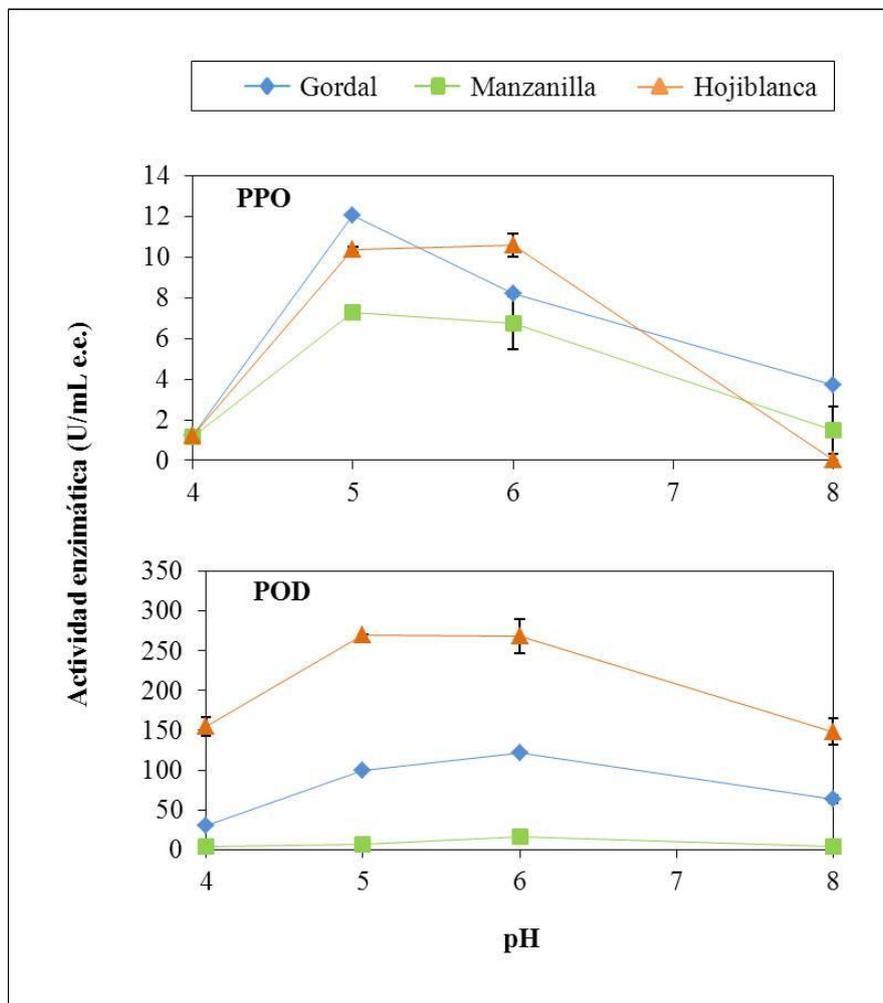
El efecto de la temperatura sobre la actividad esterasa es similar para las tres variedades estudiadas, aumenta con la temperatura alcanzando el máximo alrededor de los 50-60 °C (Figura 20). Esta temperatura es muy elevada y no es habitual durante la elaboración de aceitunas de mesa. De otra parte, no existen datos previos sobre la actividad esterasa con las cuales poder contrastar los resultados obtenidos.

En general, a medida que aumenta la temperatura aumenta la actividad enzimática hasta llegar un momento en el que comienza la desnaturalización de las enzimas con la consecuente reducción de dicha actividad.

El pH es otro factor importante que influye en la actividad enzimática. En la Figura 21 se reflejan los valores de actividad enzimática PPO y POD para las tres variedades estudiadas, Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Se puede observar que el pH óptimo para ambas enzimas se sitúa en el rango de 5-6 unidades, lo cual está de acuerdo con los resultados previamente encontrados para la PPO en la variedad Manzanilla (Segovia-Bravo y cols., 2007), y para la POD en la variedad Koroneiki (Tzika y cols., 2009).

Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el efecto del pH del medio en la actividad de las oxidasas. Mientras que unos investigadores establecen el máximo de actividad de la PPO para la variedad turca Domat a pH 4,5 (Ünal y cols., 2011), otros proponen un valor de pH de 7,5 unidades (Gençer y cols., 2012). Por otra parte, respecto a la actividad POD, algunos autores definen que su actividad es máxima a un valor de pH de 7 unidades en variedades portuguesas (Saravia y cols., 2007) o en el rango de 4-6 unidades para variedades de aceitunas griegas (Tzika y cols., 2009).

**Figura 21.** Efecto del pH sobre la actividad de las oxidasas (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



Por tanto, la máxima actividad de las enzimas oxidasas se encuentra en un rango de pH de 5-6 unidades, cercano al valor de pH que poseen las aceitunas frescas. Como podemos observar en la Tabla 14, donde se recoge el valor medio de pH de la pulpa de diferentes partidas de aceitunas de las tres variedades estudiadas, no hay diferencia entre ellas, los valores medios de pH son los mismos y se sitúan en 5 unidades. En general, el valor del pH de la pulpa de las aceitunas frescas oscila entre 4,6 y 5,2 unidades, dependiendo de la variedad y maduración de las aceitunas (Fernández y González, 1956).

**Tabla 14.** Valores medios de pH de la pulpa de distintas variedades de aceitunas frescas (12 partidas de aceitunas de la variedad Gordal; 11 partidas de Manzanilla y 12 partidas de aceitunas Hojiblanca).

<b>GORDAL</b>		<b>MANZANILLA</b>		<b>HOJIBLANCA</b>	
Valor medio	DE	Valor medio	DE	Valor medio	DE
5,0	0,1	5,0	0,1	5,0	0,1

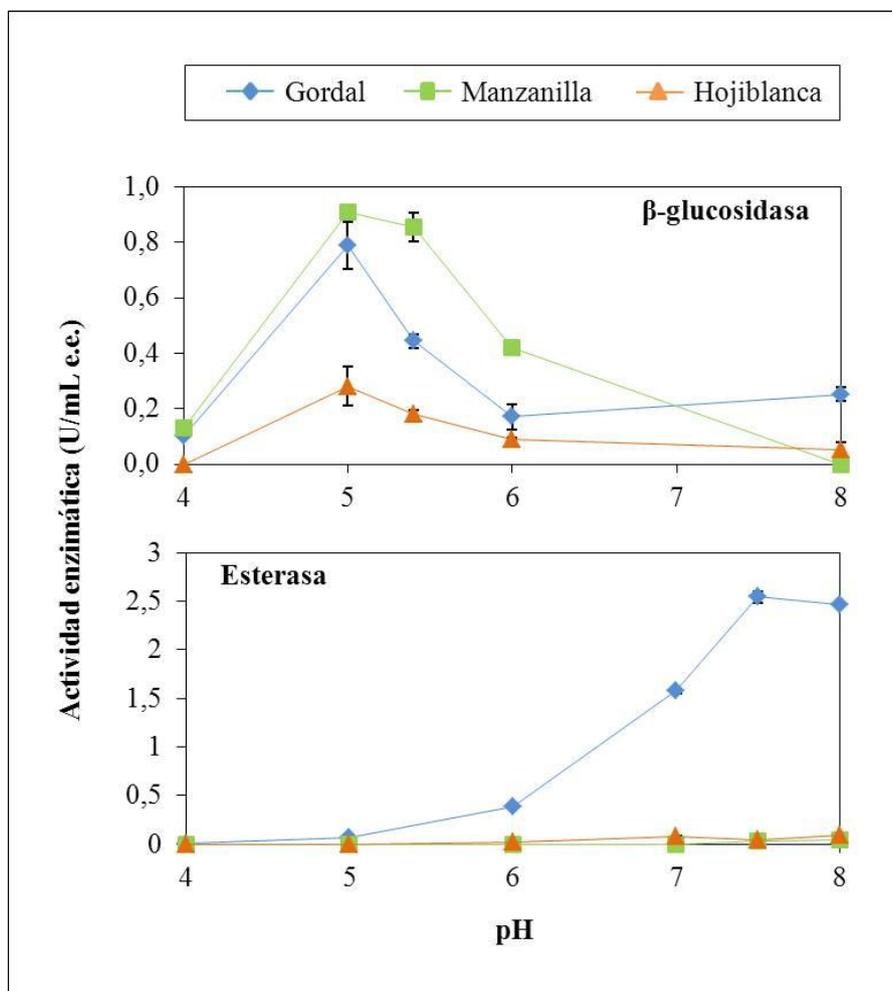
DE: Desviación estándar

La evolución de la actividad  $\beta$ -glucosidasa con respecto al pH se encuentra representada en la Figura 22. Presenta el máximo de actividad a un pH de 5 unidades, para las tres variedades estudiadas, descendiendo la misma posteriormente conforme los valores de pH aumentan, lo cual coincide con los datos aportados anteriormente por otros investigadores (Romero-Segura y colbs., 2009; Kara y colbs., 2011).

Asimismo, la actividad esterasa presenta su actividad máxima en un rango de pH de 7-8 unidades, disminuyendo conforme el pH desciende. Este comportamiento es similar para las tres variedades estudiadas. No existe en la bibliografía información sobre la influencia del pH en la actividad de las enzimas esterases endógenas de las aceitunas. Desde el punto de vista de elaboración de aceitunas de mesa, los valores de pH suelen ser inferiores a 6 unidades, por tanto estos resultados nos hacen pensar que la esterasa endógena de los frutos no estaría en las condiciones más óptimas para desarrollar su actividad durante los diferentes procesos de elaboración de aceitunas de mesa.

El conocimiento de las condiciones óptimas de temperatura y pH, dos parámetros de suma importancia en la elaboración de aceitunas de mesa, nos permitirá conocer su influencia sobre las transformaciones enzimáticas que tendrán lugar sobre la molécula de oleuropeína durante el procesamiento de las aceitunas.

**Figura 22.** Efecto del pH sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa y esterasa (U/mL e.e.) en pulpa de aceitunas frescas de Gordal, Manzanilla y Hojiblanca. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados para la  $\beta$ -glucosidasa y de triplicados para la esterasa.



## 4.2. Influencia de las enzimas oxidativas en los procesos de elaboración de las aceitunas de mesa

### 4.2.1. Postrecolección

#### 4.2.1.1. Efecto del “golpeado” en aceitunas sobre el contenido de compuestos fenólicos

El oscurecimiento de las zonas de las aceitunas que sufren golpes durante su recolección está relacionado con la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en

los frutos y dicha reacción está catalizada por enzimas oxidasas, aunque no se conoce de forma exhaustiva los cambios que se producen.

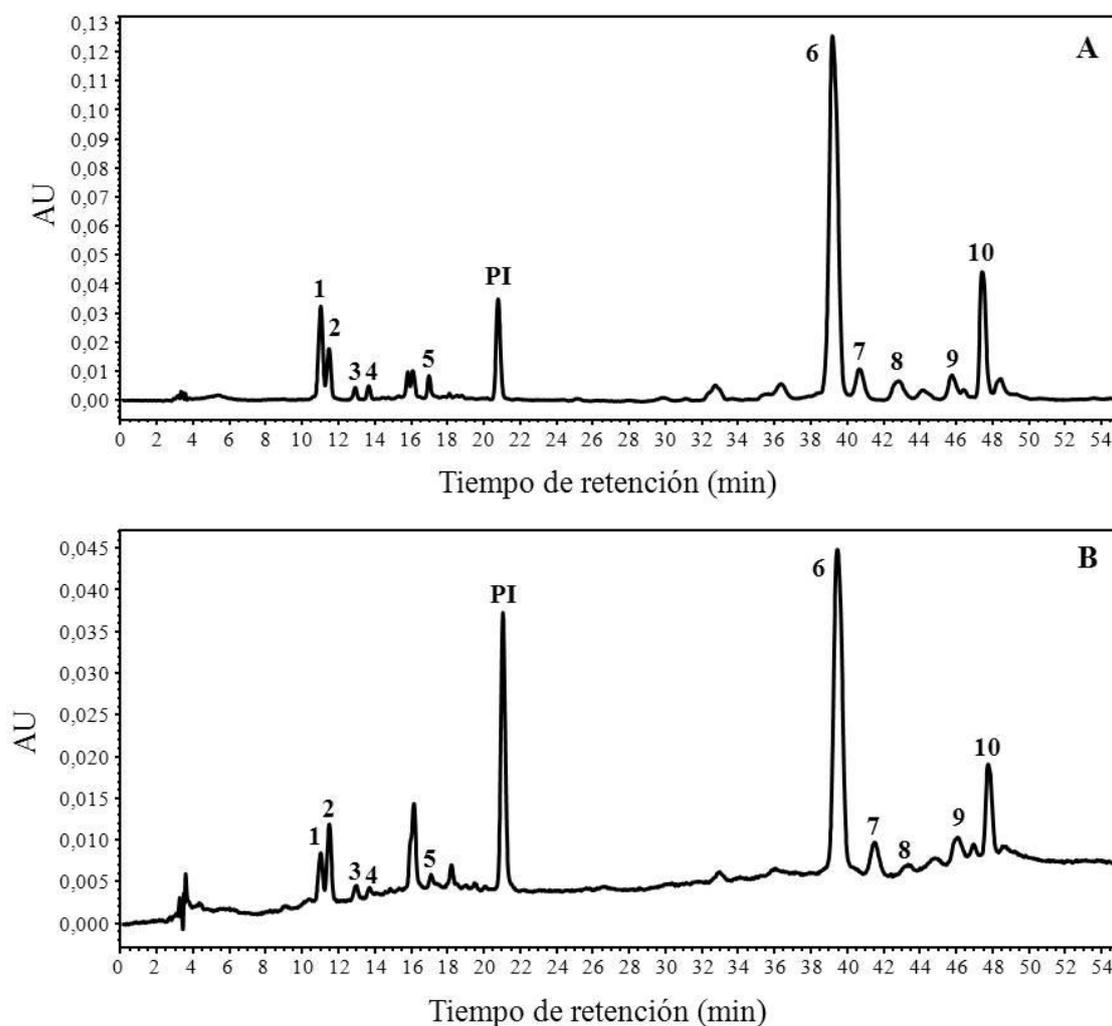
En la Figura 23 se muestra el perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos de aceitunas de la variedad Manzanilla que han sido golpeadas y expuestas al aire durante 24 horas. Se observa que cualitativamente los compuestos analizados son muy similares tanto en las áreas golpeadas como en las no golpeadas. La oleuropeína es el compuesto fenólico mayoritario, estando presentes otros en menor concentración como el hidroxitirosol 4-glucósido, hidroxitirosol 1-glucósido, rutina, ligustrósido, salidrósido, éster de ácido cafeico unido a secologanósido y comselogósido. Además, no se detectan HyEDA ni hidroxitirosol, metabolitos procedentes de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína, ni en el área golpeada como en la no golpeada durante diferentes tiempos de exposición al aire (0, 2, 4 y 24 horas) (Sánchez y cols., 2013). Estos resultados ponen de manifiesto la inexistente actividad enzimática de las hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y esterasa) sobre la molécula de oleuropeína en aceitunas golpeadas y expuestas al aire.

Centrándonos en el compuesto mayoritario oleuropeína, podemos observar en la Figura 24 una menor concentración del mismo en las áreas golpeadas independientemente del tiempo de exposición al aire, siendo estadísticamente significativas las diferencias a las 24 horas. Esto puede deberse a que la oleuropeína es un molécula ortodifenólica, y, por tanto, un posible sustrato sobre el cual actuar la PPO endógena de los frutos, oxidándola directamente de forma similar a como ocurre durante el desamargor enzimático de las aceitunas en salmuera (García y cols., 2008).

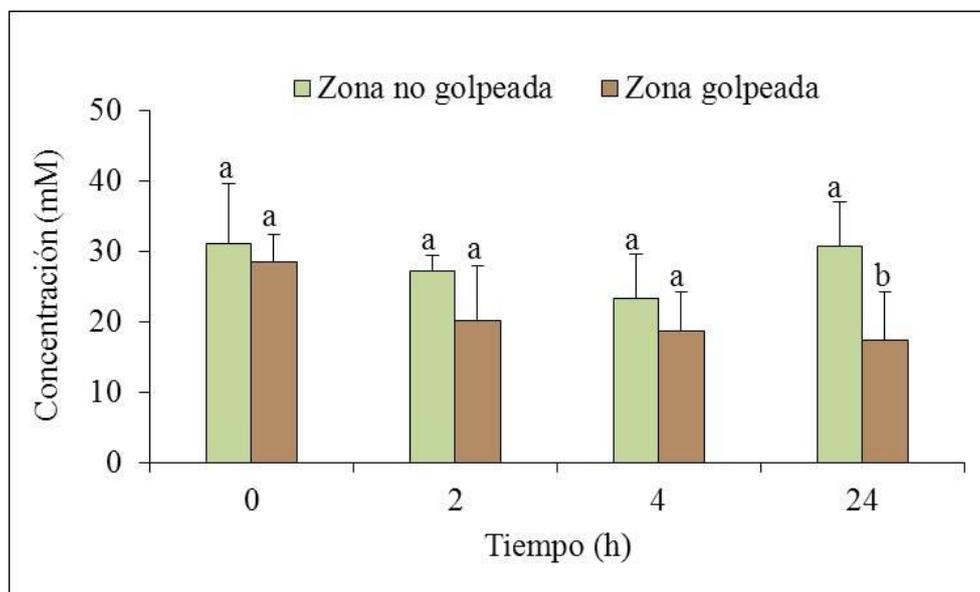
Con respecto al resto de polifenoles analizados, cuyas concentraciones se encuentran representadas en la Tabla 15, no se detectan diferencias importantes de concentración en ninguno de los compuestos en las zonas no dañadas después de transcurrir 24 horas de exposición al aire. Por el contrario, para las zonas dañadas hay una clara tendencia a disminuir la concentración del hidroxitirosol 1-glucósido transcurrido el tiempo de exposición al aire, hecho esperable al ser también una molécula ortodifenólica y, por tanto, también posible sustrato de la PPO. Mientras, que las otras moléculas ortodifenólicas (rutina y éster de ácido cafeico unido a secologanósido) apenas presentan cambios. Evidentemente, no todos los posibles

sustratos se afectan con la misma intensidad por las enzimas PPO endógenas tal como han observado previamente otros autores (Ortega-García y colbs., 2008; García-Rodríguez y colbs., 2011).

**Figura 23.** Cromatogramas obtenidos por CLAE con detección por ultravioleta ( $\lambda = 280$  nm) de los compuestos fenólicos presentes en las áreas no golpeadas (A) y golpeadas (B) de aceitunas almacenadas al aire durante 24 horas. Los picos se corresponden con los siguientes compuestos: (1) hidroxitirosol 1-glucósido, (2) hidroxitirosol 4-glucósido, (3) salidrósido, (4) tirosol, (5) ácido vanílico, (PI) patrón interno (ácido sirínico), (6) oleuropeína, (7) rutina, (8) éster de ácido cafeico unido a secologanósido, (9) ligustrósido y (10) comselogósido.



**Figura 24.** Concentración de oleuropeína (mM) en áreas golpeadas o no en aceitunas almacenadas al aire. Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados. Las barras acompañadas con la misma letra dentro de un mismo tiempo de aireación no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



**Tabla 15.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) en áreas no golpeadas y golpeadas de aceitunas expuestas al aire durante 24 horas.

Compuesto (mM)	Área no golpeada	Área golpeada
<b>Hidroxitirosol 1-glucósido</b>	2,40 (0,47)* a	1,03 (0,51) b
<b>Hidroxitirosol 4-glucósido</b>	7,70 (1,92) a	5,77 (2,37) a
<b>Salidroside</b>	0,31 (0,11) a	0,11 (0,03) a
<b>Rutina</b>	0,64 (0,39) a	0,58 (0,29) a
<b>Éster de ácido cafeico unido a secologanósido</b>	0,13 (0,03) a	0,10 (0,05) a
<b>Ligustrósido</b>	0,70 (0,10) a	0,48 (0,18) a
<b>Comselogósido</b>	0,32 (0,12) a	0,17 (0,06) a

\* Desviación estándar de triplicados

De hecho, la PPO cataliza la conversión de ortodifenoles en las correspondientes ortoquinonas que finalmente polimerizarán químicamente para formar manchas oscuras (Muñoz-Muñoz y cols., 2009). Además, esta enzima también tiene la capacidad de hidroxilar los monofenoles a ortodifenoles, hecho que aparentemente no ocurre en estas experiencias tal como se desprende de los resultados obtenidos (Tabla 15) para la mayoría de los monofenoles, destacando una pequeña disminución en la concentración del salidrósido en los frutos dañados después de 24 horas de exposición al aire.

De otra parte, las enzimas oxidativas necesitan la presencia de oxígeno para su actuación. Un método preventivo para evitar la aparición de manchas oscuras tras el golpeado podría ser la conservación de los frutos dañados en una atmósfera sin oxígeno. Por ello, se diseñó una experiencia donde las aceitunas se golpearon artificialmente siguiendo el método descrito en el apartado 3.15.1.1., se almacenaron bajo una atmósfera de  $N_2$  durante 5 horas y posteriormente se expusieron una hora al aire. Además, en paralelo, se realizó una experiencia similar y transcurridas las 5 horas de almacenamiento los frutos se sometieron a un tratamiento térmico de 90 °C durante 45 minutos bajo la atmósfera de  $N_2$  y a continuación se abrieron los recipientes, dejando los frutos al aire durante una hora.

Estudios preliminares con aceitunas golpeadas y almacenadas en atmósferas de  $N_2$ , demostraron que los frutos no se oscurecían mientras permanecían en esta atmósfera. Sin embargo, las áreas golpeadas comenzaban a oscurecerse inmediatamente después de que desaparecieran las condiciones de anoxia al ponerse en contacto con el oxígeno (Segovia-Bravo y cols., 2012). Como se ha comentado anteriormente, el golpeado sobre las aceitunas provoca la rotura de los tejidos y la puesta en contacto de la PPO con los fenoles dando lugar a la formación de quinonas y posterior polimerización con la consiguiente aparición del oscurecimiento. Durante el almacenamiento en  $N_2$  en ausencia de oxígeno se impide el desarrollo de las reacciones de polimerización química de estas sustancias reactivas, aunque una vez las atmósferas inertes desaparecen, las reacciones podrían reiniciarse y originar oscurecimiento en las áreas dañadas. Por tanto, se plantea este nuevo experimento para aclarar si el oscurecimiento es consecuencia de las reacciones químicas o enzimáticas que ocurren en las aceitunas.

Como se puede observar en la Figura 25A las áreas golpeadas en los frutos no sometidos al tratamiento térmico (ACG) presentan menor concentración de oleuropeína que las áreas no golpeadas (ASG) siendo significativamente diferente. Por el contrario, el contenido de oleuropeína en las aceitunas tratadas térmicamente no era significativamente diferente entre las áreas golpeadas y no golpeadas, debido a la inactivación de las enzimas durante el calentamiento.

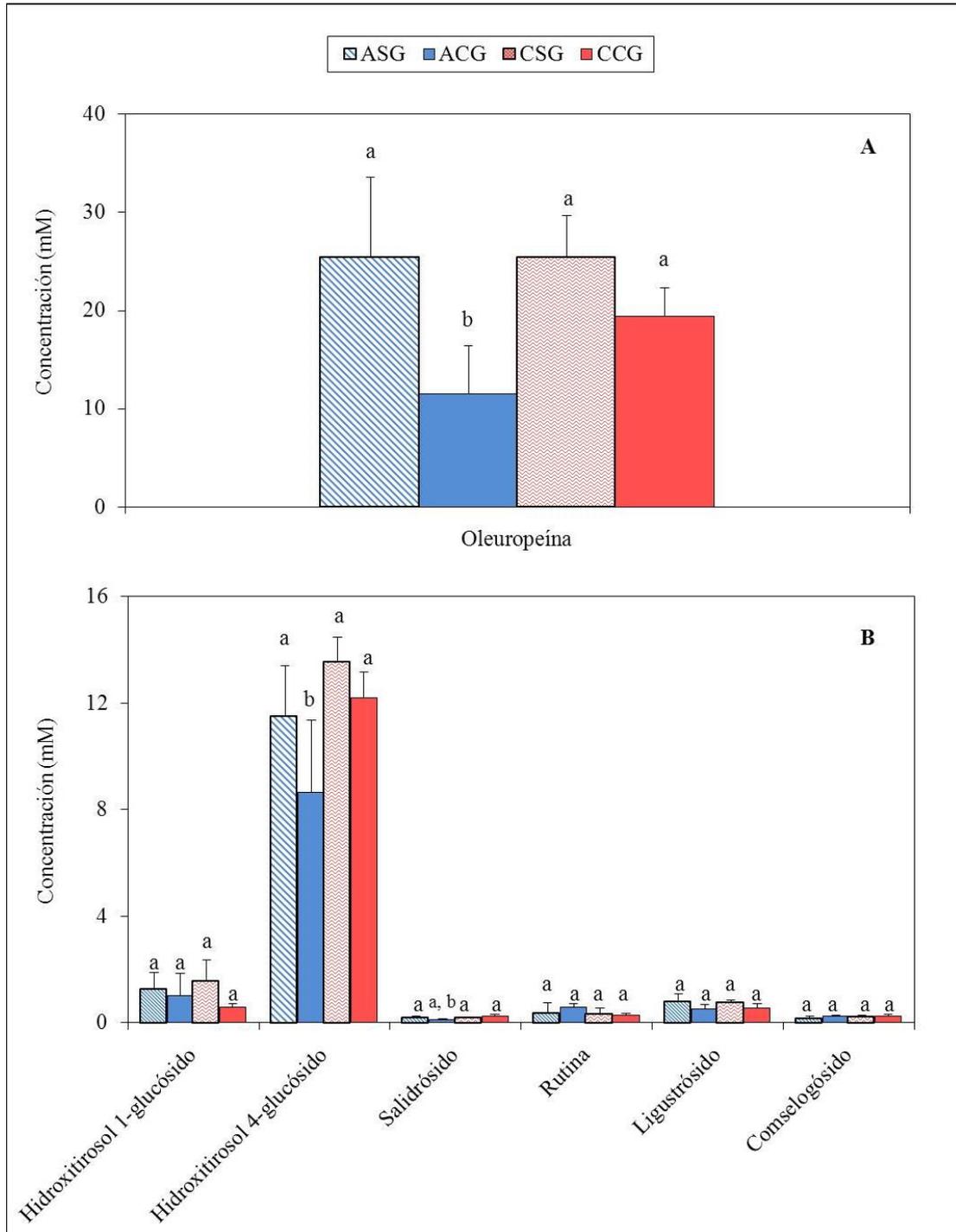
El resto de compuestos fenólicos (Figura 25B) se encuentran en una concentración similar en ambas áreas tanto en aceitunas sometidas o no a calentamiento, no encontrándose diferencias significativas, excepto para el hidroxitirosol 4-glucósido que se encuentra en una menor concentración en las áreas dañadas de las aceitunas no sometidas al tratamiento térmico.

Sin embargo, es llamativo la menor concentración que se encuentra tanto para la oleuropeína como para los glucósidos del hidroxitirosol, hidroxitirosol 1-glucósido e hidroxitirosol 4-glucósido en las zonas dañadas de los frutos calentados. Claramente existe una cierta pérdida de concentración de estos compuestos, aunque ello ha debido ocurrir bien durante el almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno, antes del tratamiento térmico que habría inactivado todas las enzimas o antes de completarse la anoxia en el recipiente.

Se ha demostrado que las aceitunas golpeadas cuando se dejan al aire se oscurecen como consecuencia de la oxidación enzimática de la oleuropeína por la acción de la PPO (Figura 24) y que esta actividad es más intensa en frutos que han sido conservados durante un tiempo bajo atmósfera de nitrógeno (Figura 25A).

En la Figura 26, se pueden observar el oscurecimiento que desarrolla la zona golpeada de las aceitunas no sometidas al tratamiento térmico cuando se exponen una hora al aire después de las condiciones de anoxia. Por el contrario, las aceitunas tratadas térmicamente después del almacenamiento en N<sub>2</sub> y posterior exposición al aire, no se producen reacciones de oxidación química y/o enzimática ya que las enzimas se inactivan durante el tratamiento térmico de los frutos.

**Figura 25.** Concentración de oleuropeína (A) y otros compuestos fenólicos (B) expresada en mM en áreas no golpeadas y golpeadas de aceitunas almacenadas bajo N<sub>2</sub> durante 5 horas y posteriormente expuestas 1 hora al aire, sometidas o no a un calentamiento previo (90 °C/45 min). Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados. Áreas no golpeadas (ASG); áreas golpeadas (ACG); áreas calentadas no golpeadas (CSG); áreas calentadas golpeadas (CCG).



**Figura 26.** Aceitunas golpeadas artificialmente, sometidas o no a un calentamiento previo (90 °C/45 min), almacenadas bajo N<sub>2</sub> durante 5 horas y posteriormente expuestas 1 hora al aire.



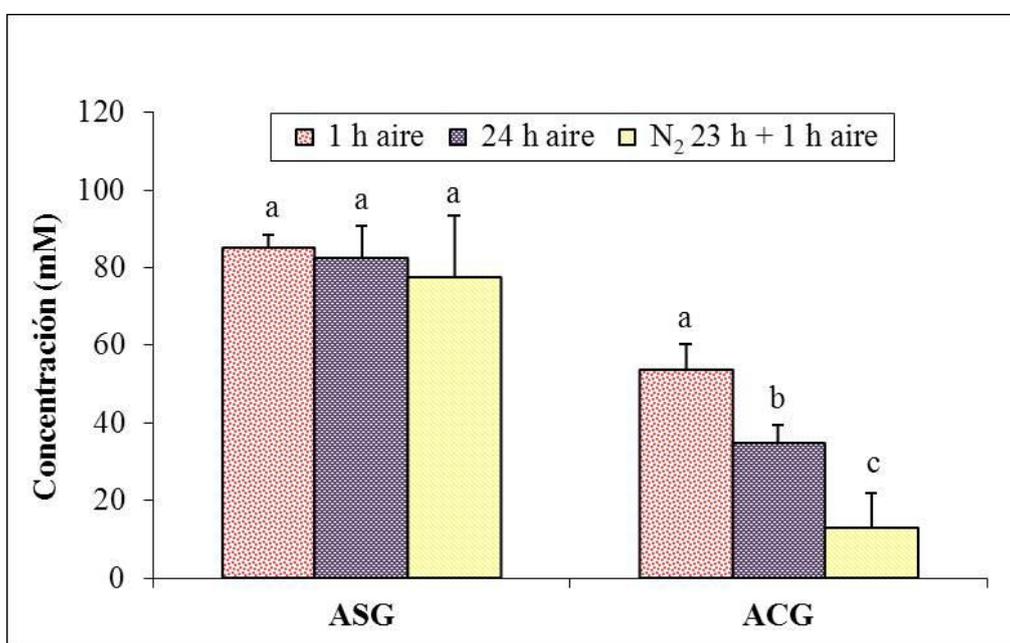
Con la intención de aclarar un poco más la influencia de esta etapa en la pérdida de fenoles se planteó hacer una experiencia donde aceitunas golpeadas artificialmente (Apartado 3.15.1.1.) se dejaron al aire durante 1 y 24 horas o se almacenaron en N<sub>2</sub> durante 23 horas y posteriormente se dejaron 1 hora al aire. En concreto, la concentración de oleuropeína (Figura 27) en las áreas no dañadas de los frutos no variaba después del almacenamiento al aire o en N<sub>2</sub>.

Por el contrario, la concentración de este compuesto en las áreas golpeadas disminuía progresivamente a medida que aumentaba el tiempo de contacto con el aire, aunque la mayor disminución en la concentración de oleuropeína ocurría en las áreas golpeadas de aceitunas almacenadas bajo N<sub>2</sub> durante 23 horas y expuestas durante 1 hora al aire. Además, estas diferencias eran estadísticamente significativas según el test de Duncan. Una vez más comprobamos que cuando las aceitunas dejan de estar en anoxia, la actividad de la PPO se intensifica, efecto que también ha sido observado durante el almacenamiento de varios frutos y vegetales bajo condiciones de anoxia (Klieber y colbs., 2002; You y colbs., 2007).

Por otra parte, como en experiencias anteriores se observa que en las áreas golpeadas la concentración de los compuestos fenólicos es menor que en las áreas no golpeadas en todos los tratamientos evaluados (Tabla 16). Además, como se ha demostrado previamente, cuanto mayor es el tiempo de contacto con el aire menor es la

concentración de compuestos fenólicos, tanto de ortodifenoles como de monofenoles, excepto para el hidroxitirosol 4-glucósido. Evidentemente, la PPO actúa oxidando e hidroxilando y estas reacciones ocurrirán en mayor intensidad al aumentar el tiempo de exposición al aire.

**Figura 27.** Concentración de oleuropeína (mM) en áreas no golpeadas (ASG) y golpeadas (ACG) de aceitunas en las que se ha simulado el golpe y almacenadas al aire o en N<sub>2</sub>. Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados. Las barras acompañadas con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



Sin embargo, cuando las aceitunas se almacenan con N<sub>2</sub> y posteriormente se ponen en contacto con el aire, aunque este tiempo sólo sea de 1 hora, la concentración de compuestos fenólicos es similar al que poseen las aceitunas dejadas 24 horas al aire, lo cual vuelve a confirmar que la PPO intensifica su actividad por el hecho de conservar los frutos en anoxia durante un tiempo. Además, sorprendentemente, en esta ocasión encontramos en la zona golpeada una concentración muy elevada de HyEDA, compuesto que procede de la hidrólisis de la oleuropeína por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, y se forma únicamente en las aceitunas almacenadas bajo N<sub>2</sub>, no detectándose en las áreas no dañadas, ni en los frutos expuestos directamente al aire sin periodo de conservación en atmósfera de nitrógeno. Esto nos indica que en ausencia de

aire la enzima  $\beta$ -glucosidasa puede estar actuando en la zona golpeada del fruto, y dicha actividad será más significativa cuanto mayor sea el tiempo de conservación bajo una atmósfera de  $N_2$ .

**Tabla 16.** Concentración de diversos compuestos fenólicos (mM) en áreas golpeadas (ACG) y no golpeadas (ASG) de aceitunas en las cuales se ha simulado el golpeado y almacenadas al aire o en  $N_2$ .

Compuesto (mM)	ACG			ASG		
	1 h aire	24 h aire	$N_2$ 23 h + 1 h aire	1 h aire	24 h aire	$N_2$ 23 h + 1 h aire
<b>Hidroxitirosol 1-glucósido</b>	1,43 (0,22)*	0,54 (0,75)	0,45 (0,25)	1,94 (0,92)	1,97 (0,29)	1,84 (0,41)
<b>Hidroxitirosol 4-glucósido</b>	2,09 (0,41)	2,05 (0,35)	2,61 (0,47)	2,71 (0,70)	4,69 (0,45)	3,71 (0,73)
<b>Salidrósido</b>	0,53 (0,04)	0,34 (0,04)	0,39 (0,08)	0,59 (0,08)	0,62 (0,11)	0,57 (0,08)
<b>Tirosol</b>	0,71 (0,18)	0,23 (0,32)	0,46 (0,03)	0,85 (0,30)	0,60 (0,14)	0,67 (0,08)
<b>HyEDA</b>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,87 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<b>Rutina</b>	1,42 (0,66)	1,10 (0,58)	0,68 (0,46)	1,69 (0,21)	1,53 (0,21)	1,63 (0,93)
<b>Éster de ácido cafeico unido a secologanósido</b>	0,21 (0,01)	0,14 (0,06)	0,11 (0,02)	0,38 (0,15)	0,39 (0,03)	0,32 (0,06)
<b>Ligustrósido</b>	2,74 (0,61)	1,46 (0,34)	0,83 (0,24)	2,92 (0,37)	2,50 (0,33)	2,46 (0,36)
<b>Comselogósido</b>	0,59 (0,08)	0,47 (0,10)	0,44 (0,03)	0,65 (0,45)	0,57 (0,12)	0,66 (0,16)

\* Desviación estándar de triplicados

Por tanto, la PPO actúa más rápidamente que la  $\beta$ -glucosidasa en aceitunas no tratadas térmicamente y expuestas al aire. Sin embargo, en condiciones de anoxia se produce la inactivación de la PPO y la actividad enzimática que puede desarrollarse en la zona golpeada en las aceitunas es debida a la acción de la  $\beta$ -glucosidasa.

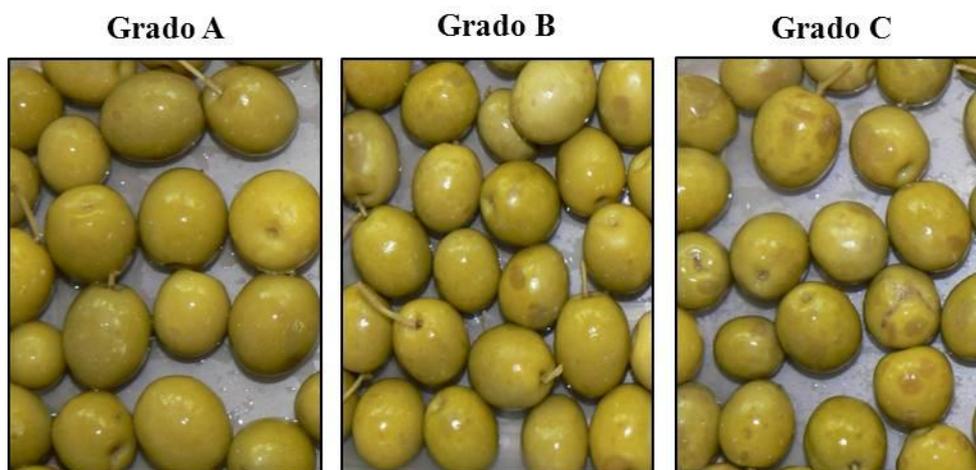
#### 4.2.1.2. Experiencias para la reducción de la formación de manchas oscuras debido al “golpeado” durante la recolección mecanizada en aceitunas verdes estilo español

##### 4.2.1.2.1. Efecto de la recolección mecánica sobre la calidad de aceitunas

Hasta ahora, hemos comprobado que el almacenamiento bajo atmósfera de  $N_2$  puede retrasar el oscurecimiento de los frutos que tendría lugar en las zonas dañadas de los mismos por la acción de la PPO sobre los compuestos fenólicos como consecuencia

del “golpeado” durante la recolección mecanizada. Sin embargo, no es un tratamiento totalmente eficaz, ya que las aceitunas se oscurecen más rápidamente cuando se ponen de nuevo en contacto con el aire. Para solventar esta problemática, se llevaron a cabo distintos ensayos a escala piloto basados en el uso de atmósferas modificadas sólo o combinadas con otros tratamientos a los que se puedan someter las aceitunas para mejorar su apariencia. Se evaluó la calidad de las aceitunas después de ser elaboradas como aceitunas verdes estilo español y estar conservadas en salmuera durante 8 meses. Para ello, se utilizó la escala subjetiva descrita en el apartado 3.13. de materiales y métodos donde los frutos se clasifican en tres grupos según el tamaño e intensidad del daño que presenten (Figura 27): grado A (tamaño de mancha pequeño), grado B (tamaño de mancha mediano) y grado C (tamaño de mancha grande). Esta escala está basada en lo establecido por el COI (2004), que considera como frutos dañados las aceitunas con marcas en la piel en un área superficial mayor de 9 mm<sup>2</sup>.

**Figura 27.** Clasificación de aceitunas según la intensidad del daño provocado durante el “golpeado”.



Respecto a los parámetros de fermentación, hay que indicar que todas las experiencias evolucionaron con normalidad y en cualquiera de los tratamientos aplicados la salmuera final alcanzó un valor de pH inferior a 4,5 unidades y un rango de acidez libre desde 0,4 % a 0,7 % de ácido láctico.

### *Almacenamiento de los frutos bajo atmósferas inertes*

El almacenamiento en atmósferas inertes retrasa las reacciones enzimáticas dependientes del oxígeno, como es la acción de las oxidasas. Entre los gases usados para la conservación de alimentos es muy utilizado el N<sub>2</sub>, así como argón y en menor medida, SO<sub>2</sub>.

Las aceitunas empleadas en estos estudios fueron recolectadas mecánicamente y se elaboraron como verdes estilo español. Los frutos se almacenaron bajo distintas atmósferas inertes (argón y N<sub>2</sub> sólo o combinado con 0,01 % y 0,05 % de SO<sub>2</sub>), y se dejaron expuestas al aire durante 15 minutos antes de ser tratadas con NaOH para elaborarlas como aceitunas verdes estilo español. El control fueron aceitunas colocadas directamente en NaOH. Estos 15 minutos es el tiempo que se estima necesario a escala industrial desde que se reciben las aceitunas hasta que se introducen en la solución alcalina.

Como se muestra en la Tabla 17, las aceitunas control presentan un mayor porcentaje de frutos clasificados como grado A y bajo porcentaje como grado C frente a las tratadas con las atmósferas inertes. Es decir, los frutos control son los menos dañados y presentan menos manchas oscuras. Hay que indicar que las aceitunas cuando se examinaron inmediatamente después de quitarlos de las atmósferas inertes el oscurecimiento no era muy intenso. Sin embargo, después de 15 minutos de contacto con el aire se intensificaba bastante el oscurecimiento en las zonas dañadas, el cuál permanecía incluso 8 meses después del procesado.

Existen referencias de que el tratamiento de frutos y vegetales recolectados con atmósferas enriquecidas en argón preserva la calidad de los productos debido a la disminución de la disponibilidad de oxígeno y porque en estas condiciones se inhibe la actividad de la PPO (O'Beirne y cols., 2011; Char y cols., 2012). En los experimentos realizados con N<sub>2</sub> y argón en esta tesis, el oscurecimiento se inhibe durante su almacenamiento pero cuando las aceitunas se ponen en contacto con el aire antes del tratamiento con la solución de NaOH el oscurecimiento se acelera. La efectividad del tratamiento con atmósferas de N<sub>2</sub> enriquecidas con SO<sub>2</sub> (0,01 y 0,05 %) es muy baja y estas aceitunas particularmente desarrollan múltiples manchas oscuras en los estomas.

Es decir, este tratamiento con SO<sub>2</sub> que podría parecer muy prometedor debido a la actividad antioxidante de esta sustancia no funcionó y, es más, provocaba la aparición de manchas oscuras en las zonas circundantes a los estomas. El porcentaje de frutos clasificados como grado C fue muy elevado al utilizar cualquiera de las atmósferas inertes ensayadas.

**Tabla 17.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera. Los frutos fueron recolectados mecánicamente y conservados en distintas atmósferas inertes (N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub>, argón) durante 6 horas. Después del periodo de anoxia se exponen al aire durante 15 minutos antes de ser tratados con la solución de NaOH. Valores acompañados con las mismas letras dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	% Aceitunas		
	Grado A	Grado B	Grado C
Control	31,1 (4,2)* a	62,7 (4,1) a	6,1 (0,0) a
N <sub>2</sub>	19,0 (3,7) a	68,7 (0,0) a	12,3 (3,7) a
N <sub>2</sub> + 0,01 % SO <sub>2</sub>	26,5 (10,7) a	60,6 (7,5) a	12,9 (3,2) a
N <sub>2</sub> + 0,05 % SO <sub>2</sub>	15,4 (3,5) a	72,9 (4,9) a	11,7 (1,4) a
Argón	25,7 (8,3) a	61,8 (4,3) a	12,5 (4,0) a

\* Desviación estándar de duplicados

#### *Aplicación de soluciones después del almacenamiento bajo atmósferas de nitrógeno*

Hasta ahora hemos podido comprobar que el almacenamiento de las aceitunas en diferentes atmósferas inertes no evita el oscurecimiento de los frutos. Por ello, se planteó otra experiencia donde, o bien el tiempo de exposición al aire es menor (3 min) o se sumergen los frutos después del almacenamiento en N<sub>2</sub> en una solución de ácido ascórbico al 0,5 % por sus características antioxidantes y se exponen al aire otros 30 minutos.

Los resultados de esta experiencia están recogidos en la Tabla 18. Nuevamente, los frutos que no se habían sometido a ningún tratamiento (control) presentan mayor porcentaje de aceitunas con grado A y un bajo porcentaje con grado C comparado con aceitunas almacenadas en N<sub>2</sub> y luego expuestas al aire, existiendo una diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 18.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera. Los frutos fueron recolectados mecánicamente y conservados con y sin atmósfera de N<sub>2</sub> durante 6 horas, transcurridos diferentes tiempos de exposición al aire después del periodo de anoxia e incluso tratados con una solución de ácido ascórbico al 0,5 % y expuestos 30 minutos al aire, los frutos fueron tratados con la solución de NaOH. Valores acompañados con las mismas letras dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	% Aceitunas		
	Grado A	Grado B	Grado C
Control	25,0 (2,2)* a	59,3 (1,6) a	15,6 (0,5) a
N <sub>2</sub> + 3 min aire	6,6 (1,4) b	51,3 (1,4) b	42,0 (2,8) b
N <sub>2</sub> + 30 min aire	4,6 (1,3) b	50,6 (2,9) b	44,7 (1,6) b
N <sub>2</sub> + 0,5 % ácido ascórbico	9,0 (3,5) b	51,8 (1,0) b	39,2 (2,5) b

\* Desviación estándar de duplicados

Entre los tres ensayos con N<sub>2</sub>, las aceitunas tratadas con la solución de ácido ascórbico son las que presentan un mayor porcentaje de frutos con grado A y menor porcentaje con grado C, considerándose como el tratamiento más efectivo de los tres. Sin embargo, ninguno es adecuado ya que no se elimina el oscurecimiento puntual de los frutos y en todos los casos los resultados son peores que los obtenidos con el control. Se observa que cuanto más tiempo permanecen las aceitunas en contacto con el aire después del almacenamiento en N<sub>2</sub> mayor es el porcentaje de frutos de grado C. Lógicamente, al existir un mayor tiempo de contacto con el oxígeno del aire, la acción

de la PPO es más elevada y por tanto es mayor la oxidación de los compuestos fenólicos.

Estudios previos indican que el recubrimiento de los frutos y vegetales con agua o soluciones químicas tales como ácido ascórbico o metabisulfito sódico pueden reducir el oscurecimiento postcosecha (Mishra y colbs., 2012; Liang y colbs., 2012; Wu y colbs., 2012). Sin embargo, en nuestra experiencia previa con ácido ascórbico no se ha podido comprobar estos resultados, lo cual puede estar relacionado con el corto tiempo de contacto de los frutos con la solución de ácido ascórbico y/o a una baja permeabilidad de la piel de las aceitunas de esa partida a los gases y por tanto, una baja difusión del antioxidante (Drusas y colbs., 1988; García y colbs., 1995).

Por ello, se realiza un nuevo experimento en el que las aceitunas se almacenan bajo atmósferas de  $N_2$  durante 6 horas y posteriormente se sumergen durante 1 hora en distintas soluciones que contienen 0,3 % de NaOH, 0,5 % de ácido ascórbico y 0,05 % de  $SO_2$ . A continuación, se someten al tratamiento con NaOH para elaborarse como aceitunas verdes estilo español. El objetivo es comprobar si un mayor tiempo de contacto con estas soluciones evita el oscurecimiento de los frutos. Como se muestra en la Tabla 19, ningún tratamiento inhibe el oscurecimiento de las áreas dañadas. Las aceitunas sometidas al tratamiento control son las que presentan mayor porcentaje con grado A siendo el porcentaje de aceitunas con grado C el más bajo comparado con el resto de tratamientos.

Por lo tanto, el almacenamiento de las aceitunas en atmósferas de  $N_2$  y la posterior inmersión en estas soluciones no son métodos efectivos para evitar la aparición de manchas oscuras, a pesar de que algunos autores proponen la inmersión directa de las aceitunas golpeadas en soluciones de NaOH diluida, de ácido ascórbico o de  $SO_2$  durante varias horas como medidas para transportar los productos del campo a las fábricas (Ben-Shalom y colbs., 1978; Rejano y colbs., 2008; Segovía-Bravo y colbs., 2012). Este oscurecimiento podría deberse a una rápida difusión del oxígeno en los frutos cuando las atmósferas de  $N_2$  desaparecen antes de someterlas al tratamiento con NaOH y, por tanto, una reactivación de la acción de la PPO.

**Tabla 19.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera. Los frutos fueron recolectados mecánicamente y conservados con y sin atmósfera de N<sub>2</sub> durante 6 horas. Después del periodo de anoxia los frutos fueron sumergidos durante 1 hora en diferentes soluciones (0,3 % NaOH, 0,5 % ácido ascórbico, 0,05 % SO<sub>2</sub>), y expuestos al aire durante 15 minutos. Seguidamente los frutos fueron tratados con la solución de NaOH. Valores acompañados con las mismas letras dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	% Aceitunas		
	Grado A	Grado B	Grado C
Control	35,4 (0,3)* a	58,0 (0,4) a	6,6 (0,6) a
0,3 % NaOH	15,8 (10,6) b	63,5 (8,0) a	20,7 (2,7) b
0,5 % ácido ascórbico	17,2 (3,6) b	67,4 (0,7) a	15,3 (4,4) a
0,05 % SO <sub>2</sub>	21,1 (3,9) b	61,6 (3,5) a	17,2 (7,4) a

\* Desviación estándar de duplicados

#### ***Aplicación de soluciones previas al almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno***

Para evitar la rápida difusión del oxígeno en las aceitunas después del tratamiento con N<sub>2</sub> se propone un experimento en el que se aplican distintas soluciones a los frutos (agua, ácido ascórbico, SO<sub>2</sub> y glicerol) antes del almacenamiento bajo N<sub>2</sub>.

Los resultados presentados en la Tabla 20, muestran que el tratamiento con la solución de 0,05 % en SO<sub>2</sub> no previene el desarrollo del oscurecimiento al igual que el tratamiento con agua o la solución de ácido ascórbico, ya que existe un alto porcentaje de aceitunas de grado C y un bajo porcentaje de grado A. Sin embargo, la inmersión de los frutos en la solución con 1 % de glicerol muestra una tendencia a disminuir el oscurecimiento en las aceitunas, ya que el porcentaje de los frutos con grado C es estadísticamente el mismo para los controles que para el tratamiento con glicerol.

**Tabla 20.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera. Los frutos fueron recolectados mecánicamente y sumergidos en diferentes soluciones (agua, ácido ascórbico, SO<sub>2</sub> y glicerol) durante 5 segundos antes de ser conservados en atmósfera de nitrógeno durante 6 horas. Después del periodo de anoxia los frutos fueron expuestos al aire durante 3 minutos antes de ser tratados con la solución de NaOH. Valores acompañados con las mismas letras no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	% Aceitunas		
	Grado A	Grado B	Grado C
Control	45,7 (8,5)* a	48,7 (7,5) a	5,6 (0,8) a
Agua	17,3 (2,9) b	71,6 (6,4) b	11,2 (3,0) b
0,5 % ácido ascórbico	17,6 (0,9) b	70,3 (3,7) b	12,1 (4,0) b
0,05 % SO <sub>2</sub>	23,7 (1,8) b	67,8 (1,3) b	8,6 (0,6) c
1 % glicerol	30,2 (6,7) b	63,9 (7,4) b	5,9 (0,6) a

\* Desviación estándar de duplicados

El glicerol es solo un componente de los recubrimientos comestibles (Certel y colbs., 2004; Malmiri y colbs., 2012), aunque estos resultados abren la posibilidad de estudiar el efecto de otros recubrimientos comestibles usados en otros alimentos para prevenir la difusión del oxígeno en las aceitunas una vez la atmósfera de N<sub>2</sub> es eliminada.

#### 4.2.1.2.2. Aplicación de películas protectoras previas al almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno

El recubrimiento de los frutos con películas protectoras usadas en productos alimenticios puede retrasar el oscurecimiento de los frutos durante la etapa de postrecolección (Hernández-Muñoz y colbs., 2008; Chauhan y colbs., 2011). En este estudio, las aceitunas justo después de recibir el impacto según la metodología descrita en el apartado 3.15.1.1. se sumergieron en glicerol y en varias películas protectoras

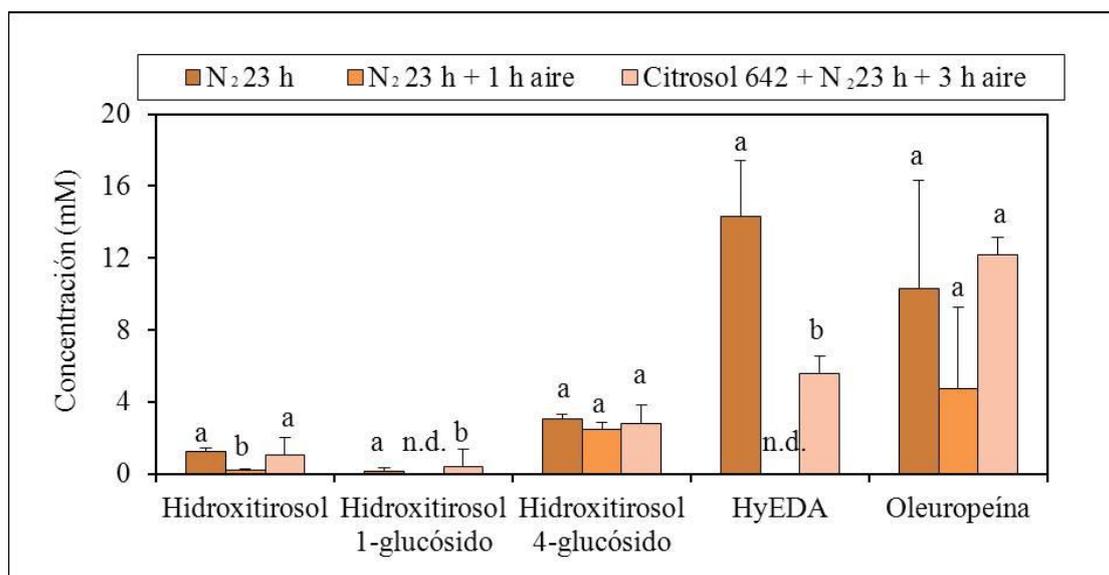
suministradas por la empresa Productos Citrosol S.A. y se almacenaron bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 horas, tras las cuales se dejaron 15 minutos al aire y posteriormente se trataron con una solución de NaOH. La observación visual de las aceitunas indicó que la incidencia de manchas oscuras es mayor en las aceitunas que no se les ha aplicado ninguna solución (control), seguidas de las sometidas a las soluciones del 1 % en glicerol, Citrosol 680, Citrosol 686, Citrosol 652 y Citrosol 642. El glicerol es comúnmente utilizado como plastificante en películas comestibles (Malmiri y colbs., 2012) y además ejerce algún efecto protector frente al oscurecimiento de las aceitunas en la etapa de postrecolección según hemos observado en la experiencia anterior. En este experimento el mayor efecto contra el oscurecimiento se observó para la solución de Citrosol 642, que habitualmente se emplea en productos cítricos para prolongar su almacenamiento (Njombolwana y colbs., 2013; Pereira y colbs., 2013).

En un intento de explicar cuál es la participación de estos recubrimientos protectores en la disminución del oscurecimiento ocasionado por el “golpeado” durante la recolección mecánica se plantean dos experiencias a escala de laboratorio donde se evalúa la composición fenólica de las áreas dañadas y no dañadas de las aceitunas, así como la actividad PPO en las mismas. Las aceitunas golpeadas se sumergen en Citrosol 642 durante 5 segundos y se conservan bajo atmósfera de nitrógeno durante 23 horas, posteriormente se exponen al aire durante 3 horas. Asimismo, se prepara una muestra control con aceitunas golpeadas y conservadas bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 23 horas. En otra experiencia las aceitunas golpeadas se exponen al aire durante 24 horas o se conservan bajo atmósferas de N<sub>2</sub> durante 23 horas y se exponen al aire durante 1 hora.

La concentración de los compuestos fenólicos se representa en la Figura 28. En primer lugar, hay que indicar que existe una elevada concentración de oleuropeína al igual que de HyEDA y de hidroxitirosol en las aceitunas que han estado conservadas durante 23 horas bajo N<sub>2</sub> y no han sido expuestas al aire después de perder las condiciones de anoxia. Ello indica claramente que durante este periodo de ausencia de aire se inhibe la oxidación enzimática de la oleuropeína aunque no la hidrólisis enzimática de la misma por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (Ramírez y colbs., 2015b). Asimismo, se forma hidroxitirosol que procede de la acción de la esterasa sobre moléculas derivadas del mismo (oleuropeína, hidroxitirosol 1-glucósido, etc). Ambas

enzimas no son dependientes del oxígeno y pueden actuar en condiciones de anoxia degradando los compuestos fenólicos.

**Figura 28.** Concentración de diversos compuestos fenólicos (mM) en áreas golpeadas (ACG) de aceitunas recolectadas de forma mecánica y almacenadas bajo N<sub>2</sub>. Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados. Las barras acompañadas con la misma letra dentro de un mismo tiempo de aireación no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



Por otra parte, durante el tiempo de contacto de las aceitunas con el aire disminuye la concentración de los *o*-difenoles oleuropeína, HyEDA, hidroxitirosol 1-glucósido e hidroxitirosol, debido a la oxidación por acción de las enzimas oxidasas. Esta disminución es más acentuada en el caso del HyEDA, que desaparece completamente a pesar de ser el compuesto que había en mayor concentración. Como ya hemos indicado en otras ocasiones, todos los sustratos no son iguales frente a las oxidasas y estos resultados indican una clara preferencia por este compuesto (HyEDA) frente a los otros *o*-difenoles propios de las aceitunas como puede ser la oleuropeína.

Asimismo, como era de esperar, en las aceitunas que se encuentran impregnadas con el Citrosol 642, a pesar de estar más tiempo en contacto con el aire, la oxidación es mucho más lenta, debido a la baja permeabilidad de las aceitunas al oxígeno (Ramírez y colbs., 2015b), lo cual explicaría sin duda la menor formación de manchas oscuras

encontradas en las aceitunas de la experiencia anterior. Nuevamente, es el HyEDA el compuesto fenólico que se oxida más rápidamente.

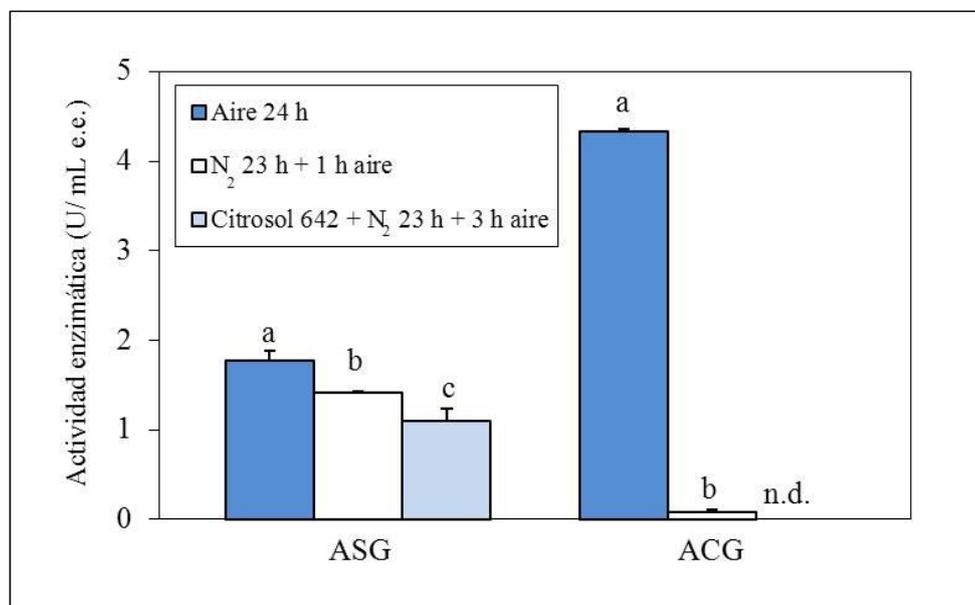
Debido al alto grado de oxidación de los compuestos fenólicos cuando las condiciones de anoxia desaparecen, se midió la actividad PPO de aceitunas sometidas a distintos tratamientos para determinar si realmente la actividad de esta enzima se intensifica como dicen algunos autores (Klieber y cols., 2002; You y cols., 2007) y como hemos supuesto en esta tesis hasta ahora.

La Figura 29 muestra la actividad PPO en áreas golpeadas y no golpeadas en aceitunas que han sido expuestas al aire durante 24 horas o en atmósferas de N<sub>2</sub> durante 23 horas y seguidamente 1 hora en contacto con el aire, así como las que han sido impregnadas con Citrosol 642 previamente a la puesta en condiciones de anoxia.

Por una parte, habría que indicar que en la zona no dañada la actividad PPO es muy similar independiente del tratamiento al que han sido sometidos los frutos, aunque estadísticamente diferente, siendo superior en las aceitunas no tratadas y menor en las tratadas, sobre todo aquellas que han tenido una impregnación previa con Citrosol.

Sin embargo, el comportamiento de la PPO en las áreas golpeadas es diferente. Mientras existe mayor actividad PPO en las áreas golpeadas que en las no golpeadas en los frutos expuestos al aire, resultados que coinciden con lo afirmado por algunos autores en estudios realizados en berenjena (Mishra y cols., 2012), en aceitunas sometidas al tratamiento con N<sub>2</sub>, las áreas golpeadas presentan menor actividad PPO que las áreas no dañadas, siendo no detectada esta actividad en aceitunas recubiertas con el Citrosol 642. Algunos investigadores afirman que los recubrimientos en frutos almacenados pueden inhibir la actividad PPO (Jiang y Li, 2001; Supapvanich y cols., 2012). Este hecho podría explicar los resultados encontrados en la Figura 28 en cuanto a que no hay una gran pérdida de fenoles en las aceitunas tratadas con el recubrimiento de Citrosol. Por el contrario, no justificaría la rápida oxidación de fenoles encontrada en una experiencia anterior (Figura 27) donde se ha observado una mayor oxidación de fenoles cuando los frutos son expuestos al aire después del periodo de anoxia frente a aceitunas que se exponen al aire directamente.

**Figura 29.** Actividad PPO (U/mL e.e.) en áreas golpeadas (ACG) y no golpeadas (ASG) de aceitunas en las que se ha simulado el golpeado y han sido tratadas con y sin película protectora antes de conservarse bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 23 horas. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. (n. d.: no detectado)



Estudios realizados en sistemas modelo con un extracto enzimático después de 24 horas en N<sub>2</sub>, la actividad PPO era de  $6,64 \pm 0,18$  U/mL e.e., y esta misma solución después de 3 horas al aire seguía teniendo la misma actividad  $6,62 \pm 0,11$  U/mL e.e., por lo que el N<sub>2</sub> por sí mismo no afecta a la actividad enzimática. Sin embargo, cuando hacemos el mismo estudio en presencia de oleuropeína (23 mM) después de 24 horas en N<sub>2</sub>, la actividad PPO es inferior ( $2,16 \pm 0,39$  U/mL e.e.) y después de 3 horas al aire la actividad disminuye hasta  $0,40 \pm 0,06$  U/mL e.e.. Además la concentración de oleuropeína se reduce un 75 %. Podría pensarse que la saturación del polímero formado de oleuropeína hace que disminuya la actividad PPO ya que como afirman algunos autores (Núñez de Castro, 2001) la actividad enzimática se puede inhibir por el producto de reacción formado.

Indudablemente, son dos los factores que influyen en estas oxidaciones, la intensidad de la actividad PPO y la permeabilidad de los frutos al oxígeno del aire. Mientras el primer factor explicaría la oxidación de los fenoles cuando las aceitunas se exponen al aire directamente después del golpeado, el segundo sería la explicación para

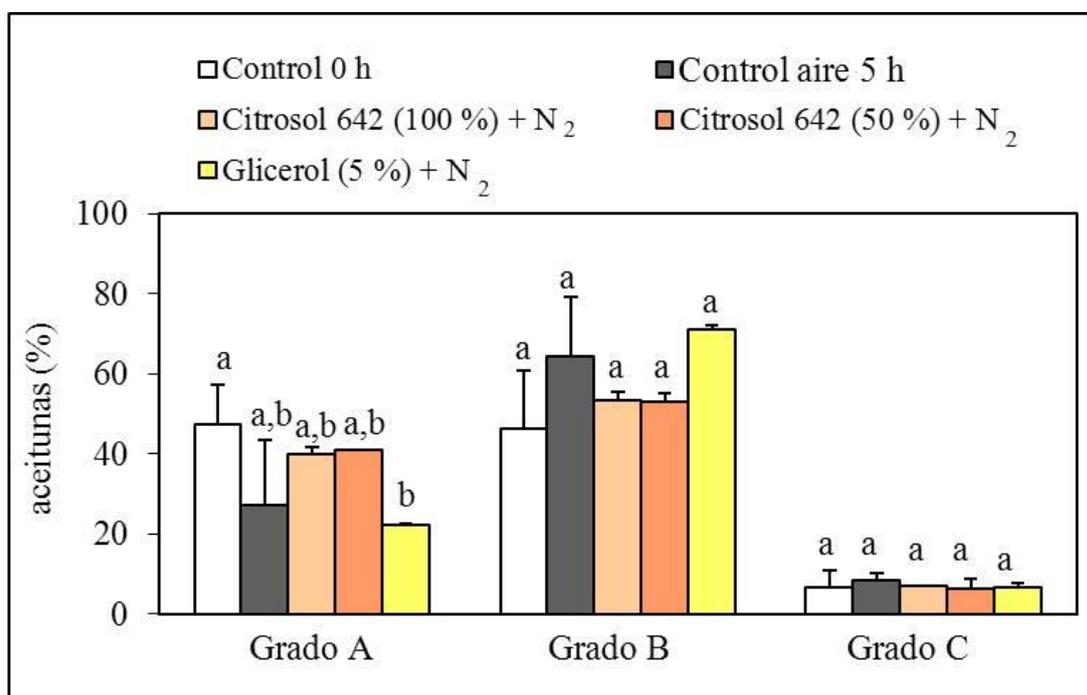
la rápida oxidación de los fenoles cuando se exponen las aceitunas al aire después de haber estado conservadas bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>.

Una vez que se ha comprobado el efecto de los distintos recubrimientos protectores sobre la calidad de las aceitunas y se conoce su participación en la disminución del oscurecimiento producido por el golpeado durante la postrecolección, se plantea confirmar que los resultados obtenidos se mantienen a escala piloto, empleando aceitunas recolectadas mecánicamente y haciendo los tratamientos en el propio campo y la planta piloto del Instituto de la Grasa, empleando fermentadores de 4 kg. En una primera experiencia se evalúa la solución que había ejercido un mayor efecto (Citrosol 642) a dos concentraciones distintas, y el glicerol a una concentración mayor (5 %) como se describe en el apartado 3.15.1.2.2.

Los resultados del escandallo se encuentran representados en la Figura 30. Se observa que los frutos puestos directamente en la solución de NaOH (control 0 h) muestran un mayor porcentaje de frutos grado A, seguidos por los frutos que estaban recubiertos con Citrosol 642, independientemente de la concentración aplicada. Además, las aceitunas recubiertas con glicerol y las que se dejan al aire durante 4 horas antes del tratamiento alcalino presentan menor porcentaje de aceitunas con grado A y mayor porcentaje de frutos de grado B. Por el contrario, el menor porcentaje de aceitunas con grado B se ha encontrado para las aceitunas sometidas al tratamiento control, seguidas por las recubiertas con Citrosol 642. Los frutos más dañados (grado C) presentan porcentajes muy similares para todos los tratamientos estudiados.

El recubrimiento con glicerol, a pesar de haberse usado en una concentración superior, no prevenía la aparición del oscurecimiento como se había observado anteriormente en esta tesis. A la vista de los resultados, las aceitunas deberían ser procesadas inmediatamente después de su recolección mecánica ya que la formación de las manchas oscuras ocurre de forma muy rápida, a las pocas horas de su recolección (Jiménez-Jiménez y cols., 2013), pero esto no es posible porque los agricultores tardan horas en llegar a las industrias desde los campos.

**Figura 30.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera. Los frutos fueron recolectados mecánicamente y sumergidos en diferentes soluciones (Citrosol 642 y glicerol) durante 5 segundos antes de ser conservados con atmósfera de  $N_2$  durante 5 horas. Después del periodo de anoxia, los frutos se expusieron al aire durante 15 minutos antes de ser tratados con la solución de NaOH. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. Las barras acompañadas con la misma letra para cada grado no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



Este nuevo proceso podría ser un método eficaz para mejorar la calidad de las aceitunas procesadas como aceitunas verdes estilo español. Para ello, se ofrece la alternativa de usar en el propio campo un recubrimiento comercial, tal como es el Citrosol 642, y el posterior almacenamiento de los frutos bajo una atmósfera de  $N_2$  en la cual se mantendrían los frutos conservados hasta su traslado a la industria y hasta que la misma esté en disposición de procesar las aceitunas como verdes estilo español. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología dependerá de la posibilidad de hacer un diseño industrial adecuado de los contenedores para almacenar los frutos bajo atmósfera de nitrógeno y de conseguir la autorización de estos recubrimientos comerciales en la normativa de elaboración de aceitunas de mesa, tanto nacional como internacional.

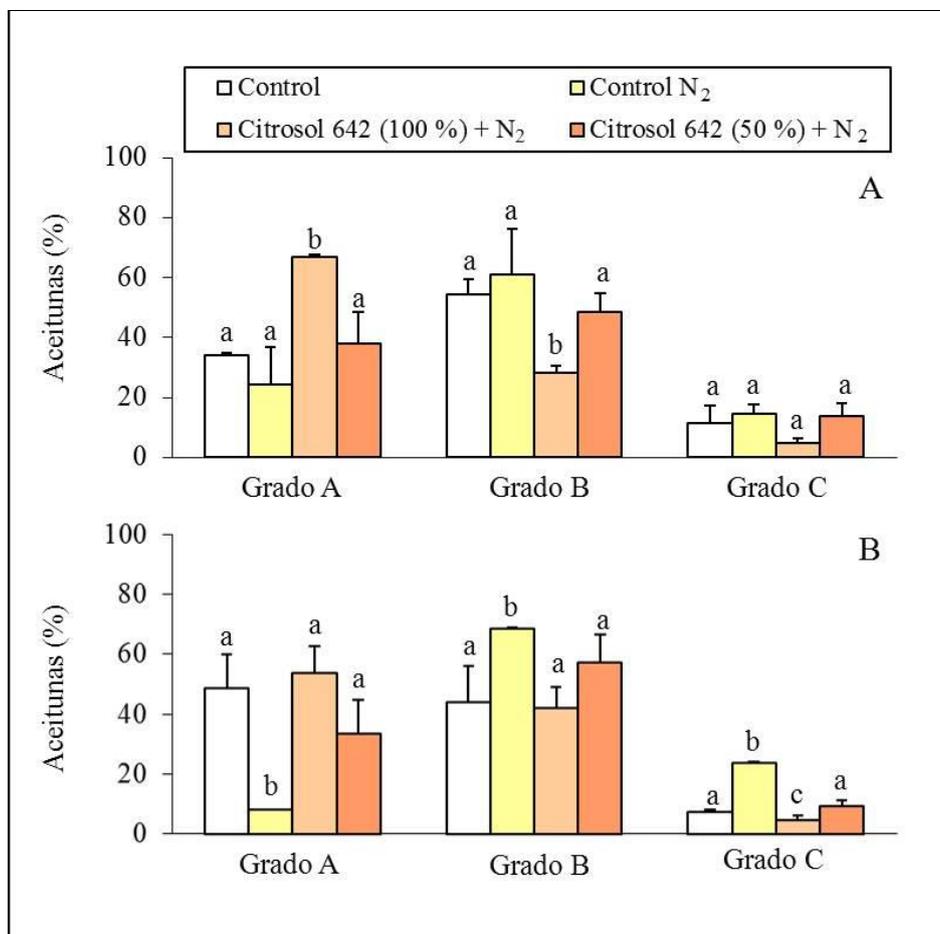
En los primeros capítulos de esta tesis se ha demostrado la gran variabilidad que existe entre partidas de aceitunas de una misma variedad. Para confirmar todos estos resultados, se ha realizado una nueva experiencia con dos partidas de aceitunas de dos fincas distintas recolectadas mecánicamente y las cuales se tratan con Citrosol 642 al 50 y al 100 %, antes de su almacenamiento bajo atmósfera de  $N_2$ . En esta ocasión se eliminó la opción de utilizar glicerol porque su efecto positivo no ha quedado demostrado eficazmente, incluso puede tener un efecto negativo y acelerar el desarrollo de manchas oscuras en las zonas golpeadas como hemos visto en la experiencia anterior.

En la Figura 31 podemos observar los resultados obtenidos con estas dos partidas de aceitunas. La aparición de manchas oscuras ocurre inmediatamente después de que las condiciones de anoxia desaparecen y cuando las aceitunas no son tratadas con ninguna solución de recubrimiento (control y control  $N_2$ ), ya que el porcentaje de aceitunas con grado C es elevado.

Por el contrario, las aceitunas recubiertas con Citrosol 642 muestran mayor porcentaje de frutos de grado A y menor porcentaje como grado B cuando se utiliza la solución al 100 %. También, se observa que el porcentaje de aceitunas con grado C es más bajo para las aceitunas recubiertas con Citrosol 642 con respecto a los otros tratamientos aplicados. Hay que destacar el alto porcentaje de aceitunas con grado C cuando se someten al tratamiento con  $N_2$  sin ningún recubrimiento, en particular para la partida B, lo cual nos vuelve a indicar que se acelera el oscurecimiento en la zona golpeada cuando se eliminan las condiciones de anoxia.

Lo importante de esta nueva tecnología es obtener aceitunas procesadas como verdes estilo español que tengan al menos la misma calidad que la obtenida en los frutos control, es decir, las aceitunas colocadas en NaOH directamente, lo cual ocurre en las dos partidas de aceitunas ensayadas cuando se tratan con los recubrimientos de Citrosol 642. Por tanto, estas soluciones comerciales pueden prevenir la formación de manchas oscuras una vez que se elimina la situación de anoxia y los frutos se exponen al aire incluso durante 15 minutos antes de ser sumergidos en la solución de NaOH para comenzar su procesado como aceitunas verdes estilo español. Parece ser que estas soluciones de recubrimiento forman una barrera en la piel de los frutos frente a la difusión del oxígeno hacia su interior.

**Figura 31.** Calidad de aceitunas Manzanilla verdes estilo español después de 8 meses en salmuera procedentes de dos fincas diferentes (A y B). Los frutos fueron recolectados mecánicamente y sumergidos en soluciones de Citrosol 642 a distinta concentración (50 y 100 %) durante 5 segundos antes de ser conservados bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 5 horas. Después del periodo de anoxia los frutos fueron expuestos al aire durante 15 minutos antes de ser tratados con la solución de NaOH. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. Las barras acompañadas con la misma letra para cada grado no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



Otros parámetros de calidad importantes a tener en cuenta son la textura y el color final desarrollado en los frutos procesados (Tabla 21). El efecto de la combinación del uso de un recubrimiento tipo Citrosol junto con un almacenamiento bajo atmósfera de N<sub>2</sub> sobre la textura de las aceitunas una vez que han sido procesadas y después de conservarse en salmuera durante 8 meses es diferente para la partida A y B.

**Tabla 21.** Valores de textura y parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) de aceitunas procesadas como verdes estilo español después de 8 meses en salmuera procedentes de dos fincas diferentes (A y B). Los frutos fueron recolectados mecánicamente y sumergidos en soluciones de Citrosol 642 a distinta concentración (50 y 100 %) durante 5 segundos antes de ser conservados bajo atmósfera de  $N_2$  durante 5 horas. Después del periodo de anoxia los frutos fueron expuestos al aire durante 15 minutos antes de ser tratados con la solución de NaOH. Valores acompañados con las mismas letras dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Textura (kN/100 g fruto deshuesado)		Color					
	A	B	$L^*$		$a^*$		$b^*$	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>Control</b>	2,43 (0,14)* a	1,40 (0,41) a	55,1 (1,2) a	56,4 (0,3) a	4,5 (0,1) a	3,9 (0,1) a	39,1 (2,7) a	39,1 (1,3) a
<b>Control <math>N_2</math></b>	1,82 (0,37) a	1,04 (0,12) a	56,6 (0,0) a	57,1 (0,8) a	4,8 (0,2) a	4,3 (0,0) a	41,5 (1,6) a	40,0 (1,1) a
<b>Citrosol 642 (100 %) + <math>N_2</math></b>	1,82 (0,10) a	1,35 (0,25) a	54,7 (0,0) a	55,8 (0,6) a	4,7 (0,4) a	4,2 (0,4) a	39,8 (0,1) a	40,1 (3,5) a
<b>Citrosol 642 (50 %) + <math>N_2</math></b>	1,77 (0,28) a	1,48 (0,11) a	55,1 (0,1) a	56,9 (0,6) a	4,8 (0,4) a	4,0 (0,0) a	40,4 (1,1) a	39,1 (0,6) a

\* Desviación estándar de duplicados

En la partida B la textura no se afecta por las soluciones de recubrimiento mientras que las aceitunas de la partida A puestas directamente en la solución de NaOH y después de la fermentación tienen mayores valores de textura que las almacenadas bajo nitrógeno con o sin recubrimiento, aunque estas diferencias no son significativas. Hay autores que afirman que las aceitunas recolectadas pierden firmeza cuando se exponen al aire (García y cols., 1995) aunque no existen datos en relación a las aceitunas cuando se someten a condiciones de anoxia. Sin embargo, se conoce que ni las condiciones de anoxia ni el uso de recubrimientos provocan pérdida de textura en otros productos alimentarios (Hernández-Muñoz y cols., 2008; Song y cols., 2009).

Otro punto a destacar es el efecto que pueden tener estos tratamientos sobre el color global de las aceitunas procesadas. Según los datos reflejados en la Tabla 22 el color no se afecta por el almacenamiento en N<sub>2</sub> ni por las soluciones de recubrimiento utilizadas. Los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) son similares, no existiendo diferencias significativas para todos los tratamientos aplicados, incluido el control.

En conclusión, se puede decir que el problema del golpeado y posterior formación de manchas oscuras que sufren las aceitunas cuando se recolectan de forma mecánica se debe a la acción de la PPO sobre los compuestos *o*-difenólicos, los cuales se oxidan y polimerizan, pudiéndose retrasar dichas reacciones mediante el almacenamiento de las aceitunas bajo atmósferas de N<sub>2</sub> para lo cual es recomendable recubrirlas previamente con soluciones concentradas de recubrimientos comerciales usados en alimentación, tales como por ejemplo el Citrosol 642, ampliamente utilizado para naranjas, entre otras frutas.

### **4.2.2. Aceitunas verdes estilo español y aceitunas verdes naturales en salmuera: importancia de las transformaciones enzimáticas de los compuestos fenólicos en el color de los frutos procesados**

Las aceitunas recolectadas con coloración verde amarillenta se elaboran bien tratándolas con NaOH (verdes estilo español) o se colocan directamente en salmuera (verdes naturales). En ambos casos se produce un producto final con una coloración distinta aunque hasta ahora nadie ha estudiado a qué se debe esta diferencia. Por ello, se ha planteado una experiencia con aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca

las cuales se someten a los dos tratamientos y se dejan almacenadas durante 6 meses a temperatura ambiente.

La evaluación de los parámetros químicos de las salmueras (Tabla 22) indican que la concentración de cloruro sódico es diferente dependiendo de los tratamientos aplicados, siendo más alta en las aceitunas preparadas al estilo español para ambas variedades. El rango se sitúa entre 5-6,8 % en todos los casos, concentraciones muy comunes para estas preparaciones (Garrido-Fernández y colbs., 1997). Con respecto al pH y la acidez libre existen grandes diferencias entre las dos variedades de aceitunas aunque no entre los distintos procesamientos. Las salmueras de la variedad Manzanilla tienen valores de acidez libre más elevados que las de Hojiblanca mostrando valores de pH más bajos. La alta acidez en aceitunas Manzanilla, independientemente del tipo de elaboración, es consecuencia de la fermentación láctica que ocurre espontáneamente dando lugar a un incremento en la acidez por encima de 0,5-1 % con disminuciones del pH por debajo de 4,5 unidades (Medina y colbs., 2008).

**Tabla 22.** Parámetros químicos de salmueras de aceitunas de la variedad Manzanilla y Hojiblanca elaboradas como verdes estilo español y verdes naturales después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Muestra		NaCl (%)	pH	Acidez libre (% ácido láctico)
Manzanilla	Verdes estilo español	6,8 (0,1)* a	3,8 (0,0) a	1,1 (0,0) a
	Verdes naturales	5,0 (0,2) b	3,7 (0,1) a	1,4 (0,1) b
Hojiblanca	Verdes estilo español	6,2 (0,3) a	4,8 (0,1) b	0,5 (0,1) c
	Verdes naturales	5,5 (0,2) b	4,4 (0,0) c	0,6 (0,1) c

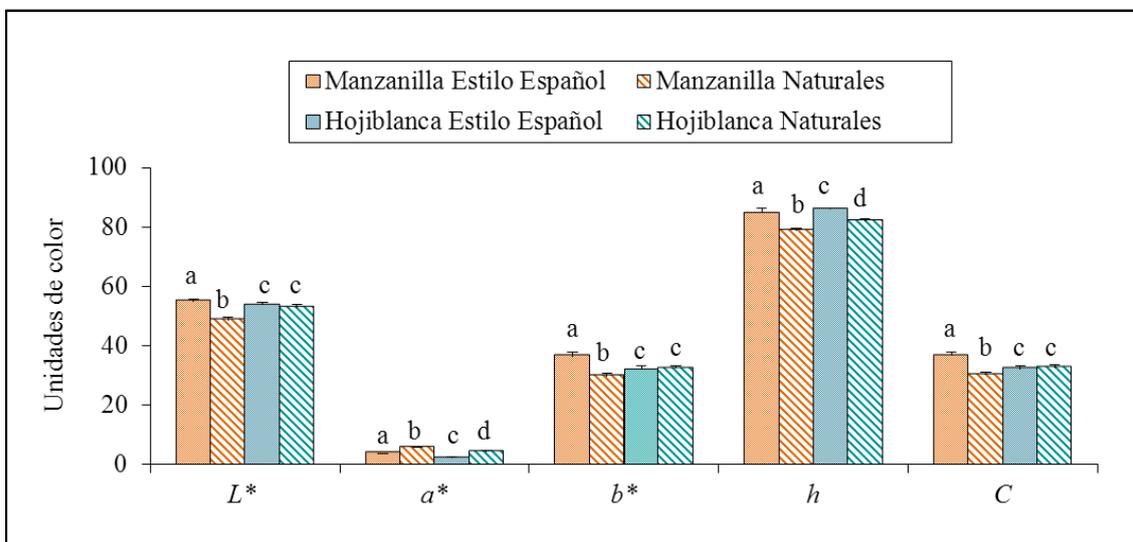
\* Desviación estándar de duplicados

En las aceitunas verdes naturales, el desarrollo de la fermentación láctica puede dificultarse debido a la presencia de inhibidores, tales como el HyEDA que posee

elevada actividad antibacteriana (Medina y cols., 2009), aunque también influye la concentración de sal entre otras variables. Las aceitunas de la variedad Manzanilla preparadas como verdes naturales fermentaron lácticamente y por el contrario, las Hojiblancas no tal como se muestra en la Tabla 22.

En tecnología de los alimentos es bien conocida la relación existente entre los valores de pH y el color en los alimentos (Montaño y cols., 1986). Normalmente un color claro en los alimentos se asocia con valores bajos de pH. En la experiencia llevada a cabo, tanto las observaciones visuales como las medidas colorimétricas muestran un color diferente en aceitunas con pH similar aunque sometidas a distintos procesamientos (Figura 32), y ello depende además de la variedad.

**Figura 32.** Parámetros colorimétricos de aceitunas de la variedad Manzanilla y Hojiblanca elaboradas como verdes estilo español y verdes naturales después de 6 meses en salmuera. Las barras de error indican la desviación estándar de las muestras por cuadruplicado. Columnas acompañadas con las mismas letras para cada parámetro colorimétrico no son diferentes estadísticamente según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



Después de seis meses de conservación, las aceitunas preparadas como verdes naturales, independientemente de la variedad, presentan valores inferiores en el parámetro  $L^*$  que las aceitunas verdes estilo español, diferencia que es significativa para las aceitunas de la variedad Manzanilla, lo que justificaría el desarrollo de coloraciones

más oscuras en las verdes naturales. Además, las aceitunas verdes naturales presentan valores más elevados en el parámetro  $a^*$  que las aceitunas verdes al estilo español. Los valores de  $h$  de estas aceitunas también son inferiores lo que justificaría el desarrollo de coloraciones más oscuras. Incluso, para la variedad Manzanilla, los valores del parámetro  $b^*$  y  $C$  son significativamente inferiores en aceitunas verdes naturales.

El color es un aspecto muy tenido en cuenta por los consumidores, los cuales aprecian el color amarillento de las aceitunas al estilo español rechazando colores oscuros como los desarrollados en aceitunas verdes naturales que hacen al producto menos atractivo. De este modo, los cambios de color que se producen en las aceitunas pueden estar relacionados con las transformaciones de los pigmentos presentes en los frutos.

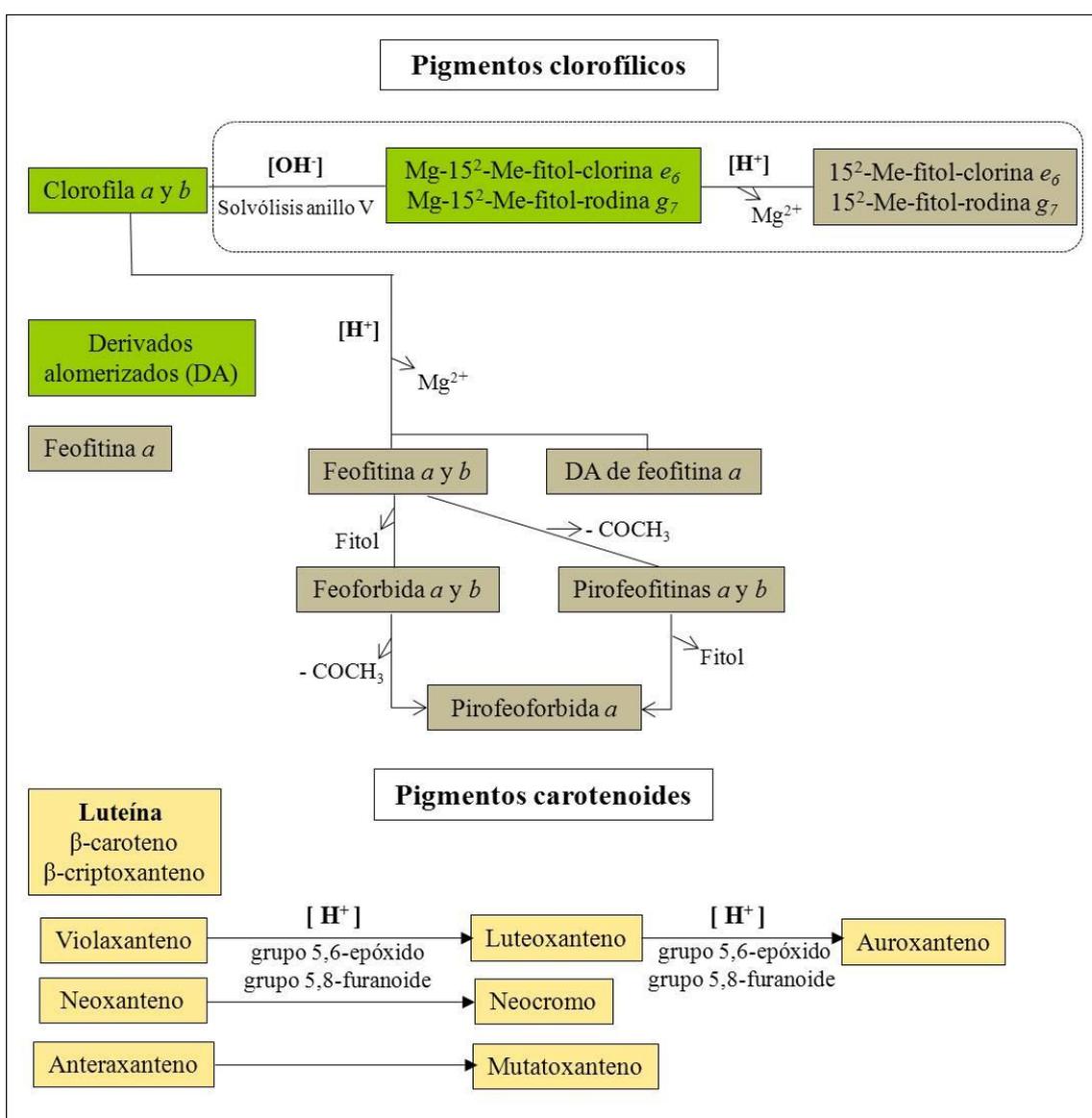
### **4.2.2.1. Evaluación de los compuestos clorofílicos de las aceitunas**

Es conocido que en estados de madurez tempranos, las aceitunas presentan colores verdes-amarillentos debidos a la presencia de las clorofilas  $a$  y  $b$  verdes, así como a los carotenoides que aportan el color amarillo a los frutos (Mínguez-Mosquera y Garrido- Fernández, 1989). Durante el procesamiento de las aceitunas de mesa verdes estilo español, las clorofilas se degradan a derivados que no contienen Mg en su estructura, responsables de los colores pardos que adquieren las aceitunas, mientras que los carotenoides que contienen grupos 5,6-epóxidos se transforman en derivados con grupos 5,8-furanoides (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995; Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1994) (Figura 33 y 34). Sin embargo, no existen estudios previos sobre las transformaciones que ocurren en los pigmentos en aceitunas verdes naturales ni su relación con el color final de los frutos.

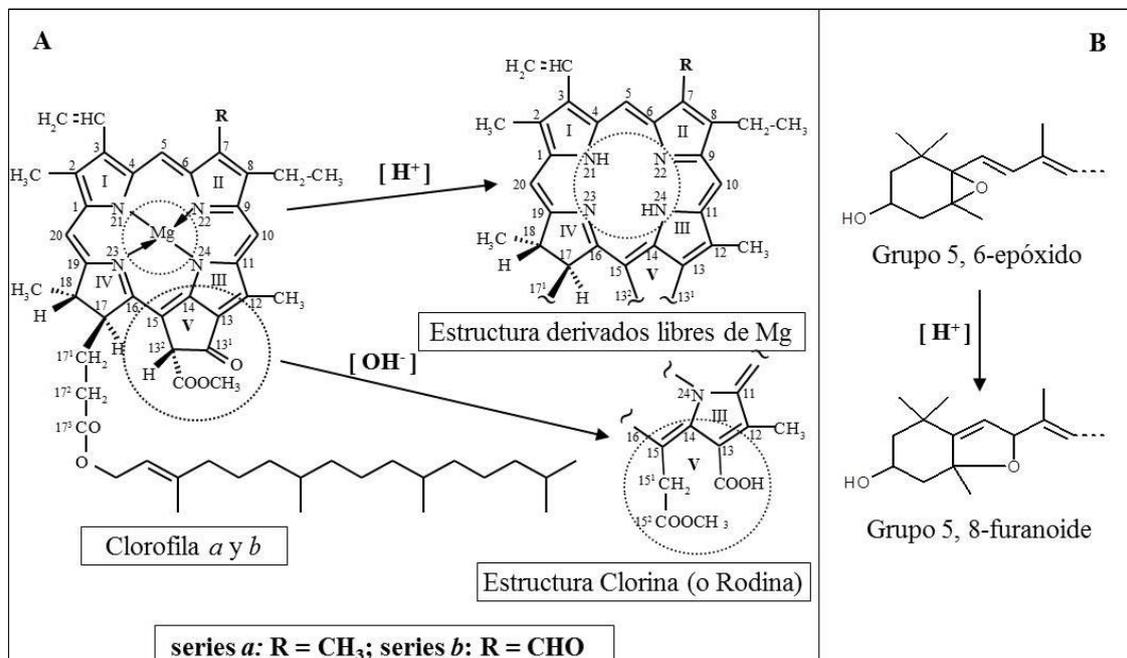
Se estudia la evolución de los compuestos cloroplásticos a lo largo del procesamiento como verdes estilo español y verdes naturales, así como en el fruto fresco en aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca (Tabla 23 y 24 respectivamente). El mecanismo de degradación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides se indica en la Figura 33. Como se puede observar, en las dos variedades estudiadas, el contenido de pigmentos cloroplásticos de los frutos es similar, aunque estudios previos muestran que la variedad Hojiblanca tiene mayor cantidad de

pigmentos en estados de maduración similares (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989).

**Figura 33.** Mecanismo de degradación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides durante el procesado como aceitunas verdes estilo español y verdes naturales. Los pigmentos clorofílicos incluidos en el rectángulo con línea discontinúa son los formados durante el procesamiento de las aceitunas verdes al estilo español, y el resto se forman durante los dos procesamientos. El color de los recuadros corresponde a las coloraciones que dan lugar cada pigmento.



**Figura 34.** (A) Estructura de la clorofila *a* y *b*, sus derivados libres de Mg y sus derivados con un anillo isocíclico (V) (estructura clorina o rodina). (B) Estructura comparativa entre los carotenoides con grupo 5,6-epóxido y grupo 5,8-furanoide.



La transformación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides que tienen lugar durante el procesamiento de las aceitunas como verdes estilo español y verdes naturales es similar en ambas variedades. En aceitunas preparadas al estilo español, la primera medida se hizo tres días después del tratamiento alcalino. Además de los pigmentos clorofílicos inicialmente presentes en el fruto fresco, clorofilas *a* y *b*, sus derivados alomerizados (DA) y feofitina *a* (compuesto que no contiene Mg<sup>2+</sup> en su estructura), se forman nuevos derivados, con Mg<sup>2+</sup> en el anillo de porfirina de la molécula pero con estructura clorina (series *a*) y rodina (series *b*) (éster Mg-15<sup>2</sup>-Me-fitol-clorina *e*<sub>6</sub> y éster Mg-15<sup>2</sup>-Me-fitol-rodina *g*<sub>7</sub>). También son DA, ya que se forman mediante oxidación del C-13<sup>2</sup> causada por la solvólisis del anillo (V), aunque se tratan de forma separada, como derivados clorofílicos con estructura clorina o rodina. Estos compuestos también se forman durante el procesamiento de aceitunas de la variedad Gordal procesadas como verdes estilo español durante la oxidación alcalina de las clorofilas (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995).

**Tabla 23.** Cambios en la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides ( $\mu\text{M}$ ) durante el procesado de aceitunas de la variedad Manzanilla como verdes estilo español y verdes naturales. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar de triplicados para el fruto fresco y de cuadruplicados para las aceitunas procesadas. (DA: derivados alomerizados; n.d.: no detectado)

		Manzanilla													
		Estilo español						Naturales							
		FF		3 d		60 d		180 d		FF		60 d		180 d	
<b>Pigmentos clorofílicos</b>	Clorofila a	71,12	(2,03)	66,08	(8,01)	1,64	(0,08)	0,74	(0,29)	71,12	(2,03)	2,45	(0,94)	1,74	(0,43)
	DA clorofila a	2,02	(0,26)	7,96	(1,95)	0,12	(0,09)	n.d.		2,02	(0,26)	0,17	(0,04)	0,18	(0,06)
	Mg-15 <sup>2</sup> -Me-fitol-clorina e <sub>6</sub>	n.d.		5,92	(1,14)	0,17	(0,01)	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	Clorofila b	19,01	(0,19)	14,65	(1,35)	2,17	(0,16)	0,69	(0,17)	19,01	(0,19)	4,44	(1,69)	3,15	(0,39)
	DA clorofila b	0,36	(0,10)	1,15	(0,18)	0,12	(0,01)	n.d.		0,36	(0,10)	0,15	(0,05)	0,15	(0,04)
	Mg-15 <sup>2</sup> -Me-fitol-rodina g <sub>7</sub>	n.d.		2,71	(0,55)	0,28	(0,03)	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	Feofitina a	2,49	(0,47)	1,30	(0,51)	60,53	(2,91)	53,55	(2,25)	2,49	(0,47)	64,76	(3,92)	81,95	(3,26)
	DA feofitina a	n.d.		n.d.		0,54	(0,05)	0,55	(0,11)	n.d.		n.d.		0,08	(0,01)
	15 <sup>2</sup> -Me-fitol-clorina e <sub>6</sub>	n.d.		1,16	(0,18)	9,02	(0,39)	3,85	(0,17)	n.d.		n.d.		n.d.	
	Pirofeofitina a	n.d.		0,30	(0,12)	4,13	(0,13)	3,65	(0,40)	n.d.		0,61	(0,04)	1,31	(0,07)
	Feofoforbida a	n.d.		n.d.		0,72	(0,06)	0,67	(0,07)	n.d.		1,15	(0,04)	1,72	(0,12)
	Pirofeoforbida a	n.d.		n.d.		0,41	(0,01)	0,34	(0,05)	n.d.		0,05	(0,01)	n.d.	
	Feofitina b	n.d.		n.d.		13,62	(1,53)	12,10	(1,08)	n.d.		15,79	(1,13)	20,51	(0,85)
	DA feofitina b	n.d.		n.d.		n.d.		0,14	(0,05)	n.d.		n.d.		0,13	(0,02)
	15 <sup>2</sup> -Me-fitol-rodina g <sub>7</sub>	n.d.		n.d.		5,00	(0,75)	3,10	(0,21)	n.d.		n.d.		n.d.	
Pirofeofitina b	n.d.		n.d.		0,84	(0,10)	0,58	(0,08)	n.d.		n.d.		n.d.		
Feofoforbida b	n.d.		n.d.		0,03	(0,00)	0,03	(0,01)	n.d.		0,06	(0,04)	0,11	(0,02)	
<b>Pigmentos carotenoides</b>	$\beta$ -Caroteno	6,20	(0,82)	6,54	(0,56)	7,69	(0,37)	6,39	(0,42)	6,20	(0,82)	7,42	(0,18)	7,18	(0,31)
	Luteína	11,33	(1,87)	12,09	(1,77)	13,20	(2,45)	10,94	(1,24)	11,33	(1,87)	12,48	(2,80)	14,09	(0,78)
	Anteraxanteno	0,44	(0,04)	0,87	(0,11)	n.d.		n.d.		0,44	(0,04)	n.d.		n.d.	
	Mutatoxanteno	n.d.		n.d.		1,43	(0,24)	1,29	(0,27)	n.d.		0,54	(0,16)	0,59	(0,04)
	Violaxanteno	3,53	(0,29)	2,79	(0,71)	0,49	(0,12)	0,55	(0,14)	3,53	(0,29)	0,25	(0,07)	0,31	(0,05)
	Luteoxanteno	n.d.		n.d.		0,28	(0,07)	0,08	(0,06)	n.d.		0,08	(0,03)	0,07	(0,01)
	Auroxanteno	n.d.		n.d.		1,24	(0,42)	1,11	(0,15)	n.d.		1,12	(0,31)	1,07	(0,29)
	Neoxanteno	3,22	(0,27)	4,02	(0,67)	n.d.		n.d.		3,22	(0,27)	n.d.		n.d.	
	Neocromo	n.d.		n.d.		2,39	(0,52)	2,16	(0,36)	n.d.		2,10	(0,63)	2,58	(0,17)

**Tabla 24.** Cambios en la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides ( $\mu\text{M}$ ) durante el procesado de aceitunas de la variedad Hojiblanca como verdes estilo español y verdes naturales. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar de triplicados para el fruto fresco y de cuadruplicados para las aceitunas procesadas. (DA: derivados alomerizados; n.d.: no detectado)

		Hojiblanca													
		Estilo español						Naturales							
		FF		3 d		60 d		180 d		FF		60 d		180 d	
<b>Pigmentos clorofílicos</b>	Clorofila a	64,17	(1,10)	57,76	(6,43)	7,88	(0,13)	2,10	(0,59)	64,17	(1,10)	8,29	(2,55)	5,72	(0,89)
	DA clorofila a	1,38	(0,45)	11,45	(4,18)	1,20	(0,60)	0,32	(0,26)	1,38	(0,45)	1,17	(0,46)	0,52	(0,21)
	Mg-15 <sup>2</sup> -Me-fitol-clorina e <sub>6</sub>	n.d.		8,04	(0,98)	0,54	(0,07)	0,46	(0,18)	n.d.		n.d.		n.d.	
	Clorofila b	17,95	(0,68)	10,64	(1,88)	5,86	(0,09)	2,17	(0,54)	17,95	(0,68)	9,88	(2,33)	7,19	(0,18)
	DA clorofila b	1,11	(0,17)	2,58	(1,49)	0,70	(0,22)	0,32	(0,15)	1,11	(0,17)	0,79	(0,41)	0,52	(0,27)
	Mg-15 <sup>2</sup> -Me-fitol-rodina g <sub>7</sub>	n.d.		2,10	(0,96)	1,44	(0,02)	0,59	(0,08)	n.d.		n.d.		n.d.	
	Feofitina a	1,94	(0,21)	1,27	(0,28)	36,45	(2,33)	50,96	(9,85)	1,94	(0,21)	55,61	(5,96)	76,79	(1,12)
	DA feofitina a	n.d.		n.d.		0,97	(0,21)	0,03	(0,05)	n.d.		n.d.		n.d.	
	15 <sup>2</sup> -Me-fitol-clorina e <sub>6</sub>	n.d.		1,18	(0,26)	10,60	(0,94)	8,15	(0,79)	n.d.		n.d.		n.d.	
	Pirofeofitina a	n.d.		0,32	(0,10)	4,18	(0,39)	5,18	(0,85)	n.d.		0,35	(0,05)	1,10	(0,05)
	Feoforbida a	n.d.		n.d.		0,45	(0,02)	0,70	(0,13)	n.d.		1,56	(0,10)	1,91	(0,73)
	Pirofeoforbida a	n.d.		n.d.		0,37	(0,04)	0,49	(0,11)	n.d.		n.d.		n.d.	
	Feofitina b	n.d.		n.d.		3,64	(0,15)	8,52	(1,92)	n.d.		9,44	(1,15)	16,44	(0,42)
	DA feofitina b	n.d.		n.d.		n.d.		0,14	(0,09)	n.d.		n.d.		0,10	(0,08)
	15 <sup>2</sup> -Me-fitol-rodina g <sub>7</sub>	n.d.		n.d.		4,49	(0,44)	5,01	(0,61)	n.d.		n.d.		n.d.	
Pirofeofitina b	n.d.		n.d.		n.d.		0,65	(0,13)	n.d.		n.d.		n.d.		
Feoforbida b	n.d.		n.d.		n.d.		0,04	(0,02)	n.d.		0,04	(0,02)	0,11	(0,03)	
<b>Pigmentos carotenoides</b>	$\beta$ -Caroteno	7,26	(1,37)	6,85	(0,57)	6,70	(0,39)	5,99	(0,68)	7,26	(1,37)	6,36	(0,29)	7,20	(0,11)
	Luteína	12,07	(0,87)	12,62	(1,95)	12,05	(0,45)	13,13	(1,81)	12,07	(0,87)	14,55	(1,65)	13,54	(2,65)
	Anteraxanteno	0,27	(0,05)	0,85	(0,08)	n.d.		n.d.		0,27	(0,05)	n.d.		n.d.	
	Mutatoxanteno	n.d.		n.d.		1,00	(0,23)	0,89	(0,17)	n.d.		0,42	(0,16)	0,40	(0,08)
	Violaxanteno	2,35	(0,25)	1,86	(0,47)	0,59	(0,07)	0,47	(0,08)	2,35	(0,25)	0,31	(0,10)	0,31	(0,06)
	Luteoxanteno	n.d.		n.d.		0,25	(0,01)	0,25	(0,04)	n.d.		0,16	(0,04)	0,11	(0,03)
	Auroxanteno	n.d.		n.d.		0,71	(0,06)	1,07	(0,12)	n.d.		0,87	(0,36)	1,17	(0,27)
	Neoxanteno	2,71	(0,22)	4,12	(0,68)	2,34	(0,23)	n.d.		2,71	(0,22)	1,37	(0,60)	n.d.	
	Neocromo	n.d.		n.d.		0,61	(0,10)	2,34	(0,42)	n.d.		1,57	(0,63)	2,54	(0,57)

Aparte de los compuestos citados, también empiezan a aparecer en este muestreo inicial los derivados libres de  $Mg^{2+}$  con estructura clorina ( $15^2$ -Me-fitol-clorina  $e_6$ ) y pirofeofitina  $a$ , y se produce un aumento en los DA de las clorofilas  $a$  y  $b$ . Sin embargo, en la fracción de carotenoides no se observan cambios en la composición cualitativa, siguen estando presentes los mismos compuestos que en el fruto fresco, luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxanteno, neoxanteno, anteraxanteno y  $\beta$ -criptoxanteno, y solo se producen algunas variaciones cuantitativas en el contenido de xantofilas minoritarias. Los carotenoides citados son compuestos estables al hidróxido sódico (Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995) por lo que los pequeños cambios que se observan pueden deberse a la variabilidad de la materia prima.

Después de dos meses del tratamiento con hidróxido sódico, aparecen compuestos nuevos, todos ellos DA sin  $Mg^{2+}$  y carotenoides con grupo 5,6-epóxido en su estructura que se forman como consecuencia del pH ácido generado durante la fermentación láctica. En las clorofilas el pH ácido permite que se lleve a cabo la reacción de feofitinización, que da lugar al reemplazamiento del  $Mg^{2+}$  por  $2H^+$  en el anillo porfirina de la molécula de clorofila, mientras que en los carotenoides con grupo 5,6-epóxido en su estructura, el pH ácido causa la reorganización del grupo hasta 5,8-furanoide. La mayoría de los compuestos formados en esta etapa son feofitinas  $a$  y  $b$ , derivados libres de  $Mg^{2+}$  con estructura clorina o rodina ( $15^2$ -Me-fitol-clorina  $e_6$  y  $15^2$ -Me-fitol-rodina  $g_7$ ) y pirofeofitina  $a$ . Además, se detectan pirofeofitina  $b$ , DA de feofitina  $a$ , y derivados defitilados (feoforbidas  $a$  y  $b$ , y pirofeoforbida  $a$ ). Estos cambios se mantienen hasta el final de la fermentación (180 días), desapareciendo casi por completo las clorofilas  $a$  y  $b$  del fruto fresco y cualquier derivado alomerizado con  $Mg^{2+}$  en su estructura que se originara durante el tratamiento alcalino.

Aunque los cambios que se producen en los pigmentos cloroplásticos son esencialmente los mismos en ambas variedades, existe una diferencia significativa en el porcentaje de derivados de clorofila con estructura clorina y rodina. El porcentaje de compuestos libres de  $Mg^{2+}$  al final del procesado como verdes estilo español en la variedad Manzanilla representa un porcentaje inferior que para la Hojiblanca. Para ambas variedades, las condiciones del tratamiento alcalino son las mismas, por lo que las diferencias en el porcentaje de derivados pueden deberse a las características de cada variedad.

Cuando las aceitunas se procesan como verdes naturales, la mayoría de las transformaciones que tienen lugar se deben al pH ácido que se genera durante la fermentación, y no a los derivados clorofílicos con estructura clorina o rodina. Las aceitunas verdes estilo español y las naturales tienen distinto perfil de pigmentos, en aceitunas naturales se forman menor cantidad de derivados clorofílicos. Sin embargo, en ambos tipos, al final del proceso todos los pigmentos clorofílicos presentes son derivados libres de  $Mg^{2+}$ . La presencia de  $Mg^{2+}$  en el grupo cromóforo de los compuestos clorofílicos es responsable de las coloraciones verdes de los pigmentos y cuando el  $Mg^{2+}$  es sustituido por  $2H^+$  se producen cambios de coloración de tonos grises (series *a*) a verdes pardos (series *b*).

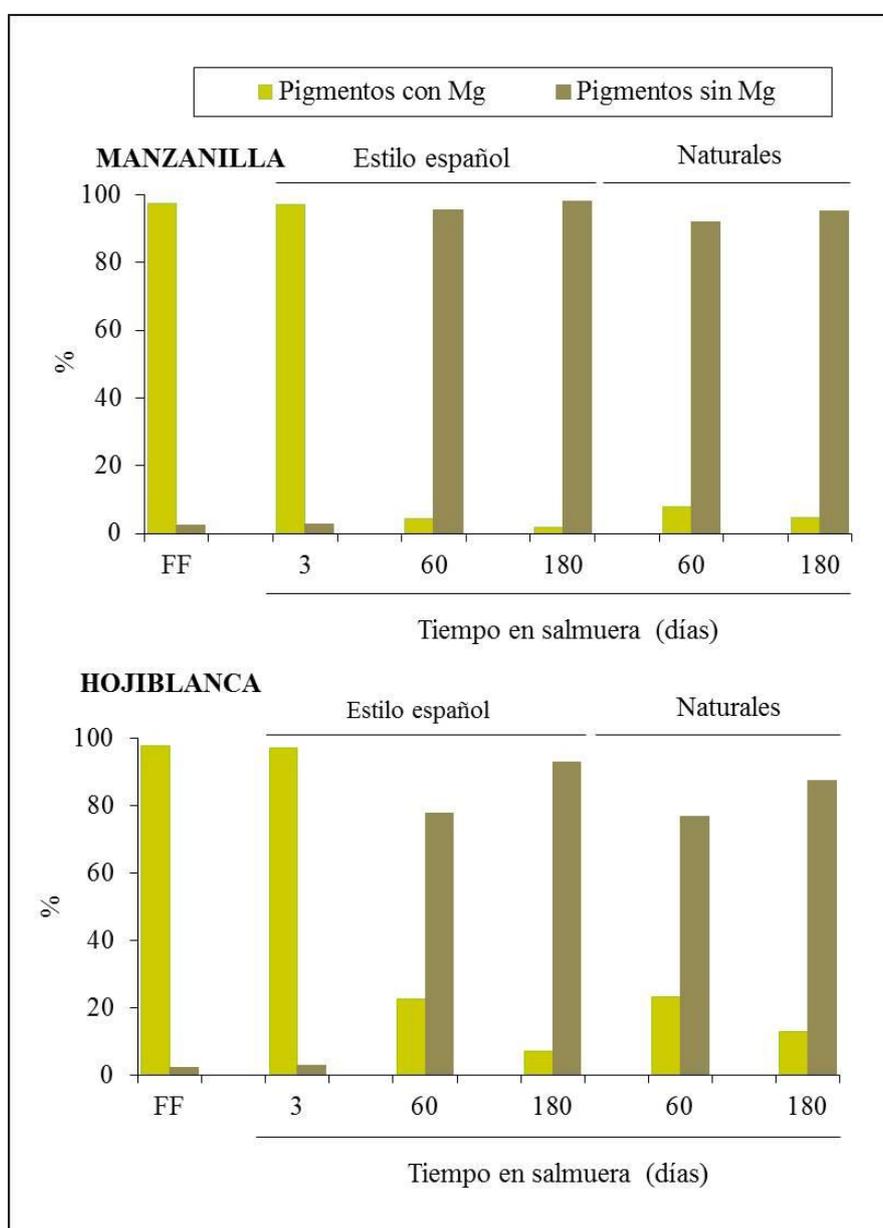
En la fracción de carotenoides no se aprecian diferencias entre los distintos procesamientos, aunque sí ligeras diferencias entre variedades. La transformación de neoxanteno a neocromo es más rápida en la variedad Manzanilla que en la Hojiblanca, en la cual permanece neoxanteno después de 2 meses de almacenamiento en ambas preparaciones, lo cual podría relacionarse con la baja fermentación ocurrida en la Hojiblanca y al pH más elevado.

Por otra parte, para comparar la contribución de las clorofilas al color final de las aceitunas procesadas para ambas variedades y preparaciones, se agrupan las clorofilas en las que tienen color verde (clorofilas con  $Mg^{2+}$ ) y las que tienen tonos marrones-grisáceos (derivados clorofílicos sin  $Mg^{2+}$ ). Los carotenoides no se tienen en cuenta, ya que los cambios que se producen son similares en ambas preparaciones. Como se observa en la Figura 35 existe una composición similar en los dos tipos de procesamientos para cada variedad. En la variedad Manzanilla la reacción de feofitización termina a los dos meses del procesado tanto para verdes estilo español como para verdes naturales, tras la cual el 98 y 95 % respectivamente del total de pigmentos clorofílicos son libres de  $Mg^{2+}$ .

En la variedad Hojiblanca la reacción es más lenta, después de dos meses alrededor del 77 % de los pigmentos clorofílicos son derivados libres de  $Mg^{2+}$  para ambas preparaciones, mientras que el 23 % restante contienen  $Mg^{2+}$  en su estructura. Con el tiempo los derivados libres de  $Mg^{2+}$  aumentan hasta el 93 % para aceitunas verdes estilo español y hasta el 88 % para aceitunas procesadas como verdes naturales.

Además, en las aceitunas Hojiblanca existe una mayor proporción de compuestos clorofílicos con  $Mg^{2+}$  que en aceitunas Manzanilla, por lo que la menor velocidad de transformación de las clorofilas en las aceitunas Hojiblancas podría explicarse por la menor acidez libre y mayores valores de pH, al igual que ocurre para las xantofilas con grupo 5,6-epóxido.

**Figura 35.** Cambios en el porcentaje de pigmentos clorofílicos que contienen Mg (barras verdes) y sin Mg en su estructura (barras marrones) con respecto al total de pigmentos clorofílicos, durante el procesamiento de aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca como verdes estilo español y verdes naturales.



En resumen podemos decir que la concentración de cada grupo de pigmentos presenta algunas diferencias entre las aceitunas verdes estilo español y naturales para ambas variedades, Manzanilla y Hojiblanca. Las aceitunas verdes naturales tienen mayor concentración de pigmentos verdes al final del almacenamiento (180 d), sin embargo son las que más se oscurecen, por lo que el oscurecimiento en este tipo de preparación puede deberse a otros compuestos presentes en el fruto como son los compuestos fenólicos y no a los pigmentos cloroplásticos (Ramírez y cols., 2015a).

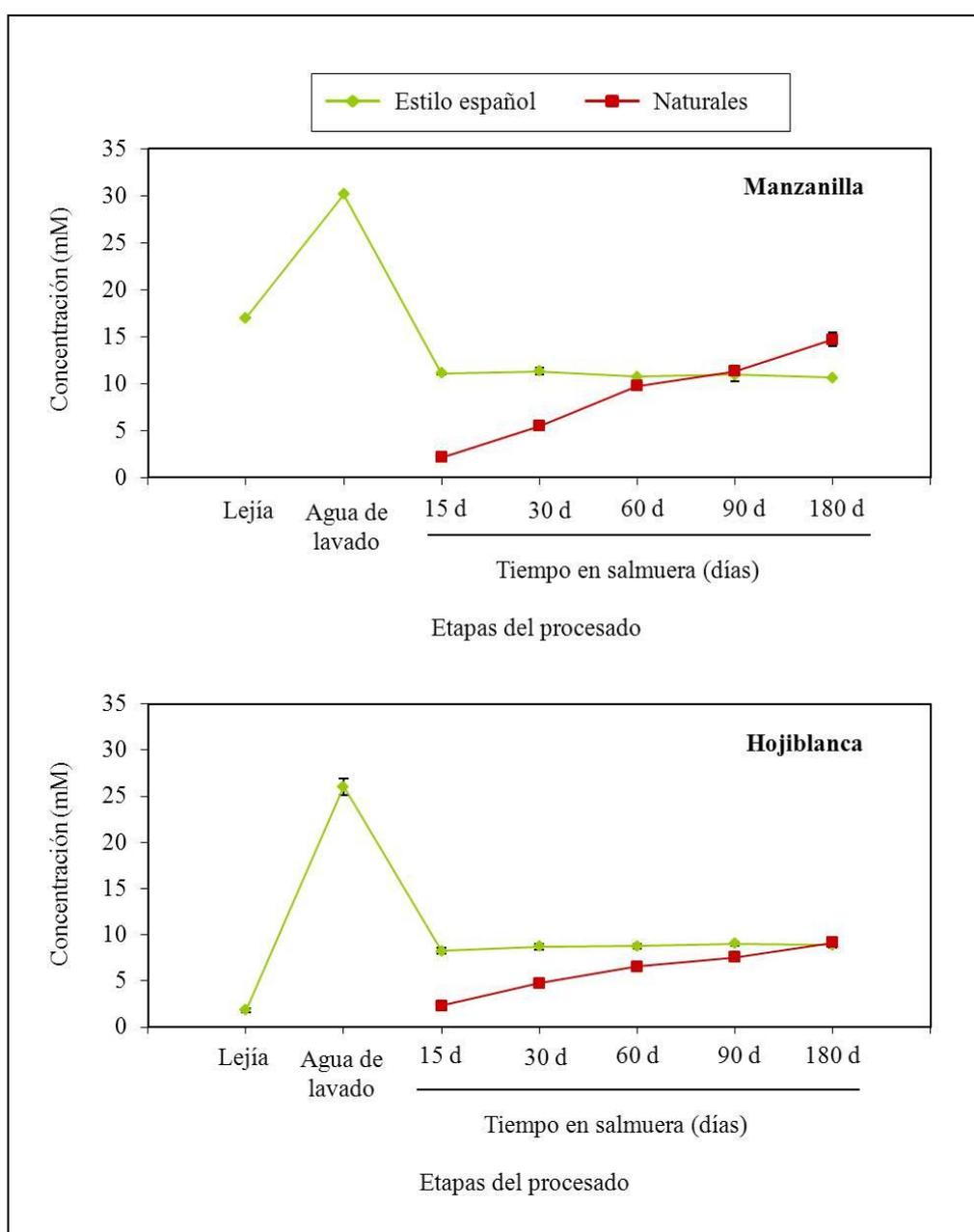
### 4.2.2.2. Evaluación del contenido fenólico y actividad PPO

También se ha estudiado la influencia de los dos tratamientos utilizados para el procesamiento de las aceitunas sobre el contenido de los compuestos fenólicos, puesto que, como se ha comentado anteriormente, las aceitunas verdes naturales poseen un color más oscuro a pesar de tener una mayor concentración en pigmentos verdes. El pardeamiento que sufren las aceitunas puede deberse a la oxidación enzimática de los *o*-difenoles. Sciancalepore y Longone (1984) encontraron una correlación positiva entre la velocidad de oscurecimiento en los frutos frescos y la actividad de la enzima PPO endógena.

En la Figura 36 se recoge la concentración en *o*-difenoles durante el procesamiento de las aceitunas. El tratamiento de las aceitunas con hidróxido sódico para la elaboración de aceitunas verdes al estilo español da lugar a una rápida difusión de los polifenoles presentes en la pulpa de las aceitunas hacia la solución alcalina (lejía), agua de lavado y salmuera. El tratamiento con hidróxido sódico provoca la ruptura de los tejidos favoreciendo la difusión de los compuestos fenólicos hacia el exterior (Rodríguez-Borbolla y cols., 1956). La concentración de *o*-difenoles se equilibra pasados 15 días del tratamiento con la lejía, como ha sido indicado por otros autores (Medina y cols., 2008). Por el contrario, en las aceitunas no tratadas con álcali (aceitunas verdes naturales), la baja permeabilidad de la aceituna fresca hace que la difusión de estas sustancias sea más lenta y el contenido de *o*-difenoles totales encontrado en la salmuera hasta los 60 días de la fermentación sea menor. Sin embargo, después de 6 meses de fermentación, e independientemente de la variedad, la concentración de *o*-difenoles en la salmuera de conservación para ambas preparaciones

es similar, e incluso más elevada en aceitunas verdes naturales de la variedad Manzanilla.

**Figura 36.** Concentración de *o*-difenoles totales (mM) presentes en las soluciones generadas durante el procesado de aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca como verdes estilo español y verdes naturales. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. Los *o*-difenoles analizados son: hidroxitirosol, hidroxitirosol 1-glucósido, ácido cafeico, verbascósido, HyEDA, oleuropeína y éster de ácido cafeico unido a secologanósido.



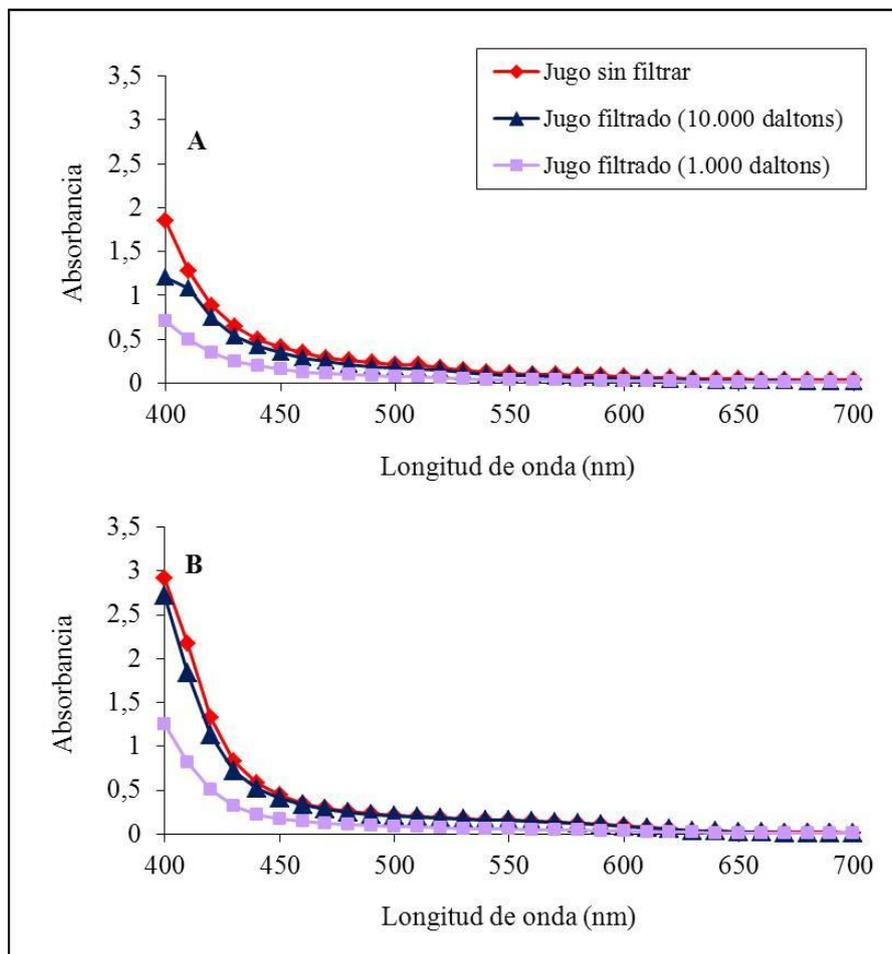
Los polifenoles se encuentran frecuentemente en alimentos como fenoles simples, aunque también pueden formar parte de los polímeros que son responsables del pardeamiento. En este sentido, con el objetivo de conocer la causa del color oscuro de las aceitunas verdes naturales en salmuera y considerando la alta hidrosolubilidad de estos polímeros, se consideró interesante evaluar el color de los jugos de las aceitunas fermentadas durante 6 meses. Por ello, se filtraron los mismos por distintos tamaños de diámetro de poro (10.000 y 1.000 daltons) y posteriormente, se midió la absorbancia entre 400 y 700 nm.

Los valores de absorbancia se encuentran representados en la Figura 37. El jugo de aceitunas verdes naturales es más oscuro y presenta valores de absorbancia mayores que el procedente de aceitunas verdes al estilo español. Sin embargo, el color de ambos jugos disminuye cuando son filtrados, reduciéndose la absorbancia a 400 nm a más de la mitad cuando se usan filtros de menor tamaño de poro (1.000 daltons).

En vista de estos resultados, podemos concluir que el color de los jugos se debe mayoritariamente a las sustancias poliméricas con un tamaño superior a 1.000 daltons, las cuales pueden tener naturaleza polifenólica como las que ya han sido encontradas en las salmueras de aceitunas verdes al estilo español (Brenes y cols., 1988). Por tanto, el oscurecimiento observado en aceitunas verdes naturales es probablemente el resultado de una oxidación enzimática o química de los compuestos *o*-difenólicos presentes en los frutos de ambas variedades (Ramírez y cols., 2015a).

Consecuentemente, nos planteamos estudiar la participación de la enzima PPO endógena de los frutos en la formación de los polímeros oscuros que se forman en las aceitunas procesadas. Se midió la actividad PPO de frutos de la variedad Hojiblanca antes y después del tratamiento con hidróxido sódico. La actividad PPO de los frutos frescos es  $0,87 \pm 0,03$  U/mL e.e., no detectándose actividad en los frutos después del tratamiento con hidróxido sódico, ya que la enzima se inactiva. Por el contrario, las aceitunas verdes naturales siguen presentando actividad PPO después de 15 días en salmuera ( $0,13 \pm 0,04$  U/mL e.e.). Sin embargo, no se detecta actividad PPO después de estar los frutos un mes en salmuera, a pesar de que existen indicios de la existencia de actividad de esta enzima en frutos verdes conservados en salmuera durante 6 meses (García y cols., 2008).

**Figura 37.** Espectros de absorción de 400-700 nm de jugos de aceitunas verdes al estilo español (A) y verdes naturales (B) fermentadas durante 6 meses. Los jugos se extrajeron por presión y se filtraron a través de filtros de distinto tamaño de diámetro de poro.



De otra parte, en estas aceitunas verdes naturales se observa un oscurecimiento superficial al ponerlas en contacto con el aire por lo que debe existir una mínima concentración de PPO que sea la responsable de este oscurecimiento. Además, en la industria es muy común observar como las aceitunas que se encuentran en la boca del fermentador y que están más en contacto con el aire están más oscuras. Se hizo un experimento con los extractos enzimáticos procedentes de las aceitunas que llevan un mes en salmuera, se dializaron y posteriormente se liofilizaron con el objetivo de concentrar la posible PPO existente en estas muestras. Los resultados obtenidos indicaron que existe una pequeña actividad PPO cuando los extractos enzimáticos se concentran, lo que confirma que el oscurecimiento en las aceitunas puede deberse a la baja actividad PPO existente.

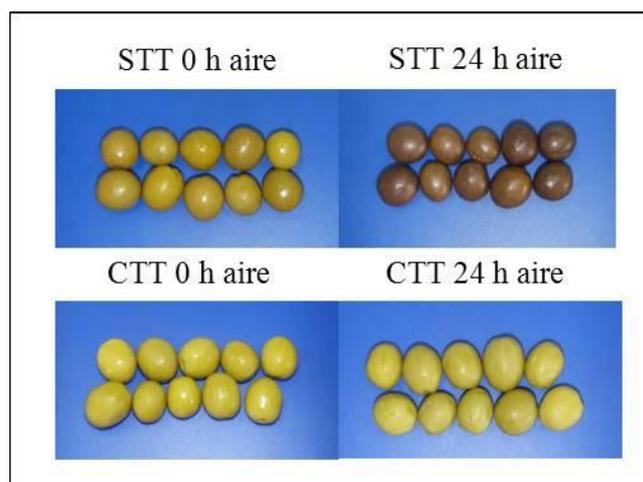
A la vista de los resultados obtenidos, se diseñó una nueva experiencia para aclarar el origen de los polímeros oscuros formados durante el almacenamiento de las aceitunas verdes naturales. Parte de las aceitunas de la variedad Manzanilla se trataron térmicamente (90 °C/30 minutos), para desnaturalizar las enzimas oxidasas. Todos los frutos (los tratados y no térmicamente) se pusieron en una salmuera con el 5 % de cloruro sódico y 0,5 % de ácido acético bajo condiciones asépticas para impedir la interferencia de los microorganismos y se analizó la actividad PPO. El fruto fresco presenta  $5,82 \pm 0,04$  U/mL e.e. mientras que en los frutos calentados no se detecta actividad PPO.

Después de un mes de almacenamiento se abren los botes de aceitunas asépticas, tanto las tratadas térmicamente como las no tratadas, y se evalúa inmediatamente el color de la piel de los frutos. Posteriormente, las aceitunas se dejan al aire durante 24 horas y se mide el color de nuevo. En la Figura 38 se observa las diferencias de color entre las aceitunas tratadas o no térmicamente después de la exposición durante 24 horas al aire. Las aceitunas en salmuera no sometidas al tratamiento térmico tienen un color ligeramente más oscuro que las que se han sometido al calentamiento, aunque las diferencias de color se ven claramente cuando las aceitunas se dejan durante 24 horas al aire, observándose un oscurecimiento muy intenso en las aceitunas no tratadas térmicamente, mientras que en las calentadas aparentemente el color sigue siendo el mismo que cuando estaban en la salmuera, antes de exponerlas al aire.

Además, en la Tabla 24 se puede ver que existen diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de color a las 0 y 24 horas en las aceitunas no calentadas. Se observa para estas aceitunas una considerable disminución de los parámetros  $L^*$  y  $h$ , que coincide con un severo oscurecimiento de la superficie de las mismas. El parámetro  $a^*$  no cambia drásticamente y el parámetro  $b^*$  presenta una disminución muy acusada, al igual que el parámetro  $C$ . A tiempo 0, los parámetros colorimétricos en aceitunas tratadas térmicamente son más elevados que en aceitunas no tratadas, excepto para el parámetro  $a^*$  que muestra un valor significativo menor. Este resultado puede estar asociado a la reacción de feofitinización que ocurre sobre los pigmentos clorofílicos durante los tratamientos de calor en los alimentos. Sin lugar a duda, los resultados obtenidos después de las 24 horas de exposición al aire de los frutos

indican que el oscurecimiento en las aceitunas podría asociarse con las reacciones enzimáticas que tienen lugar entre los compuestos fenólicos y las enzimas oxidativas.

**Figura 38.** Cambios en el color de aceitunas Manzanillas no sometidas a un tratamiento térmico (STT) y tratadas térmicamente (CTT). Los frutos fueron almacenados en condiciones asépticas un mes en salmuera, transcurrido este tiempo se abrieron los recipientes y las aceitunas se dejaron al aire durante 24 horas.



**Tabla 25.** Cambios en los parámetros colorimétricos en la piel de aceitunas Manzanillas calentadas y no calentadas. Los frutos fueron almacenados en condiciones asépticas y almacenados un mes en salmuera, transcurrido este tiempo se abrieron los recipientes y se dejaron las aceitunas al aire durante 24 horas. Las diferentes letras en cada parámetro colorimétrico indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Parámetros de color	Aceitunas no calentadas		Aceitunas calentadas	
	0 h	24 h	0 h	24 h
<i>L*</i>	50,4 (0,3)* a	33,5 (1,3) b	52,3 (0,4) c	51,6 (0,6) c
<i>a*</i>	5,5 (0,2) a	5,2 (0,1) b	1,2 (0,2) c	1,2 (0,2) c
<i>b*</i>	34,7 (0,9) a	9,1 (1,0) b	38,3 (0,9) c	34,9 (0,9) a
<i>h</i>	81,0 (0,3) a	60,1 (2,3) b	88,1 (0,3) c	88,0 (0,2) c
<i>C</i>	35,2 (0,9) a	10,5 (0,9) b	38,3 (0,9) c	34,9 (0,9) a

\* Desviación estándar de cuadruplicados

Por otra parte, también se analizó la composición fenólica de la piel de los frutos antes y después de su exposición al aire, cuyos resultados están recogidos en la Tabla 26. Durante la exposición de las aceitunas al aire se produce una disminución significativa de los compuestos *o*-difenólicos: hidroxitirosol, verbascósido y HyEDA, en la piel de las aceitunas no calentadas. Esta disminución no se produce en el glucósido de oleuropeína que también tiene estructura *o*-difenólica y que es el compuesto fenólico mayoritario en las aceitunas. Como ya hemos mencionado anteriormente las enzimas muestran preferencias frente a los distintos sustratos.

Por el contrario, la composición de compuestos fenólicos permanece constante en la piel de las aceitunas que han sido calentadas y expuestas al aire durante 24 horas, debido a la inactivación de las enzimas oxidativas con el calentamiento. Estas aceitunas muestran mayor concentración de oleuropeína que las no calentadas, aunque no tenemos una explicación para este efecto. Además, no contienen el *o*-difenol HyEDA, que sí se encuentra en aceitunas no tratadas térmicamente y que procede de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína por acción de la  $\beta$ -glucosidasa, como ha sido previamente indicado por diversos autores (Medina y cols., 2009).

**Tabla 26.** Concentración de compuestos *o*-difenólicos en la piel de aceitunas Manzanillas calentadas y no calentadas. Los frutos fueron almacenados en condiciones asépticas y almacenados un mes en salmuera, transcurrido este tiempo se abrieron los recipientes y se dejaron las aceitunas al aire durante 24 horas. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar de cuadruplicados. Las diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

		Hidroxitirosol	Verbascósido	HyEDA	Oleuropeína
Aceitunas no calentadas	0 h	4,73 (0,26)* a	3,50 (0,55) a	3,07 (0,27) a	17,63 (1,74) a
	24 h	3,26 (0,30) b	1,17 (0,24) b	1,49 (0,31) b	16,91 (3,95) a
Aceitunas calentadas	0 h	0,73 (0,47) c	2,82 (0,72) a	n.d.	49,63 (6,94) b
	24 h	0,70 (0,08) c	2,51 (0,90) a	n.d.	64,38 (4,24) b

\* Desviación estándar de cuadruplicados

n.d.: no detectado

Se puede concluir que, debido a que la preparación de aceitunas verdes naturales no incluyen ningún tratamiento con hidróxido sódico, la mayoría de las diferencias encontradas en la composición de pigmentos cloroplásticos con respecto a aceitunas verdes al estilo español es la ausencia de derivados de clorofila con estructuras clorina y rodina. Sin embargo, estos resultados no explican la diferencia de color encontrada en los frutos sometidos a ambos tratamientos ya que todos los pigmentos formados son derivados libres de  $Mg^{2+}$ , mayoritariamente feofitinas en ambos casos, las cuales tienen coloraciones similares. Los resultados obtenidos en estas experiencias indican, por el contrario que el oscurecimiento observado en aceitunas verdes naturales se debe a la oxidación enzimática de los compuestos *o*-difenólicos presentes en los frutos frescos, particularmente en la piel por la acción de la PPO. El color desarrollado en las aceitunas verdes al estilo español, si está más directamente relacionado con los pigmentos cloroplásticos y carotenoides, ya que la enzima PPO se inactiva por el tratamiento con hidróxido sódico, lo cual previene de la oxidación enzimática de los compuestos *o*-difenólicos en los frutos.

### **4.2.3. Aceitunas deshidratadas: evolución de los compuestos fenólicos durante el procesado**

Uno de los métodos más antiguos de elaboración de aceitunas de mesa consiste en colocar los frutos con un estado de madurez avanzado, en recipientes que permitan el drenaje del jugo y cubrirlos con capas de sal hasta su deshidratación. Después de 40-60 días y tras un lavado y secado a temperatura ambiente, las aceitunas están listas para su consumo. Durante el periodo de deshidratación, las aceitunas pierden agua y otros solutos, entre los que se supone que está la oleuropeína y, por tanto, el amargor (Panagou y cols., 2002 y 2006). Sin embargo, hasta ahora, no se conoce el mecanismo de eliminación de este compuesto y la consecuente pérdida de amargor en el producto final.

En la Tabla 27 se representan los parámetros fisicoquímicos de las aceitunas puestas a deshidratar con una relación sal/aceitunas del 0,88. Se observa como durante el proceso de deshidratación con sal se pierde una cantidad importante de agua, produciéndose una disminución de la humedad del 59,1 al 33,9 %. Al mismo tiempo, se origina un incremento en la concentración de cloruro sódico en el jugo de las aceitunas

hasta el 5,1 %, así como una disminución en la actividad de agua del 0,99 al 0,92. Este grado de humedad se asemeja al de las aceitunas negras deshidratadas descritas por diversos autores (Panagou y colbs., 2002; Değirmencioglu y colbs., 2011) y el porcentaje de sal se encuentra por debajo del límite del 10 % establecido por el Comité Oleícola Internacional (COI, 2004) y del 8 % establecido por el Codex (2013) para poder comercializar estas aceitunas. Además, como consecuencia de esta baja concentración de sal en el jugo de las aceitunas, la actividad de agua es más alta de la requerida para asegurar la estabilidad química y microbiana del producto.

**Tabla 27.** Parámetros fisicoquímicos en aceitunas frescas y deshidratadas con una relación sal/aceitunas del 0,88 después de un mes de deshidratación.

	pH	A <sub>w</sub>	Humedad (%)	NaCl en jugo (%)	Color		
					L*	a*	b*
<b>Fruto fresco</b>	5,2 (0,1)*	0,99 (0,01)	59,1 (2,8)	-	21,8 (0,3)	0,9 (0,3)	-0,9 (0,1)
<b>Fruto deshidratado</b>	5,2 (0,1)	0,92 (0,04)	33,9 (3,3)	5,1 (0,1)	18,1 (0,8)	0,5 (0,2)	0,5 (0,4)

\* Desviación estándar

Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la elevada relación sal/aceitunas (0,88) usada en este experimento produce una rápida deshidratación osmótica de los frutos que retrasa la difusión de sal hacia el interior de la pulpa, dando lugar a unas aceitunas con una baja concentración de cloruro sódico. Por el contrario, el líquido drenado de los recipientes contiene una elevada concentración de sal, superior al 23 %, es decir, una solución prácticamente saturada.

Por otra parte, durante la deshidratación se producen cambios en la textura (datos no mostrados) de las aceitunas, aumentando la firmeza de los frutos. Estos cambios se originan como consecuencia de la reorganización de los polisacáridos presentes en las paredes celulares de las aceitunas debido a la rotura de los tejidos durante la deshidratación (Cardoso y colbs., 2008). Sin embargo, con respecto al color, no existen referencias previas sobre las modificaciones que se producen cuando las aceitunas se deshidratan con sal. Se observa (Tabla 27) un ligero oscurecimiento que viene expresado por una disminución del parámetro *L\** y pequeñas diferencias en los parámetros *a\** y *b\**.

Hay que tener en cuenta que las aceitunas deshidratadas, a pesar de poseer una baja actividad de agua (0,75-0,85) y una alta concentración en sal (4-10 g/100g) no son un producto estéril y si se exponen al aire pueden permitir el desarrollo de mohos, por lo que son un producto con una vida útil corta. Se estudió la población microbiana que existía en la superficie de las aceitunas durante el proceso de deshidratación (Tabla 28) y se observó que a lo largo de todo el proceso, están presentes las *Enterobacterias*, así como mohos y levaduras. Estudios previos de otros investigadores sólo encontraron levaduras tanto durante el proceso de deshidratación como en el almacenamiento del producto deshidratado (Panagou y colbs., 2002; Değirmencioğlu, 2011). Hay que indicar que los microorganismos existentes podrían estar relacionados con la microbiota inicial de las aceitunas Manzanillas. La población de aerobios mesófilos está presente a lo largo de todo el proceso de deshidratación, aumenta durante las dos primeras semanas del proceso y disminuyen en la etapa final. Los recuentos de bacterias lácticas están por debajo del límite de detección (1,9 UFC/ g), excepto a los 21 días en el que el recuento no es relevante.

**Tabla 28.** Población microbiana (log UFC/g) presente en la superficie de las aceitunas durante el proceso de deshidratación con una relación sal/aceitunas del 0,88.

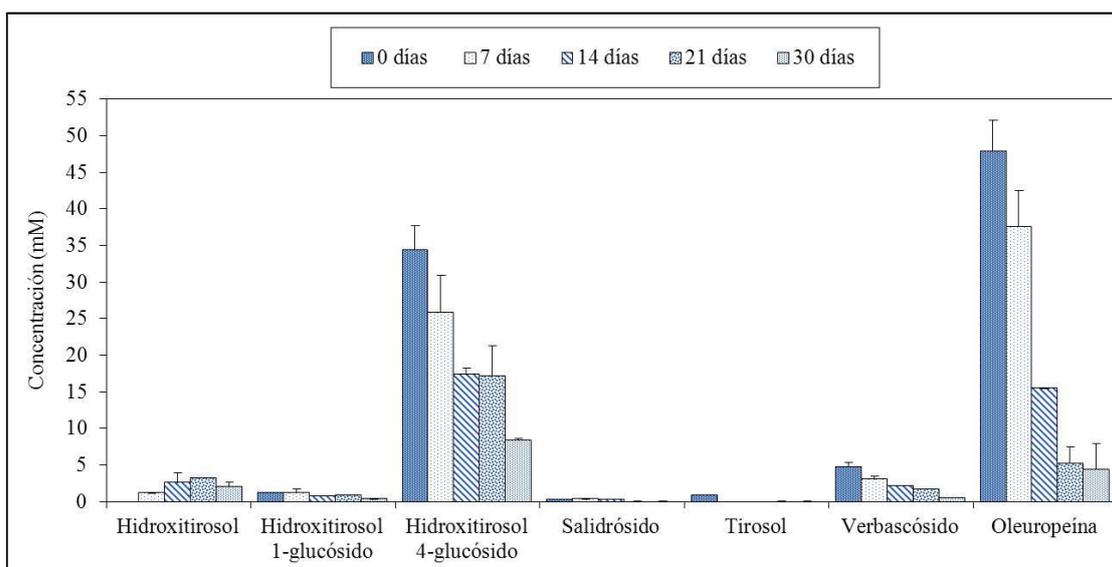
Tiempo de deshidratación (días)	Aerobios mesófilos	Enterobacteriaceae	Mohos y levaduras	BAL
1	6,2	5,6	4,3	n. d.
7	7,2	7	3,3	n. d.
14	7,2	7,1	3,4	n. d.
21	6,4	5,7	1,6	2,6
28	5,5	5,2	3,4	n. d.

n. d.: No detectado

Uno de los objetivos de la presente tesis fue conocer los posibles cambios en los compuestos fenólicos durante el proceso de deshidratación. Son escasos los estudios sobre el perfil fenólico del producto acabado (Zoidou y colbs., 2010; Soufi y colbs., 2014) y no existen estudios sobre el contenido de los compuestos fenólicos durante la etapa de deshidratación.

La evolución de los compuestos fenólicos presentes en las aceitunas a lo largo del proceso de deshidratación se encuentran representados en la Figura 39. Los mayoritarios identificados han sido la oleuropeína, hidroxitirosol 4-glucósido y verbascósido, cuyas concentraciones disminuyen a lo largo del proceso. En concentraciones menores y también disminuyendo con el tiempo de deshidratación, se encuentran hidroxitirosol 1-glucósido, tirosol y salidrósido. Por el contrario, el hidroxitirosol no se detecta en aceitunas frescas e incrementa su concentración durante los primeros 20 días, disminuyendo al final del proceso.

**Figura 39.** Evolución de la concentración de compuestos fenólicos (mM) en pulpa de aceitunas durante el proceso de deshidratación con una relación sal/aceitunas de 0,88. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



En concreto, el glucósido amargo oleuropeína sufre una gran disminución, desde 47,92 mM en pulpa fresca a 4,42 mM en frutos deshidratados. Esta concentración final es más elevada que la indicada por diversos autores para aceitunas negras naturales deshidratadas con sal (Blekas y cols., 2002; Zoidou y cols., 2010; Soufi y cols., 2014) o aceitunas deshidratadas con aire caliente (Mantzouridou y Tsimidou, 2011). Por otra parte, es bien conocido que las aceitunas durante el proceso de deshidratación con sal pierden el amargor y los resultados encontrados en la presente tesis indican que se produce una disminución en la concentración de oleuropeína en la pulpa, aunque esta disminución no se debe a la difusión de la oleuropeína al líquido generado, ya que no se

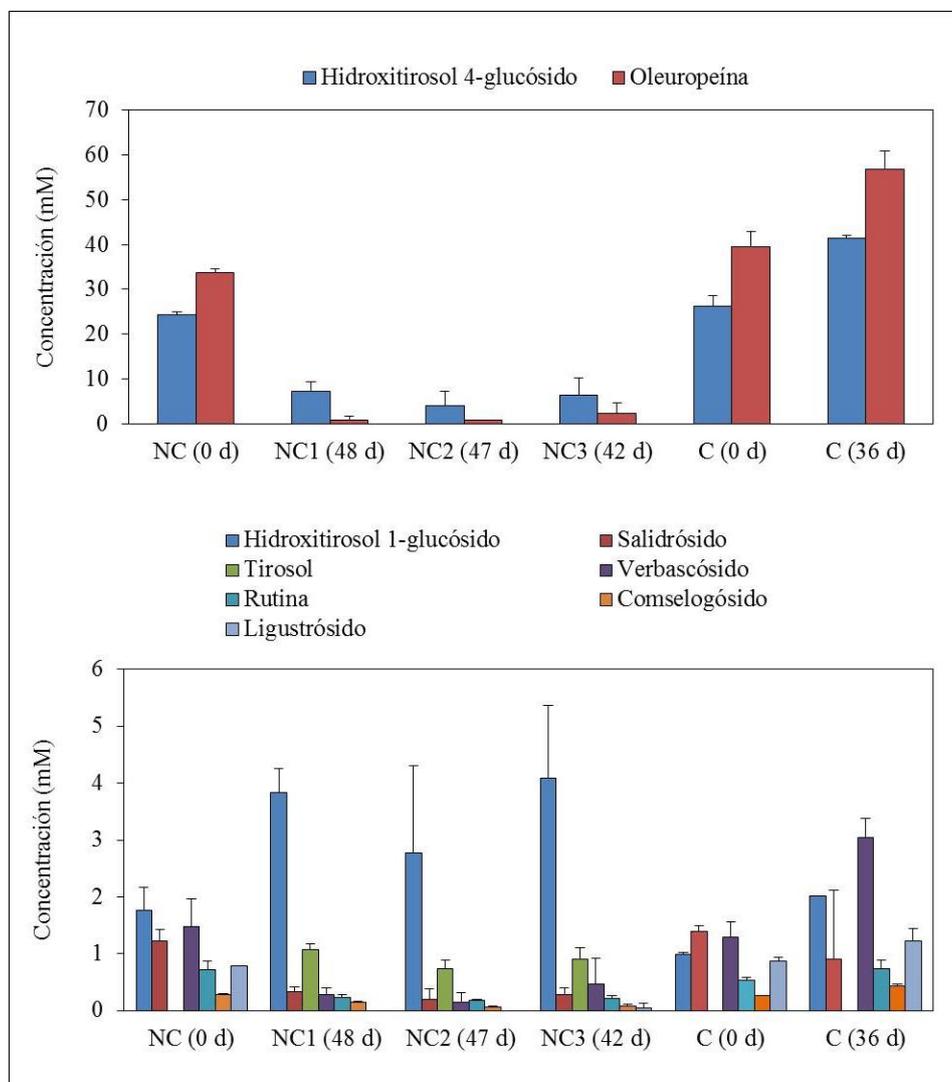
detecta la misma en el análisis realizado al líquido que drena en la zona inferior del fermentador. Por tanto, se deduce que la presión osmótica generada por las capas de sal en las aceitunas origina la rotura de los tejidos y, consecuentemente, se favorece el contacto de los compuestos fenólicos con las enzimas oxidativas, en particular con la PPO. De esta forma, se produce la oxidación de la oleuropeína, mecanismo de reacción ya demostrado anteriormente en esta tesis en el apartado de postrecolección (4.2.1.), y propuesto por García y cols. (2008) para eliminar el amargor de aceitunas verdes en salmuera. Estos investigadores estudiaron un nuevo método para endulzar las aceitunas basado en una degradación enzimática de la oleuropeína mediante la acción de la PPO.

Asimismo, hay que tener en cuenta que la oxidación enzimática de la oleuropeína es una reacción rápida y que puede producirse paralelamente a la hidrólisis enzimática de la misma catalizada por esterasas. De hecho, durante el proceso de deshidratación con sal de las aceitunas se ha observado la aparición e incremento de hidroxitirosol durante las primeras semanas de deshidratación.

Por todo ello, se planteó otro experimento con el objetivo de confirmar si la pérdida de amargor de las aceitunas deshidratadas se produce por la oxidación química o enzimática de la oleuropeína. Además, se emplean diferentes cantidades de sal con vistas a conocer la influencia que tiene la relación sal/aceitunas sobre las características finales del producto obtenido. Para ello, las aceitunas Manzanilla, con un estado de madurez avanzado, se colocan entre capas de sal con diferentes cantidades de sal y la misma cantidad de fruto, de manera que la relación sal/fruto fuera: 0,40; 0,57 y 0,86. Además, una parte de las aceitunas se somete a un tratamiento térmico a 90 °C durante 20 minutos, antes de someterlas al proceso de deshidratación, manteniendo una relación sal/aceitunas del 0,57. La medida de la actividad PPO antes de comenzar el proceso de deshidratación confirma que el calentamiento inactiva la PPO, ya que no se detecta actividad en los frutos calentados, mientras que en los frutos sin tratar térmicamente la actividad es de  $44,5 \pm 2,0$  U/ml de e.e.

Las aceitunas no sometidas al tratamiento térmico pierden casi toda la oleuropeína inicial en los tres procesos de deshidratación evaluados (Figura 40).

**Figura 40.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) antes y después del proceso de deshidratación en pulpa de aceitunas no calentadas (NC) y calentadas (C) con una relación de sal/aceitunas de 0,40 (NC1); 0,57 (NC2 y C) y 0,86 (NC3). Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



Otros compuestos fenólicos minoritarios, tales como el hidroxitirosol 4-glucósido, verbascósido, rutina, comselogósido y ligustrósido también disminuyen su concentración. Sin embargo, se observa un aumento en la concentración de hidroxitirosol 1-glucósido y la formación de tirosol. Por el contrario, la concentración de la oleuropeína en las aceitunas calentadas después de 36 días y una vez deshidratadas es más elevada que a tiempo 0, debido a que ocurre una pérdida de humedad. El resto de fenoles analizados también aumentan su concentración, excepto el salidrósido.

Estos resultados demuestran que el endulzamiento de las aceitunas durante la deshidratación con sal ocurre por la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, en particular oleuropeína, ya que en las aceitunas calentadas no se producen apenas cambios en las concentraciones de éstos compuestos, debido a la inactivación de las enzimas oxidativas durante el tratamiento térmico. Además, la oleuropeína, hidroxitirosol 4-glucósido, hidroxitirosol 1-glucósido y la mayoría de los polifenoles se detectaron durante la deshidratación de las aceitunas tratadas térmicamente en los líquidos drenados en la zona inferior del fermentador (Tabla 29), mientras que ninguno de ellos se encontró en ningún momento en dichos líquidos cuando las aceitunas no fueron sometidas al tratamiento térmico (Ramírez y cols., 2013).

**Tabla 29.** Concentración de compuestos fenólicos (mM) mayoritarios en el líquido drenado durante el proceso de deshidratación en aceitunas calentadas y dispuestas en sal con una relación sal/aceitunas de 0,57.

Tiempo de deshidratación (días)	Hidroxitirosol 1-glucósido (mM)	Hidroxitirosol 4-glucósido (mM)	Oleuropeína (mM)
1	0,48	9,81	4,36
7	0,20	4,33	2,32
13	0,76	5,84	1,71
22	0,16	3,66	1,42
36	0,22	6,36	1,33

Por otra parte, el estudio de los parámetros químicos, cuyos valores se muestran en la Tabla 30, indican que a medida que la relación de sal/aceitunas es más baja (0,40) la concentración de sal en el jugo de las aceitunas aumenta alcanzando valores del 11,5 %, mientras que la actividad de agua disminuye a 0,75. El empleo de concentraciones de sal/aceitunas bajas aseguran la estabilidad del producto, cumpliendo con los límites exigidos por el Codex para aceitunas de mesa (2013) que establece una concentración mínima de NaCl del 8 % en el jugo.

**Tabla 30.** Parámetros fisicoquímicos en aceitunas frescas y deshidratadas bajo tres relaciones de sal/aceitunas distintas.

Parámetros fisicoquímicos	Fruto fresco	Fruto deshidratado		
		Relación sal/aceitunas		
		0,40	0,57	0,86
Humedad (%)	61,90 (0,90)*	42,70 (1,16)	39,43 (1,67)	40,55 (4,21)
A <sub>w</sub>	0,99 (0,03)	0,75 (0,01)	0,86 (0,01)	0,90 (0,02)
NaCl en jugo (%)	-	11,5 (0,2)	7,8 (0,1)	7,1 (0,2)

\* Desviación estándar

En resumen, las aceitunas sometidas al proceso de deshidratación con sal pierden su amargor debido a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, en particular oleuropeína como consecuencia de la puesta en contacto de estos compuestos con la PPO al producirse la rotura de los tejidos por la presión osmótica provocada por la sal. Además, es necesario una relación sal/aceitunas menor o igual a 0,40 para alcanzar una alta concentración de sal en el jugo de las aceitunas deshidratadas y así asegurar la estabilidad del producto final.

#### 4.2.4. Nuevo proceso de eliminación del amargor basado en la oxidación enzimática de la oleuropeína

Las aceitunas tal cual se recogen del árbol son incomedibles debido a la presencia del compuesto amargo oleuropeína. Los métodos para eliminar este amargor basados en la utilización de un tratamiento con hidróxido sódico generan grandes volúmenes de vertidos difíciles de tratar. Además, la colocación directa de las aceitunas en salmuera requiere mucho tiempo para eliminar el amargor de los frutos. Ya se ha comentado que la pérdida del amargor puede producirse mediante la oxidación enzimática de la oleuropeína en las aceitunas deshidratadas (Ramírez y cols., 2013; Piscopo y cols., 2014). También hay estudios para eliminar el amargor (García y cols., 2008) sometiendo los frutos a una sobrepresión con oxígeno provocando la

oxidación de la oleuropeína. Sin embargo, se ha observado en algunos ensayos que algunas partidas son difíciles de desamargar.

Por tanto, se planteó la necesidad de optimizar este método de desamargar de las aceitunas basado en la oxidación de la oleuropeína.

Los experimentos de oxidación llevados a cabo con diferentes partidas de aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca que llevaban almacenadas en salmuera durante varios meses revelan que en algunas partidas de aceitunas cuando se someten al proceso de oxidación la concentración de oleuropeína disminuye muy poco (Tabla 31).

**Tabla 31.** Concentración de oleuropeína (mM) en pulpa de aceitunas oxidadas bajo sobrepresión de oxígeno. Las aceitunas de variedad Manzanilla y Hojiblanca proceden de tanques industriales donde han estado almacenadas en salmueras acidificadas. % RCO (% Reducción de la concentración de oleuropeína).

Muestra	Tiempo en salmuera (días)	Antes de oxidar (mM)	Después de oxidar (mM)	% RCO
Manzanilla 1	120	11,35 (4,48)*	8,13 (0,74)	28,4
Manzanilla 2		7,45 (0,87)	4,73 (0,16)	36,5
Hojiblanca 1	180	0,89 (0,11)	0,00 (0,00)	100,0
Hojiblanca 2		0,40 (0,03)	0,00 (0,00)	100,0
Hojiblanca 3		0,27 (0,02)	0,00 (0,00)	100,0
Manzanilla 3	210	0,98 (0,06)	0,61 (0,13)	37,8
Manzanilla 4		2,18 (0,53)	1,10 (0,09)	49,5
Manzanilla 5		2,22 (0,13)	0,05 (0,03)	97,8
Manzanilla 6		3,12 (1,26)	0,78 (0,41)	75,0
Manzanilla 7		1,10 (0,22)	0,52 (0,01)	52,7

\*Desviación estándar de duplicados

Por el contrario, se produce una oxidación completa de la oleuropeína en las partidas de aceitunas Hojiblanca que llevaban almacenadas en salmuera 180 días. Está documentado que las aceitunas de la variedad Manzanilla poseen, en general, una mayor concentración de oleuropeína y actividad PPO que las de la variedad Hojiblanca (Ramírez y cols., 2014a), lo cual se corresponde con los datos de oleuropeína en pulpa de Manzanilla a los 210 días de conservación frente a los de Hojiblanca de 180 días.

Sin embargo, la reducción de la concentración de oleuropeína en aceitunas Manzanilla con la oxidación se sitúa entre 28 y 98 % no pudiéndose relacionar con el tiempo que han permanecido en salmuera.

Podría pensarse que las condiciones químicas, es decir, el pH de las aceitunas durante la oxidación podría tener una gran influencia sobre la actividad PPO. No obstante, tal como se observa en la Tabla 32 tanto la acidez como el pH de la salmuera, similar al de la pulpa, no presenta valores muy diferentes entre las diversas partidas.

**Tabla 32.** Parámetros químicos de las salmueras de aceitunas que han sido sometidas al tratamiento de oxidación.

Muestra	pH	Acidez libre (% ácido láctico)
Manzanilla 1	3,7	0,4
Manzanilla 2	3,7	0,4
Hojiblanca 1	3,8	0,3
Hojiblanca 2	3,9	0,3
Hojiblanca 3	3,9	0,3
Manzanilla 3	3,7	0,3
Manzanilla 4	3,7	0,3
Manzanilla 5	3,9	0,5
Manzanilla 6	3,7	0,6
Manzanilla 7	3,6	0,5

El pH se sitúa entre 3,6-3,9 unidades, mientras que la acidez libre entre 0,3-0,6 % de ácido láctico. Por tanto, las diferencias en la oxidación de oleuropeína más bien deben relacionarse con la variabilidad entre las diferentes partidas, tal como se vió en experiencias realizadas sobre fruto fresco (Ramírez y cols., 2014a).

Se ha demostrado que la oxidación de la oleuropeína en aceitunas almacenadas en salmuera cuando se someten a sobrepresión de O<sub>2</sub> es una reacción catalizada por la PPO (García y cols., 2008). También, la actividad de esta enzima disminuye con el tiempo de almacenamiento de las aceitunas en salmuera (Ramírez y cols., 2015a). Los resultados mostrados parecen indicar que la actividad de la PPO era tan baja en los frutos conservados durante más de 3 meses que no se conseguía reducir en un gran número de partidas la concentración de oleuropeína.

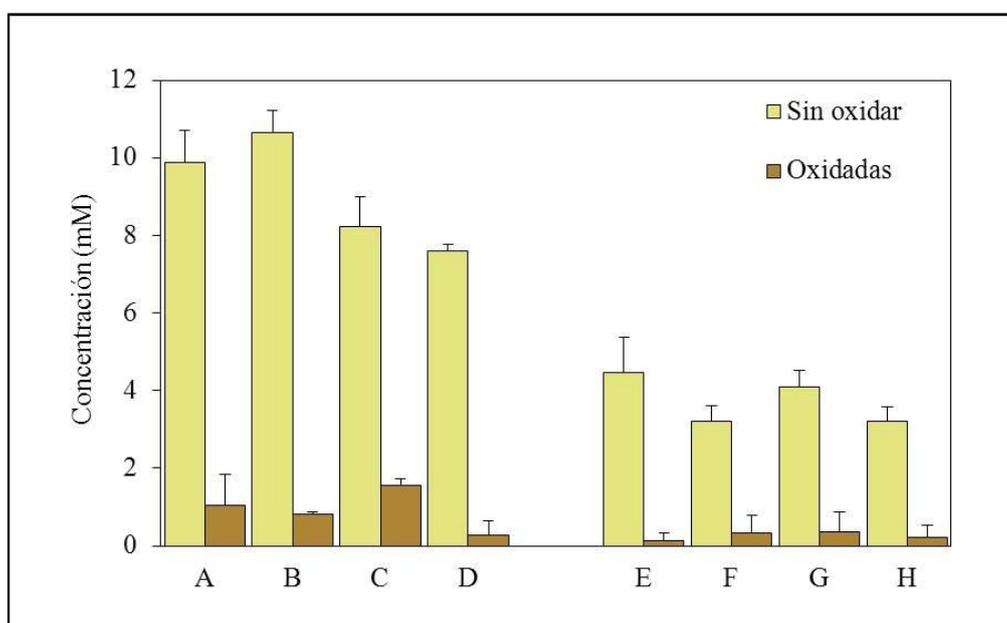
Por consiguiente, se diseña un nuevo experimento en el que se parte de distintas partidas de aceitunas Manzanilla y Hojiblanca que llevan menos tiempo conservadas en salmuera, sólo un mes. Los resultados presentados en la Figura 41 muestran en este caso una reducción muy elevada de la concentración de oleuropeína en ambas variedades cuando las aceitunas se sometieron al proceso de oxidación tal como era de esperar. La concentración de oleuropeína era más elevada en las partidas de aceitunas Manzanilla que en las Hojiblanca después de un mes en salmuera (Ramírez y cols., 2014a), así como en las aceitunas oxidadas.

Sin embargo, después del proceso de oxidación el porcentaje de oleuropeína que permanece en las aceitunas es muy bajo, 7,4 % para las partidas de la variedad Manzanilla y 10,1 % para las partidas de Hojiblanca (Tabla 33). Además, durante el proceso de oxidación también se afectan otros compuestos, en particular los *o*-difenoles, hidroxitirosol 1-glucósido y HyEDA. Por el contrario, los monofenoles hidroxitirosol 4-glucósido y tirosol en las partidas de Manzanilla, apenas se afectan. La concentración de salidrósido no se modifica, incluso se produce un incremento durante la oxidación en las aceitunas de la variedad Hojiblanca.

Los resultados obtenidos indican que el amargor de las aceitunas verdes almacenadas en salmueras acidificadas puede eliminarse mediante la oxidación enzimática cuando el tratamiento se lleva a cabo con aceitunas que llevan poco tiempo

almacenadas en salmuera. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, aunque las aceitunas se puedan oxidar al mes del almacenamiento en salmuera eliminándose el amargor que presentan, no resulta útil para la industria ya que no pueden vender el producto en tan corto período de tiempo. Por consiguiente, el siguiente objetivo fue estudiar el almacenamiento de las aceitunas ya oxidadas en las mismas soluciones en las que estaban conservadas antes del tratamiento de oxidación.

**Figura 41.** Concentración de oleuropeína (mM) en aceitunas de la variedad Manzanilla (A-D) y Hojiblanca (E-H) almacenadas durante un mes en salmuera procedentes de fermentadores industriales. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



Los parámetros químicos de las salmueras de conservación de las aceitunas oxidadas (Tabla 34) muestran que el pH disminuye ligeramente y se produce un incremento en la acidez libre. El pH se sitúa entre 4,2-4,0 unidades y la acidez libre entre 0,4-0,7 % de ácido láctico, valores que se sitúan dentro de los recomendados por el Codex (2013) para asegurar la conservación de las aceitunas naturales. Además, durante el almacenamiento en salmuera de las aceitunas no se detectan aromas desagradables, típicos de alteraciones microbiológicas.

**Tabla 33.** Concentración de compuestos fenólicos en aceitunas de las variedades Manzanilla (A-D) y Hojiblanca (E-H), almacenadas durante un mes en fermentadores industriales con salmuera acidificada. Los datos indican los valores medios del porcentaje existente de cada compuesto después del proceso de oxidación. (n. d.: no detectado)

Compuesto	Manzanilla	Hojiblanca
Hidroxitirosol 1-glucósido	6,5 (2,3)*	10,1 (1,3)
Hidroxitirosol 4-glucósido	62,7 (12,1)	70,6 (7,9)
Salidrósido	103,2 (9,0)	157,5 (7,3)
Tirosol	70,2 (5,1)	1,0 (0,1)
HyEDA	n. d.	15,4 (9,2)
Oleuropeína	7,4 (3,1)	10,1 (6,5)

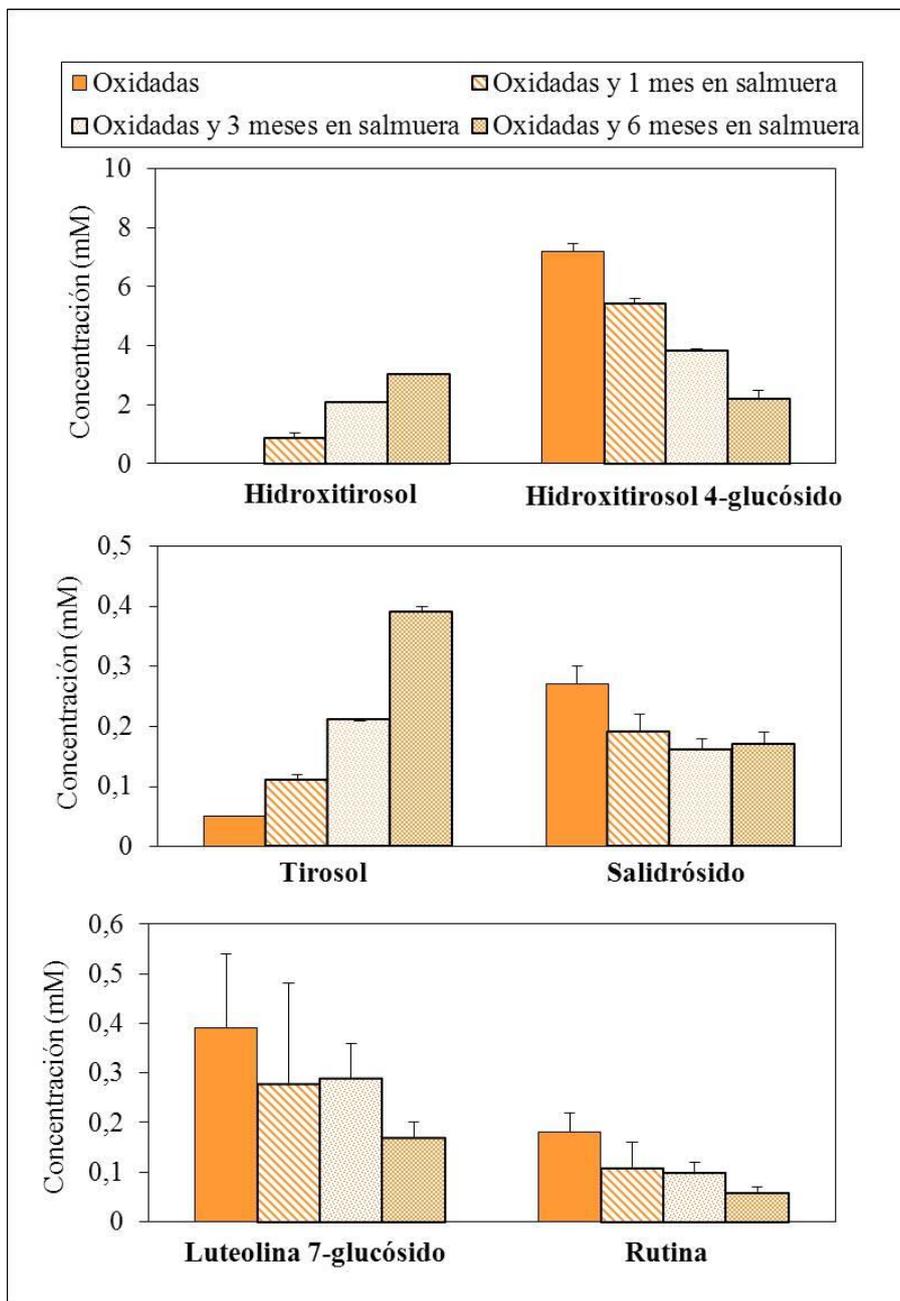
\* Desviación estándar de cuadruplicados

**Tabla 34.** Características químicas de las salmueras de aceitunas oxidadas. Los frutos se oxidan después de un mes en salmuera y posteriormente se conservan en la misma salmuera durante 3 y 6 meses.

Parámetros	Tiempo de conservación después de la oxidación (meses)		
	0	3	6
pH	4,2	4,0	4,0
Acidez libre (% ácido láctico)	0,4	0,6	0,7
NaCl (%)	5,8	5,3	5,7

Con respecto a los compuesto fenólicos, la concentración de hidroxitirosol incrementa en la pulpa de las aceitunas con el tiempo de almacenamiento en salmuera, lo cual se relaciona con la disminución de la concentración de hidroxitirosol 4-glucósido como consecuencia de su hidrólisis ácida (Figura 42).

**Figura 42.** Evolución de la concentración de compuestos fenólicos (mM) en pulpa de aceitunas de la variedad Hojiblanca oxidadas al mes y almacenadas en su salmuera durante 1, 3 y 6 meses. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



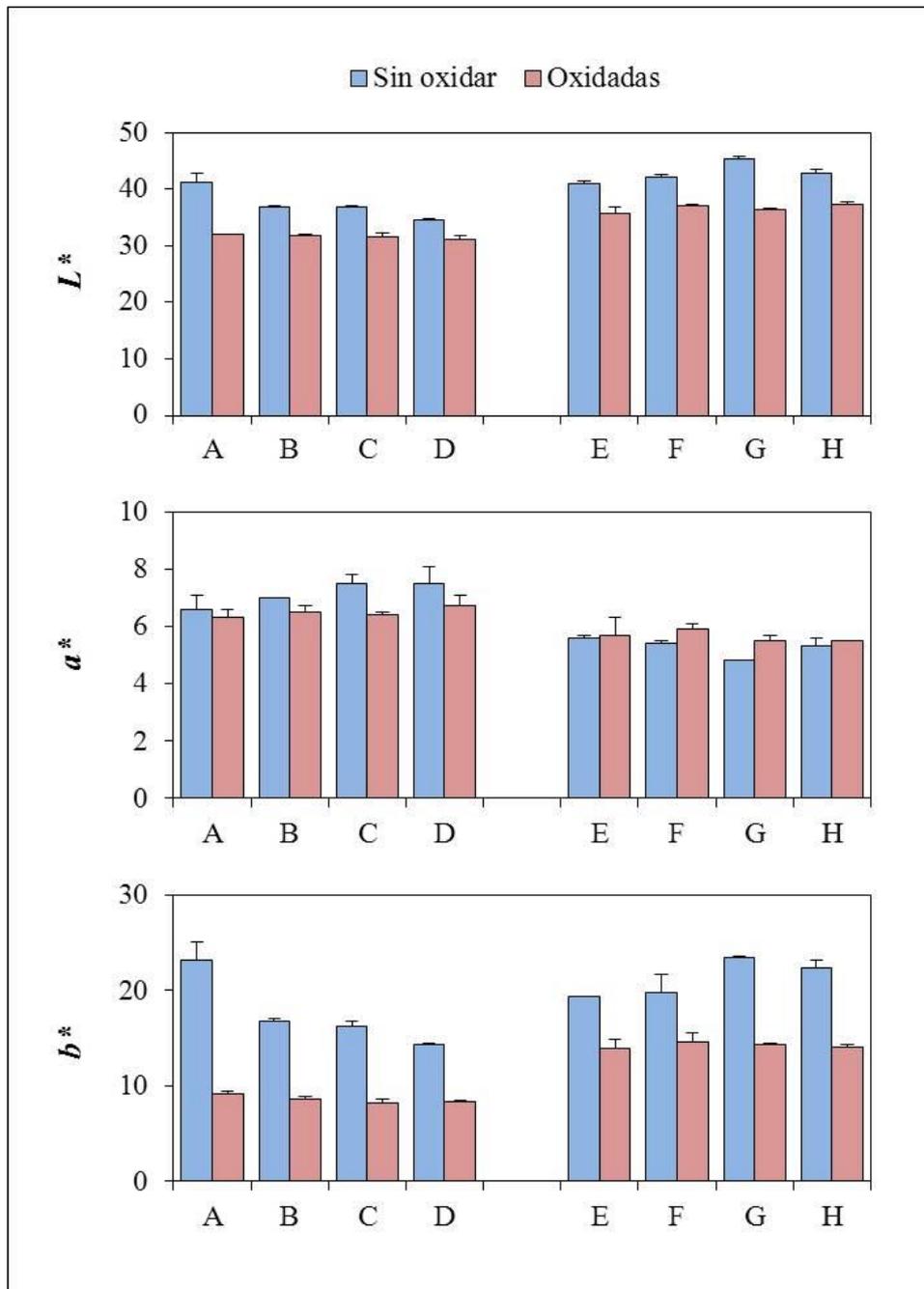
Un comportamiento similar se observa para el tirosol y el salidrósido, los cuales aumentan y disminuyen respectivamente con el tiempo de almacenamiento de las aceitunas oxidadas en salmuera. La concentración de luteína 7-glucósido y rutina disminuye durante el almacenamiento de las aceitunas oxidadas en salmuera. Además, la baja concentración residual de oleuropeína existente en las aceitunas oxidadas

desaparece después de los 6 meses del almacenamiento, probablemente por las condiciones ácidas de la salmuera. Por tanto, aunque durante el proceso de oxidación y posterior conservación en salmuera se produzca una reducción de compuestos fenólicos, también permanecen y se forman otros tales, como el hidroxitirosol que aportan valor nutricional al producto.

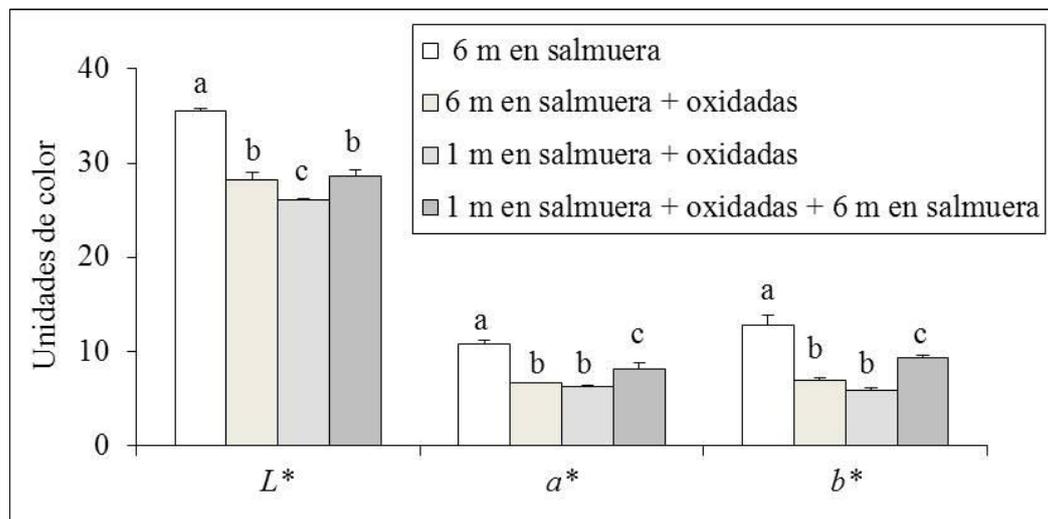
Por otra parte durante la oxidación se produce un oscurecimiento de las aceitunas, tal como indican García y cols., 2008. Se observa una disminución de los parámetros  $L^*$  y  $b^*$  de todas las partidas estudiadas (Figura 43), aunque esta disminución es mayor en las aceitunas de la variedad Manzanilla que en las Hojiblanca. Como consecuencia, los frutos cambian su color, oscureciéndose, debido a la oxidación de los *o*-difenoles hasta quinonas (Antolovich y cols., 2004), que posteriormente polimerizan formando pigmentos oscuros (Sánchez y cols., 2013), hecho similar al descrito anteriormente para aceitunas verdes en salmuera durante la etapa de fermentación (Ramírez y cols., 2015a).

En la Figura 44 se recogen los datos de color de una partida de aceitunas Hojiblanca sometidas al tratamiento de oxidación a un mes y 6 meses de conservación, junto con los datos de color de estas mismas aceitunas conservadas sin oxidar durante 6 meses y también los mismos frutos oxidados al mes y después conservados 6 meses. El resultado más destacable es que cuando las aceitunas se oxidan al mes de estar en salmuera, y se almacenan durante 6 meses en la misma salmuera el valor del parámetro  $L^*$  es similar al de aceitunas oxidadas a los 6 meses de su almacenamiento en salmuera, no siendo valores significativamente diferentes. Por otra parte, los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  disminuyen con la oxidación, y como ocurre con el parámetro  $L^*$  sus valores aumentan con el almacenamiento de las aceitunas oxidadas en salmuera durante 6 meses, aunque a diferencia del parámetro  $L^*$  son valores significativamente distintos. Por tanto, el almacenamiento durante 6 meses en salmuera provoca un ligero aclaramiento del color de las aceitunas oxidadas debido posiblemente a la difusión de los polímeros formados en la oxidación hacia la salmuera de conservación.

**Figura 43.** Cambios en los parámetros de color en aceitunas Manzanilla (A-D) y Hojiblanca (E-H) sometidas al proceso de oxidación. Las aceitunas han estado almacenadas durante un mes en salmuera en fermentadores industriales y posteriormente se han oxidado. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



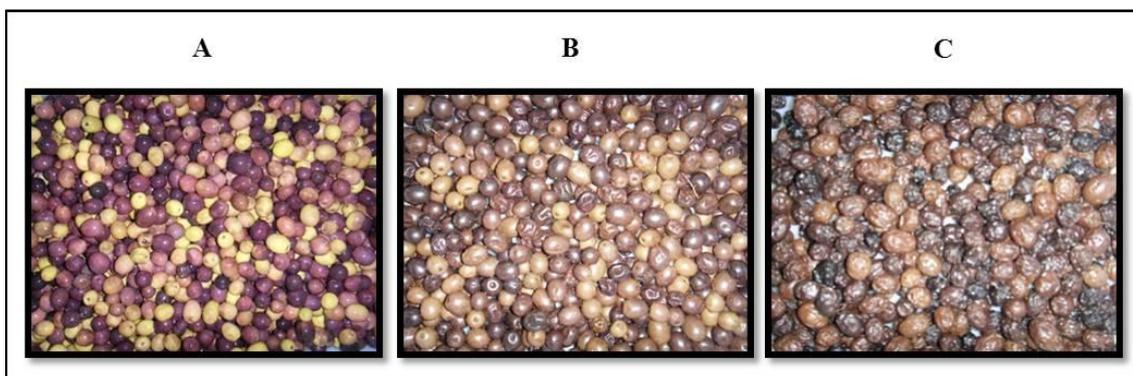
**Figura 44.** Influencia de la oxidación sobre los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en aceitunas de la variedad Hojiblanca conservadas durante 1 y 6 meses en salmuera, y oxidadas al mes y puestas en salmuera durante 6 meses.



Comprobado que con el proceso de oxidación se consigue eliminar el amargor de las aceitunas y para satisfacer las necesidades de los consumidores, se hizo un experimento en el que las aceitunas, una vez oxidadas, se someten a una deshidratación mediante calor durante varios días, con el objetivo de conseguir aceitunas deshidratadas. Este tipo de preparación existente actualmente presenta el inconveniente de ser un producto de temporada.

Las aceitunas deshidratadas que se obtienen se pueden ver en la Figura 45. Aparentemente, las aceitunas presentan un aspecto adecuado para este tipo de preparación, aunque no un color homogéneo ya que la muestra de la que partimos presenta distintos grados de maduración. Estas aceitunas presentan una vida de mercado larga, ya que las aceitunas tras haberlas deshidratado y almacenado en botes a temperatura ambiente durante 8 meses no presentan crecimiento microbiano. Además, la cata de estas aceitunas por expertos en aceitunas de mesa revelaron que las aceitunas no tenían un sabor rechazable, el único inconveniente es que al partir de frutos que no están totalmente maduros la textura de las aceitunas es mayor y resultan unas aceitunas muy fibrosas.

**Figura 45.** Aceitunas conservadas durante 3 meses en salmuera (A), después del proceso de oxidación (B) y, además deshidratadas (C).



En resumen, podemos decir que el proceso de oxidación descrito basado en el uso de sobrepresiones con oxígeno podría utilizarse para endulzar las aceitunas que se encuentran almacenadas en salmuera. El proceso es más eficaz si se realiza durante el primer mes de almacenamiento, sobre todo en variedades como la Manzanilla donde las concentraciones de oleuropeína son más elevadas que en la variedad Hojiblanca, ya que durante el almacenamiento en salmuera la actividad de las oxidasas disminuye. Con esta técnica se obtendrían aceitunas de un color oscuro, que aunque no se puedan comercializar como aceitunas negras, podrían tratarse como un nuevo producto obtenido sin la utilización de productos químicos y sin generar grandes volúmenes de residuos.

### **4.3. Transformación de los compuestos fenólicos durante la elaboración de aceitunas verdes naturales**

#### **4.3.1. Hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas de mesa**

##### **4.3.1.1. Hidrólisis química de la oleuropeína**

En algunos trabajos se ha indicado que la eliminación del amargor en aceitunas colocadas directamente en salmuera se debe a la difusión de la oleuropeína desde los frutos hacia la salmuera y su posterior hidrólisis química debido al medio ácido (Paiva-Martins y Gordon, 2005; Gikas y cols., 2006). No obstante, diversos estudios indican

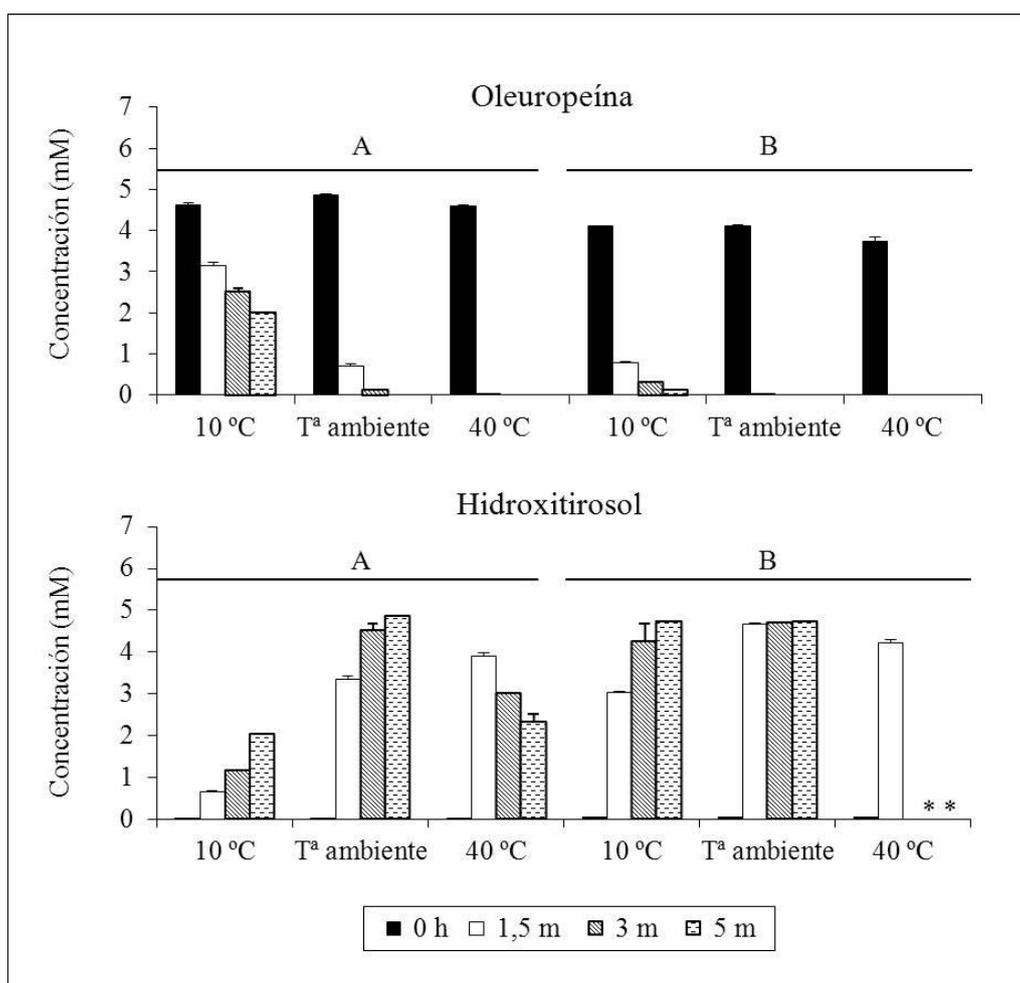
que la hidrólisis química de la oleuropeína en medio ácido es un proceso lento (Gikas y colbs., 2006). Además, la concentración de cloruro sódico y la temperatura son parámetros que pueden influir en esta hidrólisis. Con el objetivo de conocer el comportamiento que tiene la oleuropeína cuando se encuentra en las condiciones de una salmuera, se analiza su concentración en dos soluciones de oleuropeína comercial (Solución A y B) preparadas con distinta concentración en NaCl y ácido acético y almacenadas a 3 temperaturas distintas, 10 °C, T<sup>a</sup> ambiente y 40 °C.

A la vista de los resultados obtenidos (Figura 46) se puede deducir, que la oleuropeína se hidroliza más rápidamente conforme la temperatura de almacenamiento es más alta, habiéndose hidrolizado totalmente al cabo de 1,5 meses a 40 °C. Además, esta hidrólisis es más lenta en la solución A, cuando existe una menor concentración en NaCl y ácido acético, permaneciendo más de la mitad de la concentración de oleuropeína a los 5 meses del almacenamiento a baja temperatura (10 °C).

También, a partir de 1,5 meses se detecta la formación de hidroxitirosol, procedente de la hidrólisis química de la oleuropeína, y es mayor en salmueras almacenadas a alta temperatura y cuando las condiciones de sal y acidez son más altas. Por tanto, existe una buena correlación entre la formación de hidroxitirosol y la disminución de la concentración de oleuropeína. Por otra parte, a 40 °C y cuando la salmuera utilizada es la A, a partir del 1,5 meses, la concentración de hidroxitirosol empieza a disminuir. En la salmuera B no sabemos si ocurre lo mismo ya que no se tienen datos de los dos últimos puntos.

De otra parte, cuando se analizan los valores de pH de las soluciones, encontramos una diferencia notable, mientras las soluciones A tienen 2,8 unidades de pH, las soluciones B presentan 2,1 unidades de pH. Esta diferencia justificaría claramente la rapidez en la hidrólisis de la oleuropeína entre ambas soluciones, incluso a baja temperatura. Sin embargo, en condiciones habituales de fermentación, el pH que podemos encontrar oscila en un rango de 4,5-3,5 unidades y la concentración de oleuropeína en los fermentadores y por tanto el amargor de los frutos, tarda en desaparecer más de dos meses.

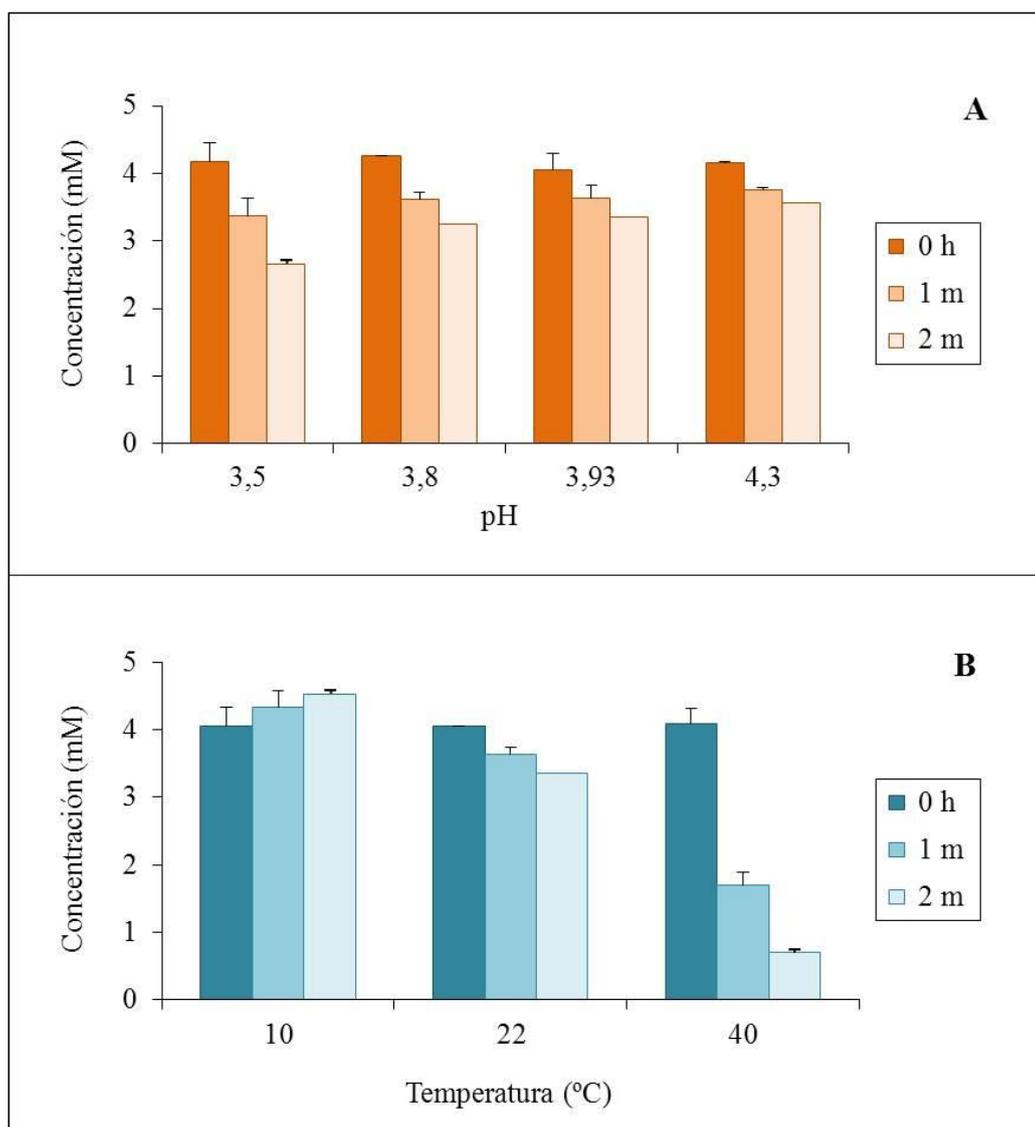
**Figura 46.** Evolución de la concentración de oleuropeína e hidroxitirosol (mM) en soluciones modelo (de oleuropeína comercial) almacenadas con dos condiciones de sal y acidez distintas (A: 6 % en cloruro sódico y 0,2 % en ácido acético, y B: 14 % en cloruro sódico y 1,6 % en ácido acético) y a diferentes temperaturas. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. (\*) no existen datos.



Por consiguiente, se planteó una nueva experiencia para intentar reproducir unas condiciones más reales. Se escogió como solución modelo una salmuera de aceitunas asépticas después de 15 días de conservación en la que no se detectó actividad enzimática. Esta salmuera tenía 3,9 unidades de pH, 3,4 % de NaCl y 0,3 % de ácido acético. Se le ajustó el pH a distintos valores (3,5; 3,8 y 4,3) y se almacenó a temperatura ambiente. Por otra parte, estas mismas salmueras con el pH de 3,9 se almacenan a 10 °C, Tª ambiente y 40 °C.

La evolución de la concentración de oleuropeína durante 2 meses está reflejada en la Figura 47. Los resultados indican que la hidrólisis de la oleuropeína se acentúa en las salmueras con menor pH. Sin embargo, el resultado más interesante es que la hidrólisis es muy lenta a un pH de 4,3 unidades, es decir, el habitual de la salmuera de aceitunas, y estos datos coinciden con los encontrados por otros autores (Paiva-Martins y Gordon, 2005).

**Figura 47.** Evolución de la concentración de oleuropeína (mM) en salmueras de aceitunas (A: salmueras conservadas durante 2 meses a temperatura ambiente a diferentes pH, y B: salmueras conservadas durante 2 meses a un pH de 3,9 unidades y a diferentes temperaturas). Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



Indudablemente la temperatura influye enormemente sobre la reacción hidrolítica, aunque a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C) y pH 3,9, después de 2 meses la disminución en la concentración de oleuropeína no es muy apreciable. A bajas temperaturas (10 °C), la concentración de oleuropeína no disminuye. Sin embargo, conforme la temperatura aumenta (40 °C), la concentración de oleuropeína se afecta en mayor grado, disminuyendo más del 75 % después de 2 meses de conservación.

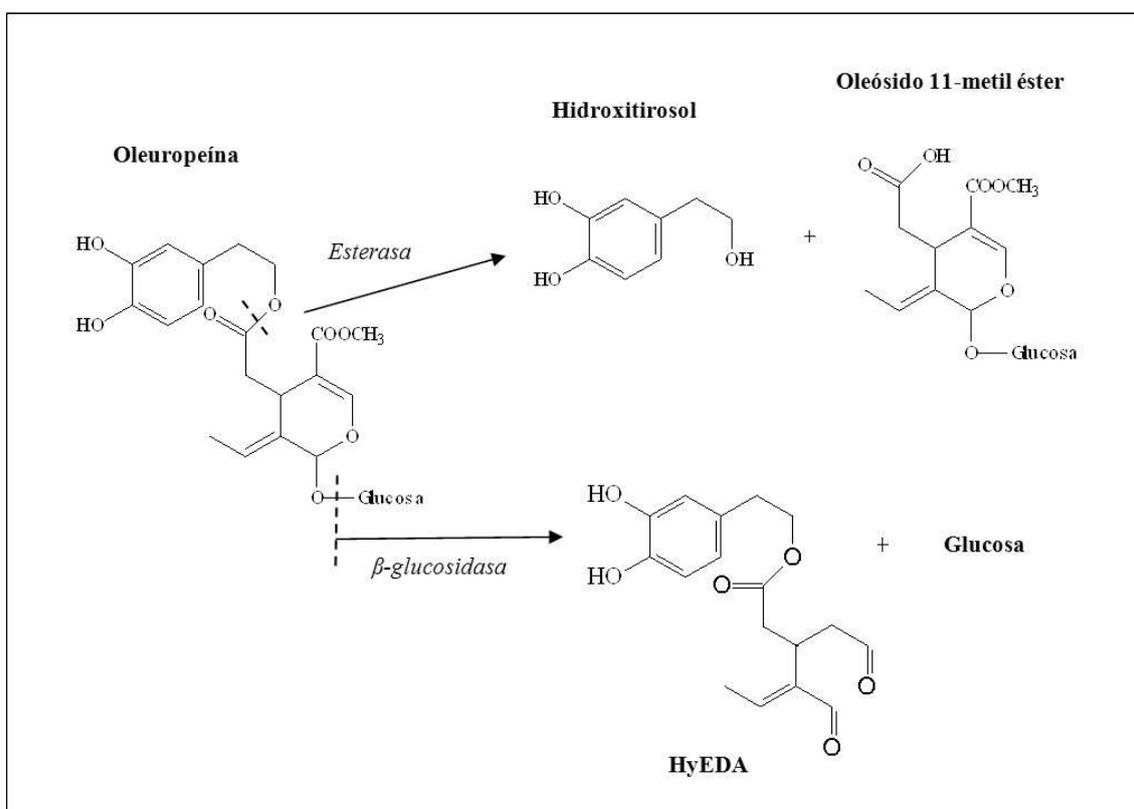
En conclusión, la hidrólisis química de la oleuropeína a temperatura ambiente y valores de pH cercanos a 4,0 unidades es un proceso lento que tardará meses o años, dependiendo de la concentración inicial del glucósido amargo.

### **4.3.1.2. Hidrólisis enzimática de la oleuropeína**

No existen estudios previos sobre la posible participación de enzimas endógenas del fruto en la hidrólisis de la oleuropeína a lo largo del proceso de fermentación de las aceitunas naturales, es decir puestas directamente en salmuera sin tratamiento previo con hidróxido sódico.

Se puede suponer que durante la elaboración de aceitunas verdes naturales las enzimas hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y esterasa) presentes en las aceitunas frescas podrían actuar sobre la molécula de la oleuropeína, descomponiéndola en hidroxitirosol y oleósido 11-metil éster por acción de la esterasa o en HyEDA y glucosa por acción de la  $\beta$ -glucosidasa (Figura 48). También, ambas enzimas pueden actuar de forma conjunta dando lugar a los compuestos fenólicos citados que no presentan amargor. En salmuera de aceitunas no tratadas con NaOH si se han detectado los compuestos de degradación de la oleuropeína aunque nunca se han relacionado con la actividad de las enzimas endógenas de los frutos (Medina y cols., 2007 y 2009).

**Figura 48.** Estructura de la oleuropeína y productos generados a partir de las transformaciones de las hidrolasas.



#### 4.3.1.2.1. Experiencia para demostrar la participación de enzimas endógenas en la hidrólisis de oleuropeína durante el almacenamiento de los frutos en salmuera

Con el objetivo de estudiar la relación entre las enzimas hidrolasas y la concentración de los compuestos fenólicos, en especial la oleuropeína, en aceitunas no sometidas a un tratamiento con hidróxido sódico se plantea un experimento donde las aceitunas se colocan en frascos con salmuera no cerrados herméticamente. Asimismo, parte de los frutos se disponen en condiciones asépticas en frascos estériles, para evitar las interferencias debidas a los microorganismos presentes de forma natural en las aceitunas, y se cierran herméticamente para evitar la entrada de aire. La mitad de los frascos se someten a un tratamiento térmico de 90 °C/10 minutos.

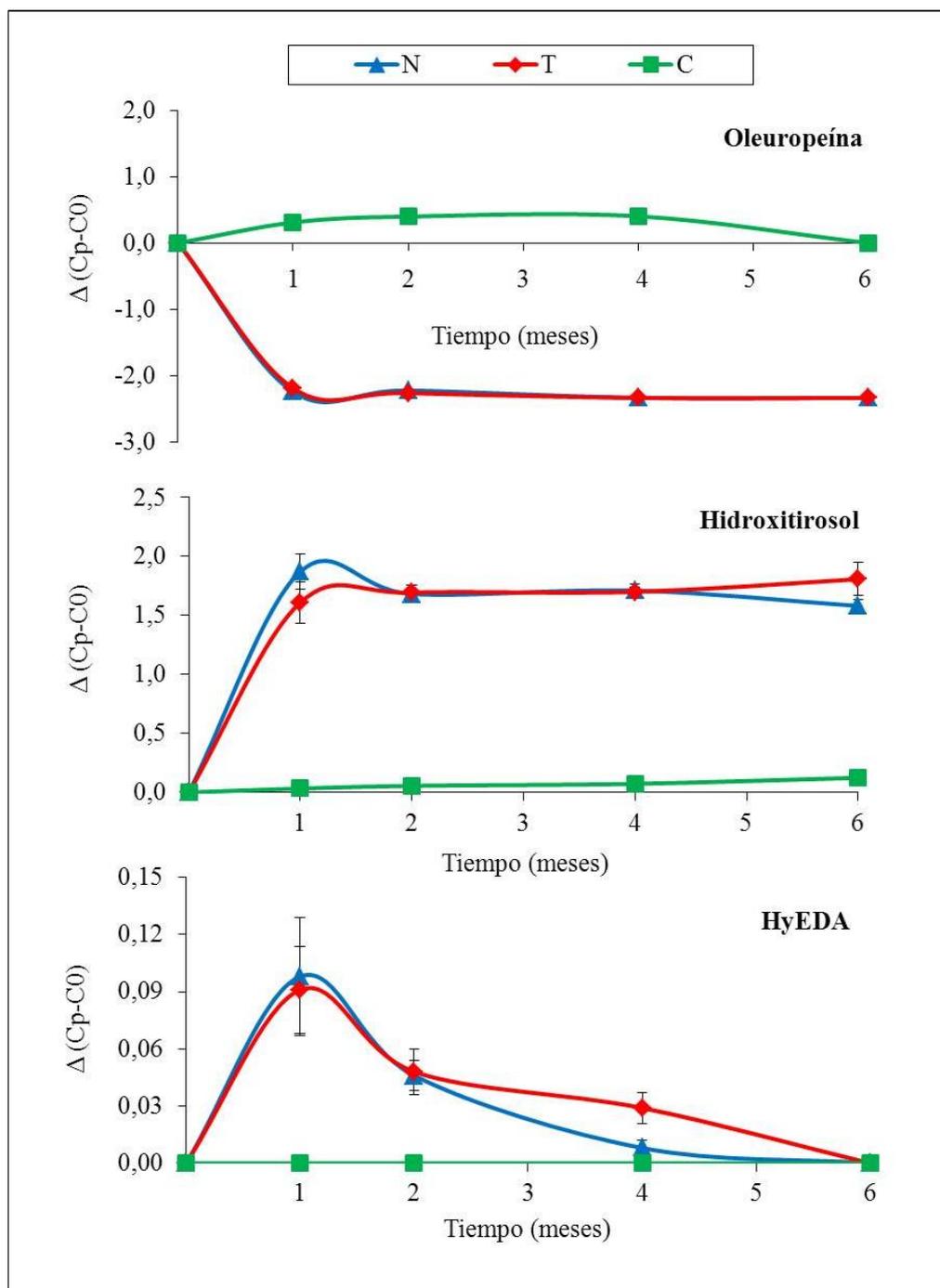
En la Figura 49 se representa el incremento de los balances de masas de los compuestos fenólicos presentes en las salmueras y pulpa de las aceitunas a lo largo del

tiempo de almacenamiento en salmuera. Se puede observar que al mes de almacenamiento se produce un descenso muy brusco de la oleuropeína en las aceitunas no tratadas de forma aséptica (N), así como en las asépticas no sometidas a calentamiento (T). Sin embargo, en las aceitunas sometidas a calentamiento (C), la oleuropeína permanece prácticamente constante a lo largo de todo el almacenamiento.

Por el contrario, durante el primer mes de almacenamiento en salmuera, en las aceitunas N y T se produce la formación de hidroxitirosol, que permanece estable hasta el final del almacenamiento. El hidroxitirosol es un compuesto fenólico que no está presente en aceitunas verdes frescas (Gutiérrez-Rosales y colbs., 2012; Ramírez y colbs., 2014a), se forma durante el procesamiento de las aceitunas mediante hidrólisis química o enzimática por acción de las  $\beta$ -glucosidasas y esterasas (Briante y colbs., 2002; Mazzei y colbs., 2009). La formación de hidroxitirosol no se produce inicialmente en los frutos tratados térmicamente, lo cual es indicativo de que el tratamiento térmico inactiva las enzimas relacionadas con su formación. Sin embargo, a partir de un mes de conservación se forma un poco, posiblemente por hidrólisis química a partir de la oleuropeína.

Por otra parte, podemos observar que el balance de masas para el HyEDA indica que en las aceitunas N y T durante el primer mes tiene un comportamiento similar al explicado para el hidroxitirosol. La formación de HyEDA ocurre durante el primer mes de almacenamiento, y posteriormente va disminuyendo hasta desaparecer a los 6 meses de almacenamiento. Es razonable pensar que exista actividad esterasa después del mes de almacenamiento que sea responsable de la hidrólisis del HyEDA, formándose hidroxitirosol, lo cual podría explicar que la cantidad de este compuesto permanezca constante hasta el final del almacenamiento de las aceitunas mientras que la concentración de HyEDA disminuye. En las aceitunas tratadas térmicamente (C) no se forma HyEDA e hidroxitirosol en muy baja cantidad, como se ha comentado anteriormente. Ya en resultados previos de esta tesis (Figura 20), a partir de los 70 °C, disminuye enormemente la actividad esterasa y  $\beta$ -glucosidasa, no detectándose actividad a 90 °C.

**Figura 49.** Balance de masas de la evolución de la cantidad de oleuropeína, hidroxitirosol y HyEDA en aceitunas de la variedad Hojiblanca sometidas a tres tratamientos distintos: no asépticas ni tratadas térmicamente (N), asépticas no tratadas térmicamente (T) y asépticas tratadas térmicamente (C). La cantidad está expresada como  $\Delta$  (Cp-C0) (Cantidad final-Cantidad inicial) (mmol). Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados.



Sin embargo, con el objetivo de conocer el efecto de la intensidad de los tratamientos térmicos sobre la actividad esterasa y  $\beta$ -glucosidasa, se hizo un nuevo experimento con aceitunas de la variedad Manzanilla preparadas de forma aséptica.

Como se puede observar en la Figura 50 la concentración de oleuropeína tanto en pulpa como en salmuera, aumenta conforme aumenta la intensidad del tratamiento térmico, coincidiendo con Medina (2008), que también afirmó el aumento en la concentración de oleuropeína en salmueras de aceitunas Manzanilla tratadas térmicamente, hecho ya observado anteriormente en esta tesis (Tabla 26). Sin embargo, y a pesar de que en las aceitunas sometidas a los tratamientos térmicos existe mayor concentración de oleuropeína, la formación de hidroxitirosol es mayor en las aceitunas que no se han sometido a ningún tratamiento térmico, seguidas de las aceitunas sometidas a 60 °C durante 10 minutos, como se observa en las dos gráficas.

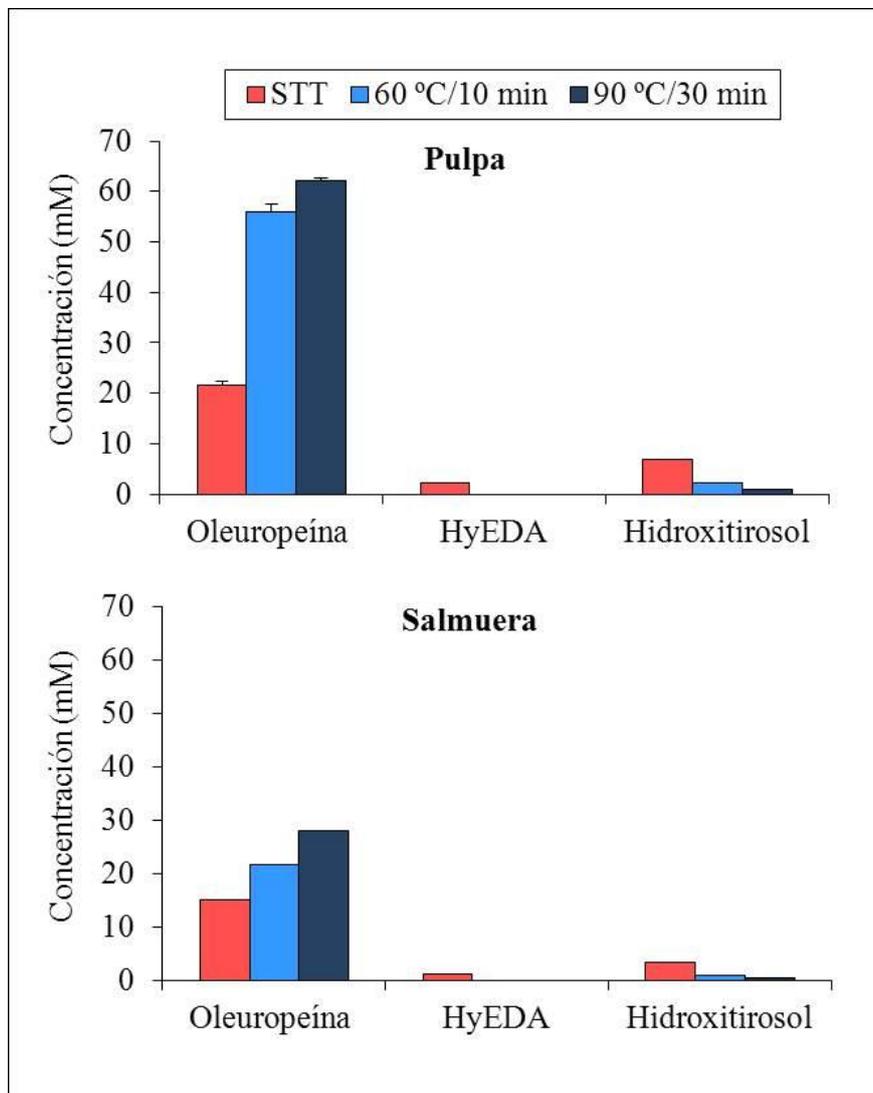
Estos resultados demuestran que el hidroxitirosol se puede formar por la acción de las esterases sobre la molécula de oleuropeína y/o HyEDA. Además, el tratamiento a 60 °C durante 10 minutos es insuficiente para la inactivación total de las enzimas, sobre todo de la esterasa cuya actividad permanece a altas temperaturas como se ha demostrado (Ramírez y cols., 2014a), ya que la formación de hidroxitirosol continúa produciéndose. También hay que tener en cuenta que la oleuropeína se puede hidrolizar químicamente, debido a la acidez de la salmuera ya que en las aceitunas calentadas a 90 °C/30 minutos, en las que no existe actividad enzimática también se produce la formación de hidroxitirosol aunque en menor proporción.

El HyEDA únicamente aparece en pulpa y salmuera de aceitunas no sometidas a ningún tratamiento térmico, lo que indica claramente que las enzimas implicadas en su formación ( $\beta$ -glucosidasa) soportan menos las altas temperaturas y un tratamiento térmico de 60 °C/10 minutos es suficiente para inactivarla.

Tal como se ha comentado anteriormente, si las aceitunas frescas se someten a tratamientos térmicos aumentan la concentración en oleuropeína analizada. En la Tabla 35 se muestran las concentraciones de oleuropeína en diferentes variedades de aceitunas sometidas a dos tratamientos térmicos y en dos campañas diferentes. En la campaña 2011-2012 la formación de oleuropeína en el fruto no es tan elevada a pesar de ser un

tratamiento más intenso (90 °C/30 minutos). En cambio, cuando el tratamiento es más suave (60 °C/15 minutos) las diferencias en la concentración de oleuropeína son más elevadas.

**Figura 50.** Concentración de oleuropeína, HyEDA e hidroxitirosol (mM) en aceitunas Manzanilla que llevan 2 meses en salmueras asépticas (5 % en NaCl y 0,5 % en ácido acético) y que han sido tratadas térmicamente a 60 °C/10 minutos y a 90 °C/30 minutos. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados. (STT: sin tratamiento térmico).



**Tabla 35.** Concentración de oleuropeína (mM) en pulpa de aceitunas frescas de diferentes variedades y campañas, tratadas o no con diferentes condiciones térmicas.

Campaña	Variedad	Tratamiento Térmico		Oleuropeína (mM)	
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Media	DE
2011-2012	Manzanilla	0	0	10,94	0,47
		60	15	55,26	1,20
	Hojiblanca	0	0	8,27	0,30
		60	15	30,16	0,22
	Gordal	0	0	1,72	0,09
		60	15	16,06	0,86
2012-2013	Manzanilla	0	0	68,22	0,69
		90	30	77,40	8,40
	Hojiblanca	0	0	24,94	0,22
		90	30	43,30	2,30

DE: desviación estándar de duplicados

No se ha encontrado una razón para explicar este incremento en la concentración de oleuropeína cuando las aceitunas se tratan térmicamente. Podría deberse a la ruptura de estructuras celulares durante el calentamiento que permiten la salida de los compuestos fenólicos, en particular oleuropeína (Medina, 2008). También, puede pensarse en la rotura de enlaces dobles entre moléculas de oleuropeína y estructuras celulares que permitan la liberación del glucósido, incluso en la presencia de dímeros, trímeros o estructuras de peso molecular elevadas donde participe la oleuropeína y que puedan verse afectados por el tratamiento térmico.

Por tanto, podemos concluir diciendo que la hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas no tratadas con NaOH, al menos durante los primeros meses de almacenamiento, se debe a la actividad de las enzimas, esterasas y  $\beta$ -glucosidasas presentes en los frutos, siendo estas responsables de la formación de hidroxitirosol e HyEDA respectivamente. Estos cambios no se observan en aceitunas sometidas a

tratamientos térmicos intensos (90 °C/30 minutos) debido a la inactivación de las enzimas con el calentamiento.

#### 4.3.1.2.2. Factores que intervienen en la hidrólisis enzimática de la oleuropeína en aceitunas no tratadas con NaOH

##### *Temperatura*

##### *a) Estabilidad térmica de $\beta$ -glucosidasa y esterasa en sistemas modelo*

En primer lugar, se realizó un experimento con extracto enzimático de aceitunas frescas para estudiar la estabilidad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa con la temperatura cuando se encuentra en unas condiciones de pH similares a las del interior de las aceitunas, que como se indica en la Tabla 14 es en torno a 5 unidades. Como se refleja en la Tabla 36 la actividad  $\beta$ -glucosidasa permanece constante a temperatura de almacenamiento baja, inferior a 10 °C, manteniéndose prácticamente inalterada durante 3 meses. Sin embargo, conforme aumenta la temperatura de almacenamiento, la actividad  $\beta$ -glucosidasa disminuye enormemente hasta inactivarse a los 2 meses en los extractos almacenados a 30 °C y en tan solo 5 días para los almacenados a 40 °C.

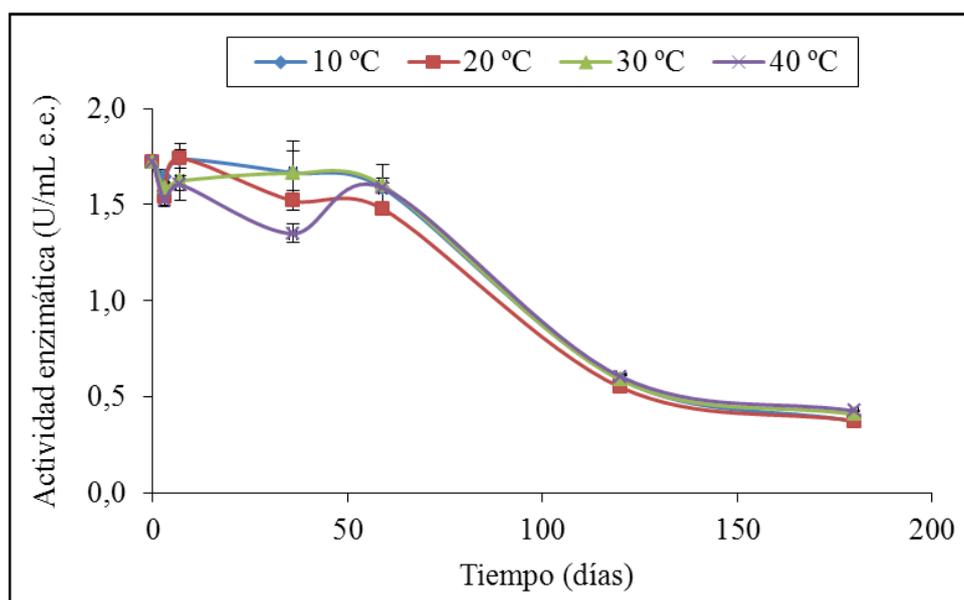
**Tabla 36.** Estabilidad térmica de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (U/mL e.e.) con el tiempo en un extracto enzimático de aceitunas Manzanillas a pH 5.

Días	10 °C	30 °C	40 °C
0	0,63 (0,01)*	0,63 (0,01)	0,63 (0,01)
5	0,54 (0,03)	0,50 (0,03)	0,06 (0,02)
56	0,51 (0,02)	0,14 (0,01)	0,00 (0,00)
88	0,60 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

\* Desviación estándar de duplicados

Por el contrario, la actividad esterasa tiene un comportamiento similar para las cuatro temperaturas de almacenamiento estudiadas (Figura 51). Se origina una inactivación paulatina para todas las temperaturas ensayadas (10-40 °C) de la actividad esterasa, menor en los primeros meses y más acentuada entre los 50 y 150 días.

**Figura 51.** Estabilidad térmica de la actividad esterasa (U/mL e.e.) con el tiempo en un extracto enzimático de aceitunas Gordales a pH 5. Las barras de error indican la desviación estándar de triplicados.



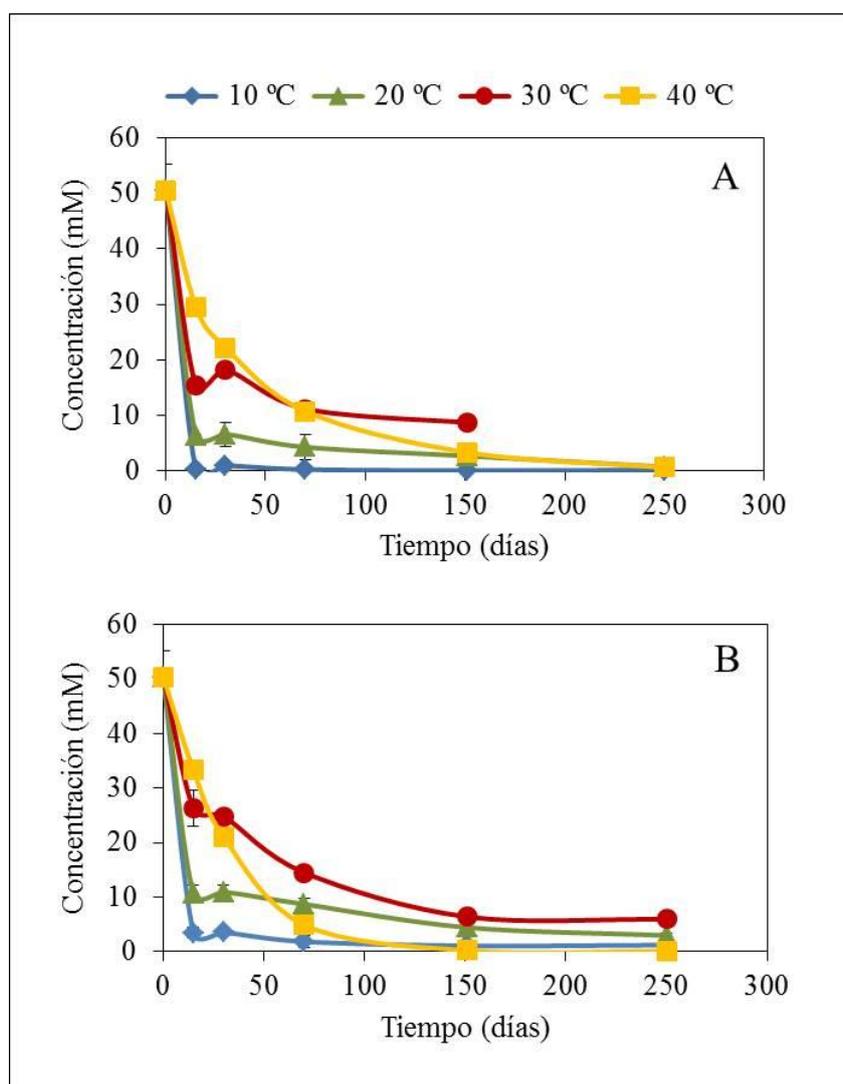
***b) Influencia de la temperatura sobre la actividad hidrolasa de aceitunas conservadas en condiciones asépticas***

A la vista de los resultados comentados anteriormente, se planifica un ensayo en condiciones asépticas para evitar la interferencia de los microorganismos. Aceitunas de la variedad Manzanilla, se almacenaron en dos salmueras de concentraciones extremas en NaCl y ácido acético (A: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético y B: 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético), y a cuatro temperaturas distintas: 10, 20, 30 y 40 °C.

En la Figura 52 se representa la evolución de la concentración de oleuropeína en la pulpa de aceitunas a lo largo del tiempo de almacenamiento. En ambas gráficas se observa como la oleuropeína se hidroliza más rápidamente cuando las temperaturas de

conservación son más bajas, 10 y 20 °C, llegando a representar esta disminución más del 80 % en los primeros 15 días. Además, conforme aumenta la temperatura de almacenamiento la hidrólisis es menor, excepto a partir de los 70 días a 40 °C, donde la hidrólisis de la oleuropeína es mayor que a 30 °C para ambas condiciones, y mayor que a 20 °C para las aceitunas almacenadas en la salmuera B. De otra parte, al final del proceso de conservación, las aceitunas almacenadas con la salmuera A, las condiciones más suaves, tienen menor concentración de oleuropeína.

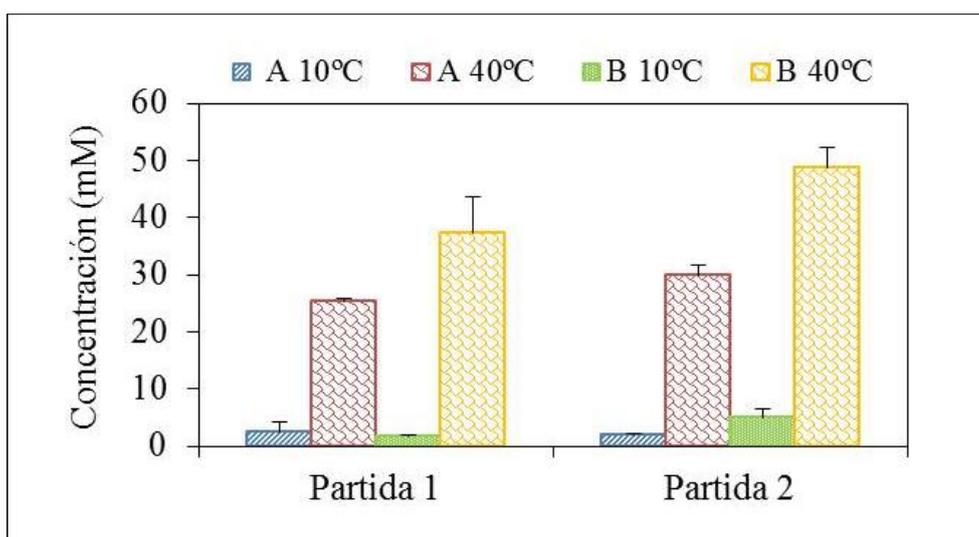
**Figura 52.** Evolución de la concentración de oleuropeína (mM) en pulpa de aceitunas de la variedad Manzanilla preparadas en condiciones asépticas y almacenadas en dos salmueras distintas: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético (A) y 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético (B). Las barras de error representan la desviación estándar de duplicados.



Estos resultados fueron muy sorprendentes e inesperados puesto que podría pensarse que a menor temperatura mayor intensidad en la hidrólisis de la oleuropeína. Por tanto, se planificó una nueva experiencia con dos partidas distintas de aceitunas Manzanilla (1 y 2), almacenadas con las dos salmueras (A y B) y conservadas a las dos temperaturas extremas, 10 y 40 °C.

Los datos representados en la Figura 53 reflejan claramente que en ambas partidas, la hidrólisis de la oleuropeína es más rápida cuando la temperatura de almacenamiento es baja (10 °C), llegando prácticamente a desaparecer a los 10 días de almacenamiento. Por el contrario, a 40 °C y cuando las concentraciones en NaCl y ácido acético de la salmuera son más elevadas, la concentración de oleuropeína en la pulpa permanece en mayor concentración, 37,44±6,26 mM para la partida 1 y 48,74±3,57 mM para la partida 2.

**Figura 53.** Concentración de oleuropeína (mM) en pulpa de aceitunas de la variedad Manzanilla de dos partidas diferentes a los 10 días de almacenamiento, preparadas en condiciones asépticas. Las aceitunas se almacenan a 10 y 40 °C con dos salmueras distintas: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético (A) y 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético (B). Las barras de error representan la desviación estándar de duplicados.



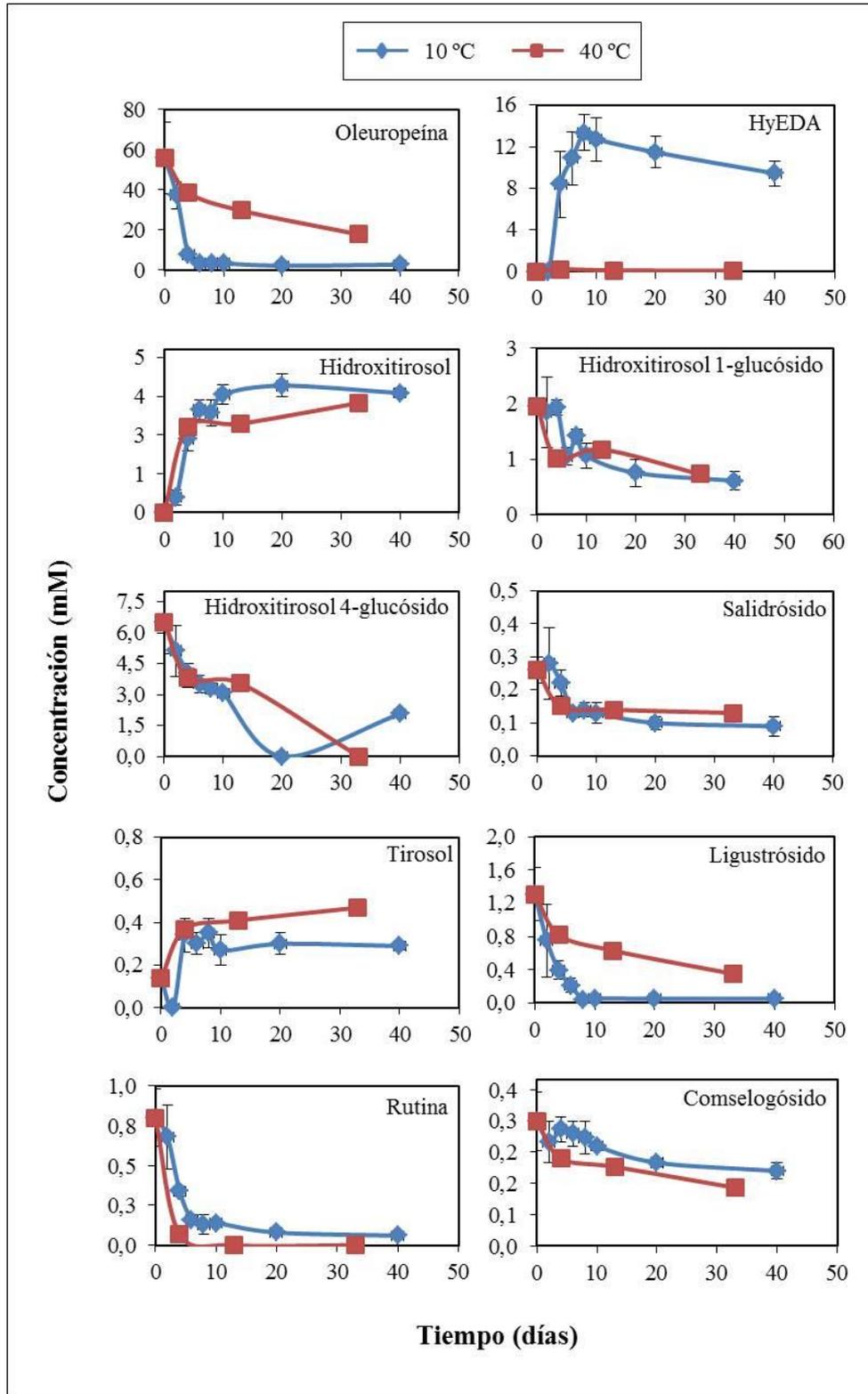
Asimismo, se realizó una tercera experiencia con aceitunas de la variedad Manzanilla, almacenadas a las dos temperaturas extremas, 10 y 40 °C, aunque con una

salmuera con mayor acidez, 6 % en NaCl y 0,6 % en ácido acético, condiciones de almacenamiento intermedias a las estudiadas anteriormente y más habituales en la industria para aceitunas naturales. La evolución de los distintos compuestos fenólicos identificados en la pulpa de las aceitunas a lo largo de 40 días de almacenamiento se encuentran representados en la Figura 54. Durante el almacenamiento de las aceitunas a las dos temperaturas, la oleuropeína es el compuesto fenólico que más disminuye su concentración, seguido por la rutina, hidroxitirosol 4-glucósido, ligustrósido, hidroxitirosol 1-glucósido, y en menor proporción el salidrósido y comselogósido, a ambas temperaturas de almacenamiento. Las diferencias más significativas de comportamiento entre temperaturas se observan para la oleuropeína y ligustrósido, cuyas hidrólisis se ven favorecidas cuando las aceitunas se almacenan a 10 °C. La concentración de oleuropeína disminuye de  $55,75 \pm 17,65$  hasta  $3,17 \pm 0,38$  mM de fruto en tan solo 10 días de conservación en salmuera.

Estas diferencias con la temperatura también se observan para otros compuestos como el hidroxitirosol e HyEDA, cuya formación es muy elevada durante los 10 primeros días del almacenamiento a 10 °C, manteniéndose su concentración estable durante el resto del tiempo. Asimismo, la formación de HyEDA sólo ocurre cuando las aceitunas se almacenan a 10 °C mientras que a 40 °C no se detecta. Estos resultados están en concordancia con los encontrados anteriormente en el estudio de sistemas modelo, en el que se indicaba que la  $\beta$ -glucosidasa es activa a 10 °C y disminuye rápidamente su actividad a 40 °C, confirmándose nuevamente la formación de este derivado de oleuropeína por la acción enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa. Por otra parte, la  $\beta$ -glucosidasa también podría actuar sobre las moléculas de hidroxitirosol 1 y 4-glucósido, hidrolizándolas hasta hidroxitirosol, lo cual justifica la disminución en la concentración que muestran estos dos compuestos. Al igual que sobre el salidrósido que formará tirosol.

Evidentemente, la temperatura de 10 °C es más apropiada para la actuación de la  $\beta$ -glucosidasa, mientras que la esterasa es menos sensible a la temperatura, como ya se ha indicado, ya que durante los 10 primeros días la formación de hidroxitirosol es similar a ambas temperaturas, el cual procederá de la acción de la esterasa sobre la oleuropeína y HyEDA. Igual ocurre con el tirosol que podría formarse mediante hidrólisis por acción de la esterasa sobre la molécula de ligustrósido.

**Figura 54.** Evolución de la concentración (mM) de compuestos fenólicos en pulpa de aceitunas de la variedad Manzanilla preparadas en condiciones asépticas, almacenadas a 10 y 40 °C en una salmuera con el 6 % en NaCl y 0,6 % en ácido acético. Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados.



Con estos resultados se demuestra una vez más la acción hidrolítica de las esterasas y  $\beta$ -glucosidasas sobre los compuestos fenólicos en aceitunas almacenadas en salmuera. Según los datos obtenidos en experiencias anteriores la actividad enzimática es más elevada en las primeras semanas de conservación, aunque no existen datos hasta ahora en relación a una rápida hidrólisis enzimática de la oleuropeína que se encuentre favorecida con las bajas temperaturas de almacenamiento.

Por otra parte, la congelación de los frutos es un recurso utilizado habitualmente en los laboratorios para la conservación de muestras cuando el análisis de los frutos no puede realizarse de forma inmediata debido al volumen de muestras. Según los resultados observados en los experimentos anteriores, una baja temperatura de almacenamiento favorece la acción de la  $\beta$ -glucosidasa hidrolizando casi al 100 % la oleuropeína del fruto en pocos días. Por tanto, sería conveniente conocer si dichas enzimas actúan en el propio fruto fresco por el hecho de conservarlo a temperaturas inferiores a cero grados. Se realiza un experimento en el que aceitunas de dos variedades tratadas o no térmicamente (60 °C/15 minutos) se congelan a dos temperaturas (-30 y -80 °C) y se estudia la concentración fenólica transcurridos 3 meses de almacenamiento.

En la Tabla 37 no se observan grandes diferencias en la concentración de oleuropeína del fruto fresco tratado térmicamente frente al no tratado para estas dos partidas, aunque siempre es algo superior en los primeros. Además, existe mucha variabilidad en la concentración de oleuropeína dependiendo de las partidas de aceitunas como hemos visto al principio de esta tesis (Tabla 2 y 3). Sin embargo, la congelación afecta de diferente manera a las aceitunas. Cuando los frutos no son tratados térmicamente y se conservan congelados, la concentración de oleuropeína disminuye de 52 a 3 mM a -30 °C y a 7,5 mM cuando se congelan a -80 °C para las de la variedad Manzanilla en solo 3 meses. De otra parte, la Hojiblanca disminuye la concentración de oleuropeína de 25,2 a 6,3 mM a -30 °C y a 3,6 mM cuando se congelan a -80 °C. Por el contrario, en las aceitunas tratadas térmicamente no se observan diferencias en la concentración de oleuropeína cuando los frutos se congelan. Además, durante la congelación en los frutos no tratados térmicamente se forma HyEDA que no aparece en los frutos que han sido tratados térmicamente antes de congelarse.

**Tabla 37.** Concentración de oleuropeína (mM) en pulpa de aceitunas de diferentes variedades conservadas durante 3 meses a diferentes temperaturas de congelación. (STT: sin tratamiento térmico)

Variedad	Tratamiento Térmico	Oleuropeína (mM)		Oleuropeína (mM)		Oleuropeína (mM)	
		Fruto fresco		Fruto congelado -30 °C		Fruto congelado -80 °C	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
Manzanilla	STT	52,00	2,78	2,96	0,05	7,45	0,30
	60 °C/15 min	56,50	6,28	62,61	3,76	58,83	0,13
Hojiblanca	STT	25,19	0,20	6,33	0,21	3,60	0,27
	60 °C/15 min	27,07	3,00	34,41	2,56	29,26	0,80

\*DE: desviación estándar de duplicados

Estos resultados demuestran una vez más que el tratamiento térmico aplicado a las aceitunas inactiva las enzimas responsables de la hidrólisis de la oleuropeína. Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas no se inactivan durante la congelación de los frutos no tratados térmicamente, incluso a -80 °C, siendo este un aspecto muy importante a tener en cuenta en el análisis de compuestos fenólicos.

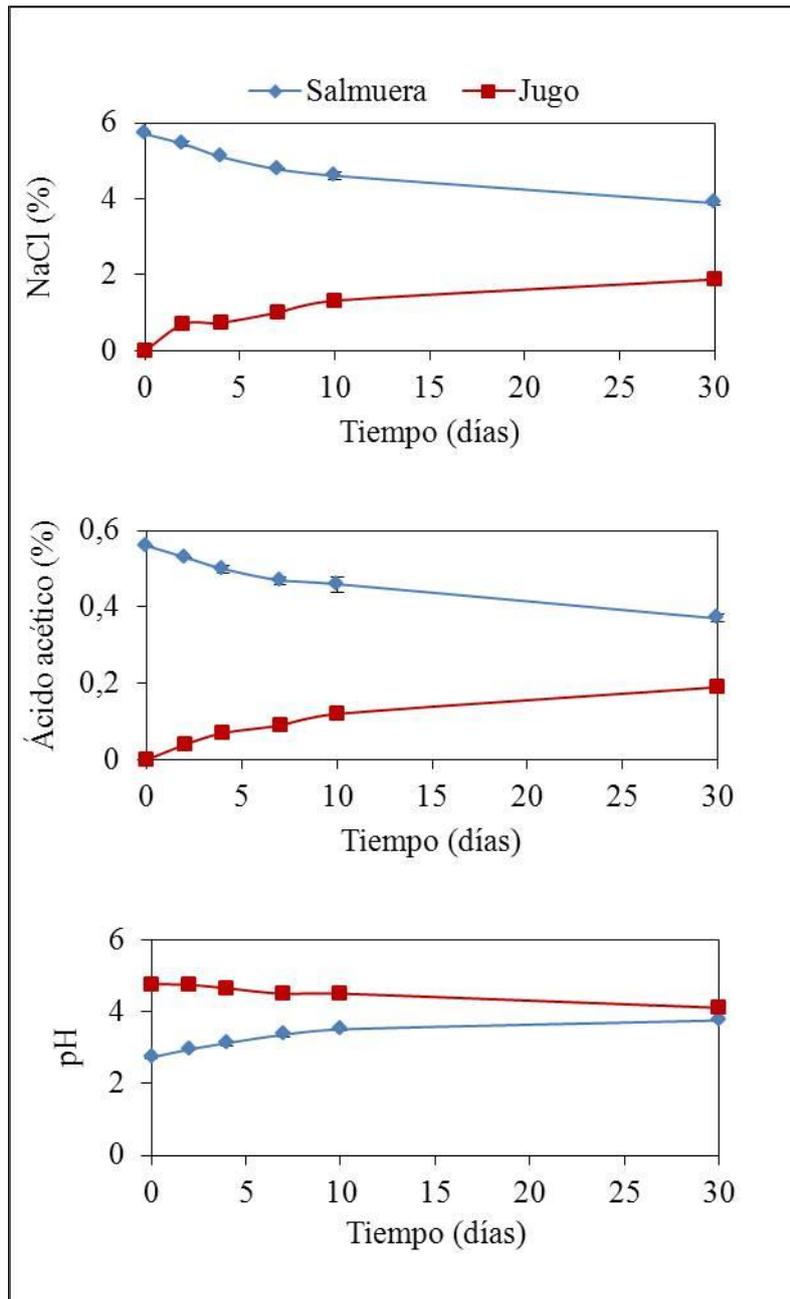
#### **Características químicas: sal, pH y acidez**

##### **a) Estudio de la velocidad de penetración de la sal y el ácido en la pulpa de las aceitunas**

La piel de las aceitunas actúa como barrera hacia la difusión bidireccional de compuestos tanto del interior de la pulpa hacia la salmuera como de la salmuera a la pulpa. En este sentido, es necesario conocer la velocidad de difusión de los compuestos presentes en la salmuera en la que se encuentran las aceitunas, ya que este fenómeno puede ejercer una gran influencia sobre la actividad enzimática. La difusión de cloruro sódico (Figura 55) cuando las aceitunas están conservadas a 10 °C es lenta, no alcanzándose el equilibrio entre la salmuera y el jugo antes del mes de conservación. Lo mismo ocurre con la difusión del ácido acético. Por el contrario, el equilibrio en los valores de pH de la salmuera y el jugo de las aceitunas sí se alcanza después de un mes de almacenamiento. Sin embargo, estudios realizados por Medina (2008), revelaron que

el equilibrio en la concentración de sal y ácido en salmuera de aceitunas Manzanilla y Gordales se alcanzaba al mes del almacenamiento, aunque los estudios se hicieron a temperatura ambiente.

**Figura 55.** Evolución del % en NaCl, % en ácido acético y pH en salmuera y jugo de aceitunas Manzanillas a lo largo de 30 días de almacenamiento a 10 °C.



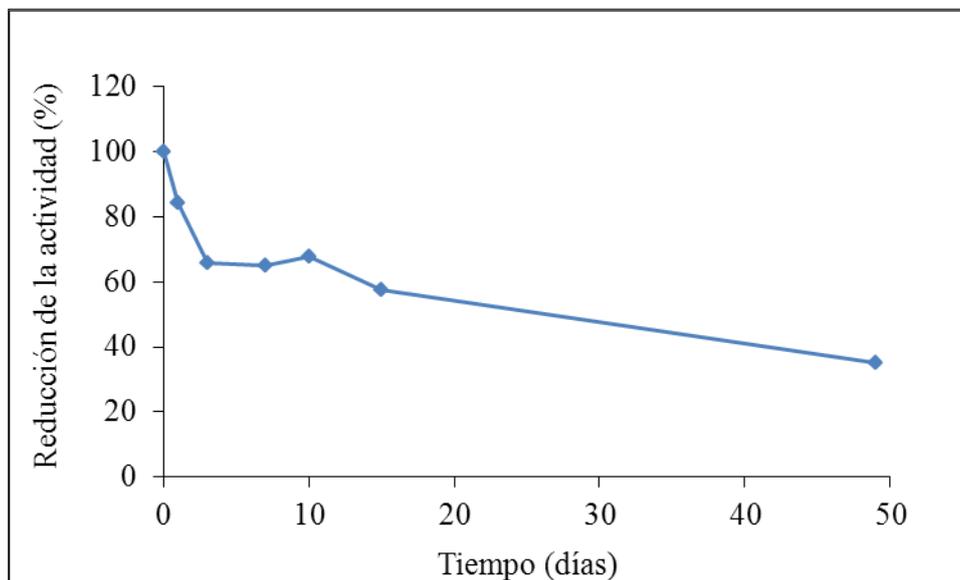
Por tanto, se puede decir que la mayor actividad enzimática, sobre todo de la  $\beta$ -glucosidasa, durante los 15 primeros días del almacenamiento encontrada anteriormente a 10 °C se ve favorecida cuando las concentraciones de sal y ácido son bajas, y el pH se mantiene cercano a 5 unidades, debido a la baja difusión de los compuestos presentes en la salmuera hacia la pulpa. Las altas temperaturas de almacenamiento aumentan la permeabilidad de la piel permitiendo la entrada de sal y ácido, y disminuyendo la actividad de las hidrolasas.

Como hemos visto, a bajas temperaturas de almacenamiento (10 °C) las enzimas hidrolasas,  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, son estables durante mucho tiempo (Tabla 36/Figura 51), sin embargo, a partir de los 8 días no se detecta ni actividad  $\beta$ -glucosidasa ni esterasa, por tanto, en condiciones reales la actividad enzimática a baja temperatura debe estar influida por otros factores, como son la concentración de NaCl y ácido acético de la salmuera de conservación.

### ***b) Estudio en soluciones modelo de la influencia de sal y acidez sobre la estabilidad de hidrolasas***

Se realiza un experimento con un extracto enzimático para estudiar la estabilidad de las hidrolasas frente al % NaCl y % ácido acético habituales en la elaboración de aceitunas verdes naturales. En este experimento se seleccionan condiciones de almacenamiento suaves (3 % en NaCl y 0,3 % en ácido acético y se conservan a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C)). Los resultados obtenidos revelan que la actividad  $\beta$ -glucosidasa es muy sensible a los componentes de la salmuera, reduciéndose su actividad de  $0,42\pm 0,14$  a  $0,23\pm 0,02$  U/mL e.e. simplemente por la adición del 3 % de cloruro sódico a tiempo cero y desapareciendo su actividad en apenas horas. Bowers y cols. (2007) también afirmaron que las sales entre las que se encontraban el cloruro sódico inhibían la actividad  $\beta$ -glucosidasa en almendras. Por otra parte, la actividad esterasa (Figura 56) también se afecta por la sal y el ácido aunque en menor grado, reduciéndose la actividad rápidamente en los primeros días al 65 % y posteriormente más lentamente casi al 40 % en los 50 días del almacenamiento. Al igual que ocurría con la temperatura, la esterasa es más resistente a los componentes de la salmuera que la  $\beta$ -glucosidasa.

**Figura 56.** Reducción de la actividad esterasa (%) de un extracto enzimático procedente de aceitunas Gordales almacenado a 10 °C con el 3 % de cloruro sódico, 0,3 % de ácido acético y pH 4,2.

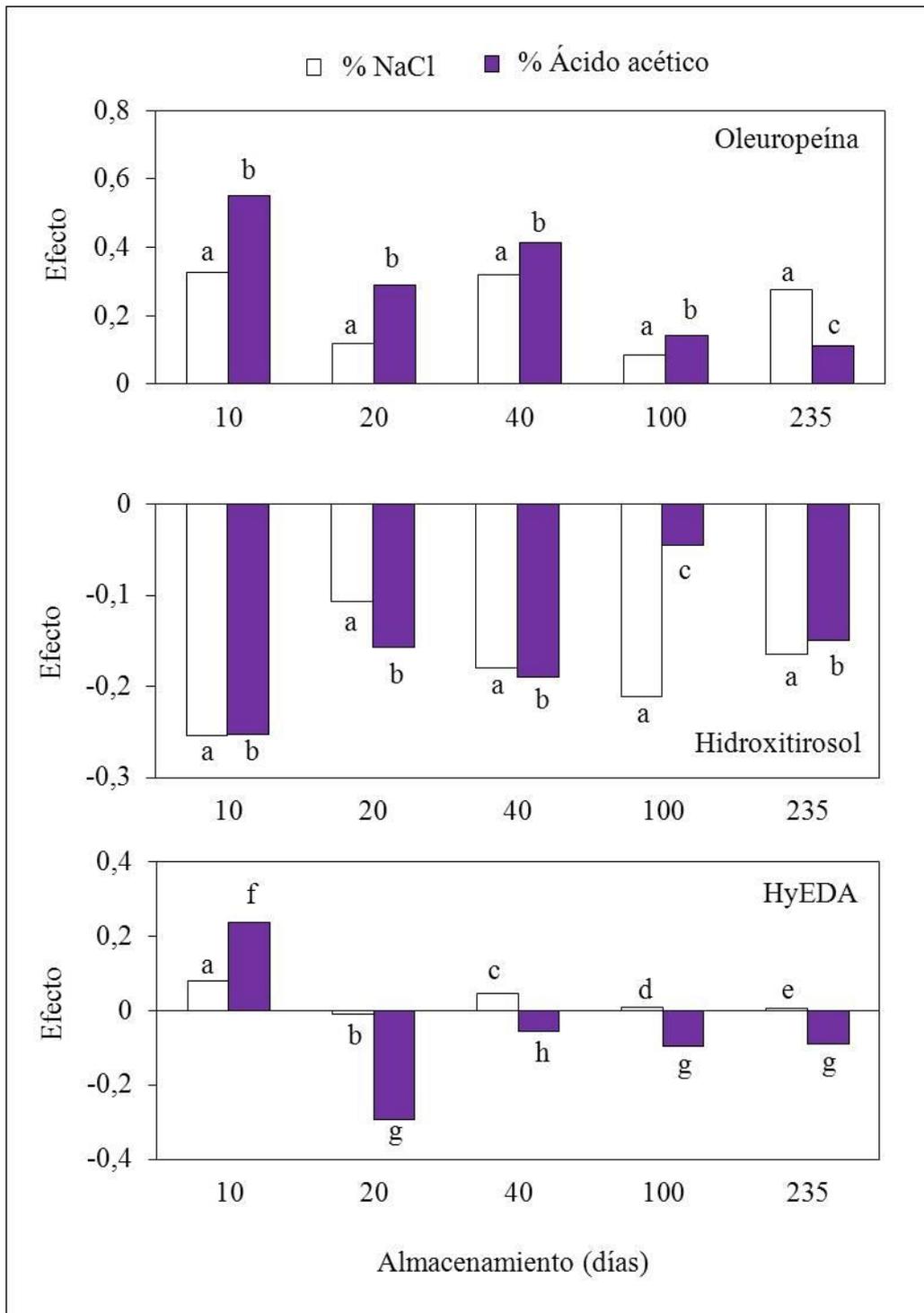


***c) Influencia de las características químicas sobre la hidrólisis de oleuropeína en frutos almacenados en condiciones asépticas***

Se planteó un experimento con las tres variedades más empleadas en la elaboración de aceitunas de mesa, Manzanilla, Hojiblanca y Gordal, preparadas en condiciones asépticas y almacenadas en salmueras con diferentes condiciones químicas de sal y acidez. Las aceitunas se mantienen a temperatura ambiente comprendida entre 21-24 °C, que son las condiciones habituales en las que se encuentran las aceitunas en los fermentadores industriales.

En el caso de la variedad Hojiblanca se realiza un experimento basado en un diseño factorial 2<sup>2</sup>, donde los parámetros estudiados son NaCl (6 % y 14 %) y ácido acético (0,2 % y 1,6 %). En la Figura 57 aparece representado el efecto de la sal y acidez sobre la cantidad de oleuropeína, hidroxitirosol e HyEDA en aceitunas de la variedad Hojiblanca.

**Figura 57.** Efecto de la sal y acidez sobre la cantidad de oleuropeína, hidroxitirosol e HyEDA (mmol) en aceitunas de la variedad Hojiblanca preparadas en condiciones asépticas. Las mismas letras para el mismo parámetro en cada compuesto evaluado indican que el efecto es significativo, según el análisis de la varianza ANOVA. Se ha aplicado un diseño factorial 2<sup>2</sup>.



El efecto de la sal y acidez sobre la cantidad de oleuropeína es positivo, siendo estadísticamente significativo en todos los puntos, excepto para la concentración de acético a los 235 días. Esto es indicativo de que a mayores concentraciones en sal y acidez en las salmueras mayor es la cantidad de oleuropeína existente y, por tanto, menor es la hidrólisis de la misma. Además, el efecto de ambos parámetros es mayor en los primeros 40 días de almacenamiento en salmuera, disminuyendo posteriormente. La acidez parece tener mayor influencia sobre la hidrólisis de la oleuropeína que la concentración de NaCl presente en las salmueras.

Asimismo, el efecto del NaCl y ácido acético es negativo en relación a la formación de hidroxitirosol. La formación de este compuesto es menor cuando la concentración de los parámetros químicos estudiados son más elevados (14 % NaCl y 1,6 % ácido acético). El efecto es estadísticamente significativo para los dos parámetros evaluados en todos los puntos, excepto a los 100 días para la concentración de ácido acético. En general, según los resultados, no parece tener una mayor o menor influencia un parámetro u otro respecto a la formación de hidroxitirosol.

Por otro lado, el efecto de la sal y acidez para la cantidad de HyEDA no está clara, aunque podemos observar que la concentración de ácido acético de las salmueras parece tener mayor efecto sobre la formación de HyEDA, siendo este efecto negativo a partir de los 20 días del almacenamiento en salmuera. Las bajas concentraciones de NaCl y ácido favorecen la formación de HyEDA, ya que la hidrólisis de la oleuropeína es mayor.

Por tanto, en los primeros días de conservación, las concentraciones bajas de NaCl y ácido acético en las salmueras favorecen la hidrólisis de la oleuropeína y la formación de hidroxitirosol en aceitunas de la variedad Hojiblanca.

Ante la necesidad de confirmar estos resultados y conociendo la variabilidad existente entre variedades se realizó otro experimento con las variedades Manzanilla y Gordal aunque sólo estudiando los casos de conservación extremos (6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético y 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético).

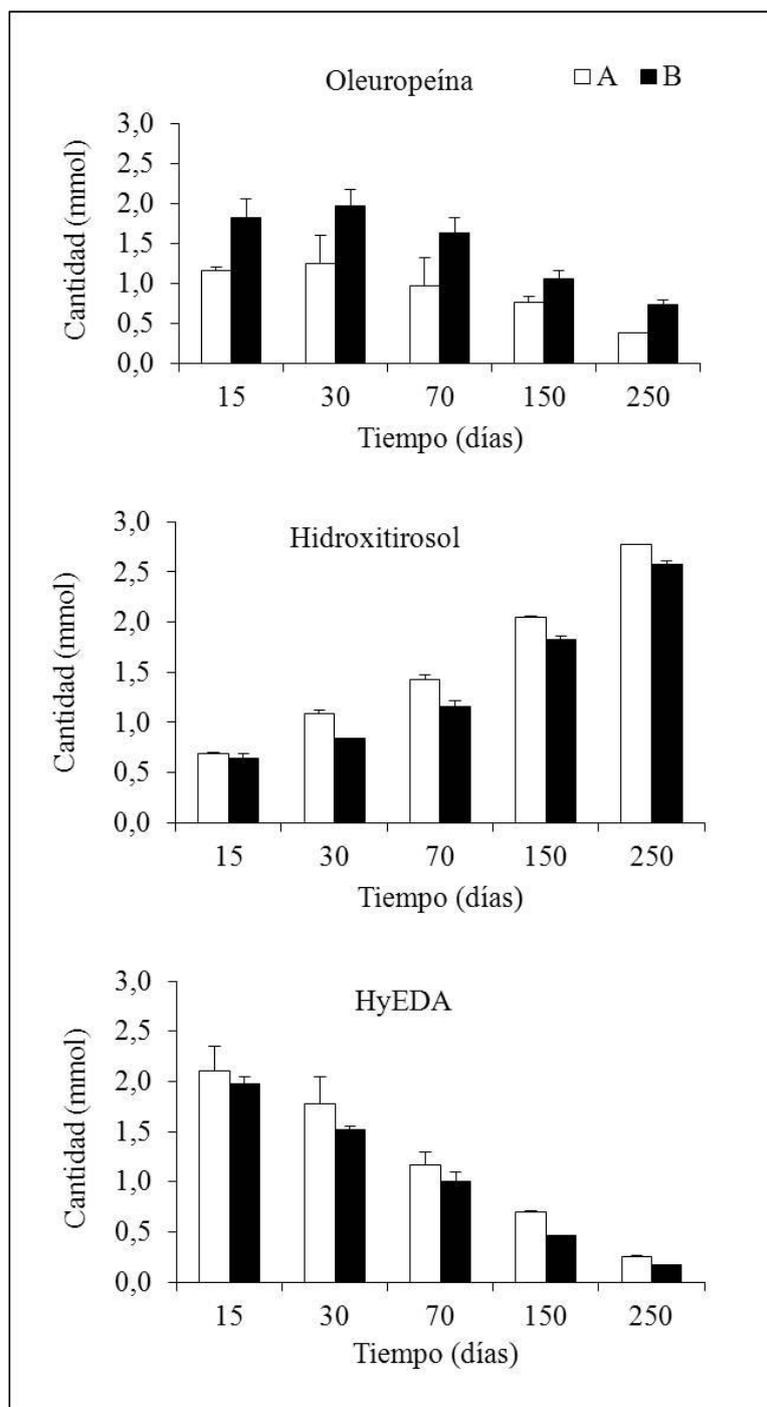
En la Figura 58 aparece representada la cantidad de oleuropeína, hidroxitirosol e HyEDA para aceitunas de la variedad Manzanilla conservadas durante 8 meses en dos salmueras con condiciones diferentes de sal y acidez. Se observa nuevamente que las concentraciones más bajas de NaCl y ácido acético de las salmueras favorecen la hidrólisis de la oleuropeína durante el almacenamiento de las aceitunas en salmuera, concretamente la cantidad disminuye de 1,16 mmol a los 15 días hasta 0,38 mmol a los 250 días.

Con respecto al hidroxitirosol, no existen diferencias tan claras, hasta los 15 días la formación es similar en ambas condiciones, aunque a lo largo del almacenamiento las salmueras menos concentradas en NaCl y ácido favorecen la formación de hidroxitirosol.

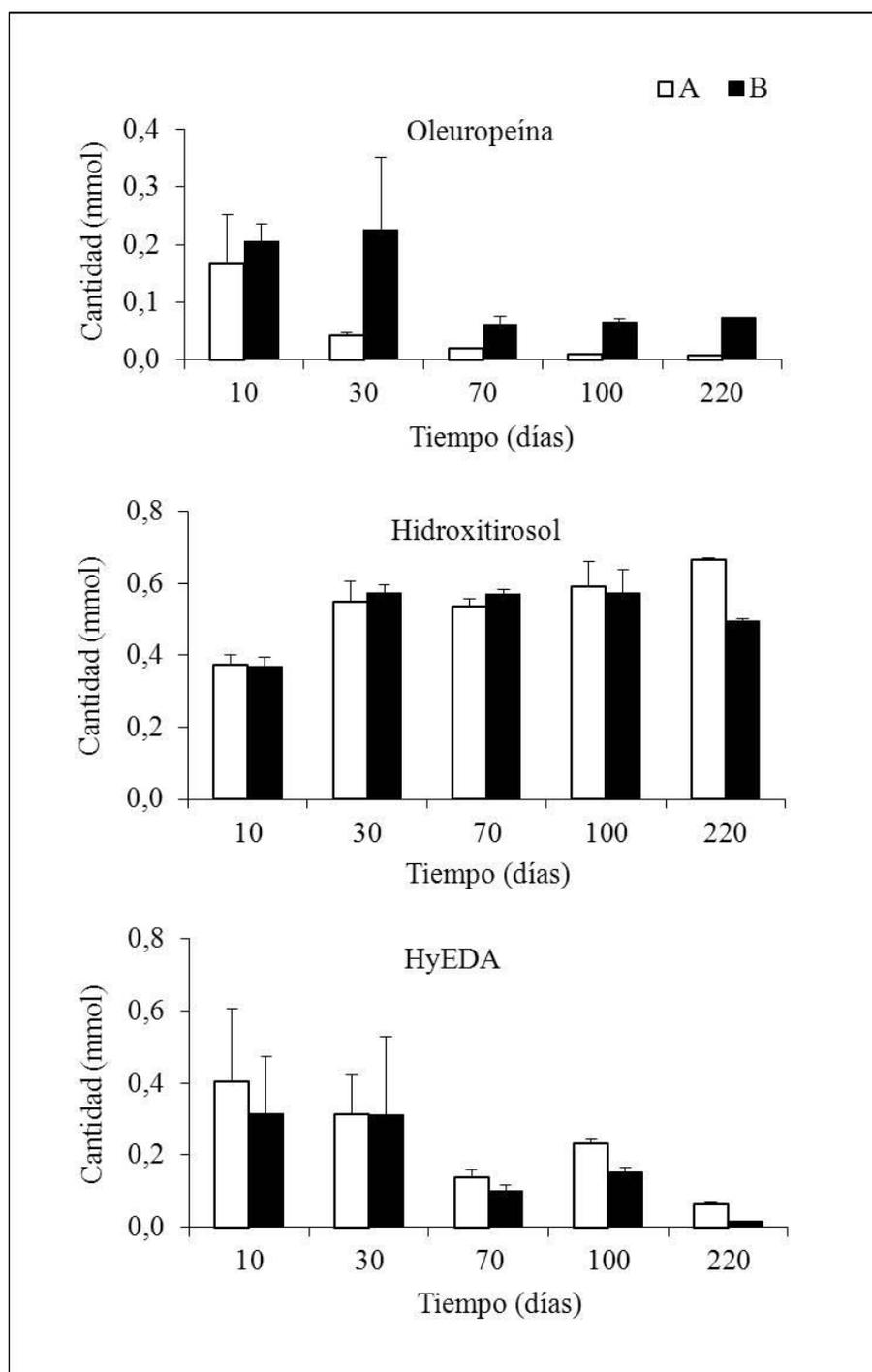
Por otra parte, la formación de HyEDA ocurre durante los 15 primeros días del almacenamiento en salmuera, a partir de los cuales su concentración va disminuyendo. La formación es mayor cuando la salmuera está menos concentrada en NaCl y ácido acético, y su hidrólisis se ve favorecida por las condiciones extremas de almacenamiento.

En la variedad Gordal, la mayor intensidad hidrolítica se produce durante los 10 primeros días del almacenamiento de las aceitunas en salmuera y de forma similar en las aceitunas almacenadas con ambas salmueras (Figura 59). Para ambos casos, se observa una disminución en la cantidad a lo largo del tiempo, llegando prácticamente a desaparecer la cantidad de oleuropeína cuando las aceitunas se conservan en la salmuera A. Esta hidrólisis es mayor durante el primer mes, aunque para las aceitunas almacenadas con salmuera B no queda claro ya que las desviaciones estándar son muy elevadas. A partir de los 70 días, la hidrólisis de la oleuropeína es más lenta en ambas salmueras de conservación.

**Figura 58.** Cantidad (mmol) de oleuropeína, hidroxitirosol e HyEDA en aceitunas de la variedad Manzanilla preparadas en condiciones asépticas. Se utilizaron dos tipos de salmuera de conservación (A: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético y B: 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético). Los resultados se obtienen del balance de masas de la pulpa y salmuera de las aceitunas. Las barras de error representan la desviación estándar de duplicados.



**Figura 59.** Cantidad (mmol) de oleuropeína, hidroxitirosol e HyEDA en aceitunas de la variedad Gordal preparadas en condiciones asépticas y conservadas en dos tipos de salmuera de conservación (A: 6 % en NaCl y 0,2 % en ácido acético y B: 14 % en NaCl y 1,6 % en ácido acético). Los resultados se obtienen del balance de materia de la pulpa y salmuera de las aceitunas. Las barras de error representan la desviación estándar de duplicados.



Con respecto al hidroxitirosol, en esta ocasión no se aprecia una diferencia significativa entre las dos condiciones de almacenamiento sobre la formación de este compuesto. En ambos casos podemos observar un aumento con el tiempo. Al final del proceso, las aceitunas con mayor concentración son las almacenadas en la salmuera A, como en el resto de variedades.

Asimismo, no existen diferencias en la concentración de HyEDA entre las dos salmueras estudiadas durante todo el proceso de almacenamiento, ya que las desviaciones estándar en los primeros puntos son muy elevadas, lo que sí se observa es una disminución más rápida de la concentración a partir del mes de almacenamiento en las aceitunas almacenadas con las distintas salmueras.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede decir que durante la conservación de aceitunas no tratadas con álcali en salmueras una menor concentración en cloruro sódico y ácido acético ejerce un efecto positivo sobre la hidrólisis enzimática de la oleuropeína, favoreciendo la formación de derivados no amargos (hidroxitirosol y HyEDA), lo cual se ha observado para las tres variedades de aceitunas más empleadas en la elaboración de aceitunas de mesa (Hojiblanca, Manzanilla y Gordal). También, a partir de los 15 días de almacenamiento no se ha detectado actividad para ninguna de las hidrolasas estudiadas, lo que se podría relacionar con la no formación de HyEDA a partir de los 15 días aunque no con el hidroxitirosol, cuya concentración aumenta durante todo el periodo de almacenamiento en las aceitunas de las variedades Manzanilla y Gordal, dicho aumento puede ser de origen químico.

### ***Estudio de las condiciones óptimas de hidrólisis de oleuropeína durante la conservación de aceitunas verdes a escala piloto***

Uno de los problemas que presenta la elaboración de las aceitunas de mesa en salmuera es el largo tiempo que necesitan para eliminar el amargor. Con el fin de acortar este tiempo y teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos sobre la influencia de la temperatura de almacenamiento y los parámetros químicos de sal y acidez sobre las transformaciones de los compuestos fenólicos, se diseñó una metodología rápida para disminuir la concentración de la oleuropeína presente en aceitunas en corto período de tiempo, simulando condiciones aplicables a escala piloto.

Para ello, se pusieron 4 fermentadores con 5,6 kg de aceitunas no tratadas asépticamente de la variedad Manzanilla y Hojiblanca, 2 fermentadores se almacenaron durante 15 días a 10 °C, y posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente (Tratamiento A), mientras que otros 2 fermentadores permanecieron a temperatura ambiente durante todo el tiempo que duró el experimento (Tratamiento B). Además, se empleó una salmuera estándar del 6 % en sal y 0,6 % en ácido acético, ya que hemos comprobado que unas condiciones bajas de estos parámetros, sobre todo la acidez, favorece la hidrólisis de la oleuropeína.

En la Tabla 38 se recogen los resultados obtenidos, donde se observa que en la variedad Manzanilla la mayor parte de la oleuropeína desaparece durante los 15 primeros días de conservación siendo esta disminución mayor cuando se conservan a 10 °C. La concentración de la oleuropeína en las aceitunas almacenadas a 10 °C es de  $2,11 \pm 0,74$  mM, mientras que en las almacenadas a temperatura ambiente es de  $7,15 \pm 1,23$  mM. Del mismo modo, la formación de HyEDA ocurre en los 15 primeros días y es más elevada en aceitunas almacenadas a 10 °C, coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente. A temperatura ambiente también se forma HyEDA, aunque en menor concentración, debido a la menor actividad  $\beta$ -glucosidasa al aumentar la temperatura, igual que ocurría a 40 °C. Sin embargo, estas diferencias no se observan para el hidroxitirosol, la formación de hidroxitirosol durante los 15 primeros días es más elevada en las aceitunas que permanecen a temperatura ambiente, aunque a partir de los 15 días la concentración en aceitunas sometidas al tratamiento A es mayor, permaneciendo hasta el final del almacenamiento, lo cual indica que la esterasa es menos sensible a la temperatura, como también se ha descrito anteriormente.

Estos mismos resultados fueron obtenidos para aceitunas de la variedad Hojiblanca, aunque debido a que la concentración de oleuropeína en el fruto fresco es más baja que en la variedad Manzanilla, la mayor parte de la oleuropeína se hidrolizaba casi por completo durante los 15 días primeros, no observándose diferencias significativas entre los dos tipos de tratamientos. Por el contrario, sí existen diferencias en la concentración de HyEDA, que es más elevada en aceitunas sometidas al tratamiento A (10 °C), mientras que en la concentración de hidroxitirosol no se observan diferencias.

**Tabla 38.** Evolución de la concentración (mM) de oleuropeína, hidroxitirosol y HyEDA en pulpa de aceitunas de la variedad Manzanilla y Hojiblanca conservadas en dos condiciones diferentes de almacenamiento: A (frutos almacenados durante 15 días a 10 °C y posteriormente se dejan a temperatura ambiente (22±2 °C)), y B (frutos almacenados a temperatura ambiente (22±2 °C)).

<b>Manzanilla</b>										
Compuestos	Tratamiento A					Tratamiento B				
	0 d	6 d	15 d	90 d	190 d	0 d	6 d	15 d	90 d	190 d
Oleuropeína	55,75 (17,65)*	9,39 (5,35)	2,11 (0,74)	1,65 (0,17)	1,24 (0,14)	55,75 (17,65)	8,65 (1,63)	7,15 (1,23)	6,38 (1,01)	6,02 (0,20)
Hidroxitirosol	0,00 (0,00)	2,76 (0,46)	4,68 (0,63)	9,23 (0,20)	11,11 (0,23)	0,00 (0,00)	4,50 (0,53)	6,06 (0,68)	8,23 (0,51)	8,92 (0,24)
HyEDA	0,00 (0,00)	11,67 (1,82)	14,11 (1,46)	4,95 (0,31)	2,45 (0,15)	0,00 (0,00)	6,33 (1,28)	3,27 (1,29)	1,55 (0,33)	0,68 (0,09)

\* Desviación estándar de cuadruplicados

<b>Hojiblanca</b>						
Compuestos	Tratamiento A			Tratamiento B		
	0 d	15 d	90 d	0 d	15 d	90 d
Oleuropeína	23,19 (0,12)*	1,62 (1,19)	0,00 (0,00)	23,19 (0,12)	1,49 (0,51)	0,18 (0,03)
Hidroxitirosol	0,00 (0,00)	4,76 (0,34)	6,16 (0,48)	0,00 (0,00)	5,43 (0,19)	6,33 (0,21)
HyEDA	0,00 (0,00)	2,77 (1,21)	1,61 (0,20)	0,00 (0,00)	1,28 (0,48)	0,64 (0,17)

\* Desviación estándar de cuadruplicados

En resumen, se puede decir que la hidrólisis de la oleuropeína en aceitunas verdes en salmuera se produce de forma química y enzimática. Durante el primer mes de almacenamiento, predomina la hidrólisis enzimática cuya actividad se encuentra favorecida por concentraciones en sal y ácido de las salmueras bajas, así como temperaturas bajas. Temperaturas más elevadas, así como concentraciones de cloruro sódico y ácido mayores, contribuyen a la inactivación de las enzimas y, por consiguiente, después de unos meses es la hidrólisis química la predominante. Es un aspecto muy importante a tener en cuenta en el diseño de preparaciones de aceitunas de mesa, ya que dependiendo de las condiciones de la salmuera, la actividad enzimática se ve, en mayor o menor medida favorecida.

### **4.3.2. Estudios para el diseño de un nuevo proceso de elaboración de aceitunas verdes naturales**

#### **4.3.2.1. Inactivación de enzimas hidrolíticas**

El tratamiento con hidróxido sódico en aceitunas verdes estilo español permite el endulzamiento de los frutos en un corto período de tiempo, además de generar un producto con un color, flavor y aroma característico debido a la fermentación láctica de los frutos. Por tanto, uno de los factores más importantes para simular aceitunas verdes naturales como verdes estilo español es el desarrollar una fermentación láctica del producto.

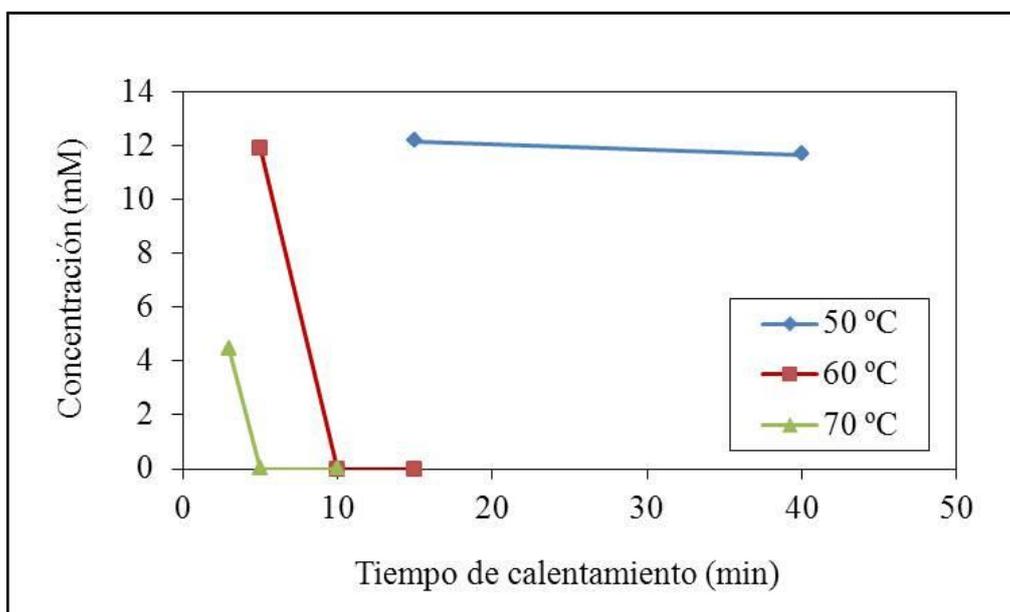
La producción y consumo de alimentos ecológicos y/o naturales se ha incrementado en los últimos años y, sin embargo, la de aceitunas ecológicas y/o naturales no ha experimentado ese aumento. Son varias las razones para este fenómeno y entre ellas está la necesidad de eliminar el amargor de las aceitunas sin el empleo de NaOH, junto con el hecho de ofrecer un producto apetecible por el consumidor. Es necesario desarrollar un producto natural que además tenga unas características organolépticas (color, textura y sabor) aceptables por el consumidor, y si se puede, lo más parecidas a los tipos de aceitunas de mesa aceptados universalmente tales como las verdes estilo español o las negras oxidadas. En concreto, es necesario por ejemplo, desarrollar unas aceitunas verdes naturales con coloración similar a las verdes estilo español. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en la presente tesis hasta ahora, se lleva a cabo el estudio de un nuevo proceso cuya intención es obtener aceitunas verdes naturales lo más parecidas a las verdes estilo español. Sin embargo, durante el almacenamiento en salmuera de aceitunas verdes no tratadas con álcali se forman compuestos antimicrobianos, como el HyEDA, que impiden el desarrollo de las bacterias lácticas (Medina y cols., 2007; Brenes y cols., 2010).

Tal como se ha demostrado anteriormente, el compuesto HyEDA se forma durante la permanencia de las aceitunas en salmuera a partir de la oleuropeína por acción de la  $\beta$ -glucosidasa endógena durante los primeros meses de almacenamiento. Por ello, se planteó la inactivación de la enzima mediante tratamiento térmico del fruto fresco. Desde los años 70 se sabe que el tratamiento térmico de las aceitunas Manzanilla

favorece el crecimiento posterior de los lactobacilos en las salmuera, aunque no se ha dado explicación a este fenómeno (Rodríguez-Borbolla y cols., 1971; Fleming y cols., 1973). Resultados previos de esta tesis con soluciones modelo indican que la actividad  $\beta$ -glucosidasa disminuye enormemente cuando se realizan tratamientos con calor a partir de los 50 °C (Figura 20). Por ello, se planificó un experimento para identificar los tratamientos térmicos más óptimos en los que no se produzca la formación de HyEDA y por consiguiente se favorezca la fermentación láctica.

En la Figura 60 se observa que cuando el calentamiento se lleva a cabo a 50 °C, independientemente del mayor o menor tiempo de duración del tratamiento, se produce la formación de HyEDA. Los tratamientos a 50 °C, incluso durante 40 minutos, son ineficaces para inactivar la  $\beta$ -glucosidasa. Es necesario someter las aceitunas como mínimo a una temperatura de 60 °C durante 10 minutos para inactivar las enzimas responsables de la formación de HyEDA.

**Figura 60.** Concentración de HyEDA (mM) en jugo de aceitunas Manzanilla sometidas a distintos tratamientos térmicos.



El empleo de temperaturas superiores puede disminuir el tiempo de calentamiento a 5 minutos. Sin embargo, cuando el tiempo del tratamiento a 70 °C es menor a 5 minutos se produce la formación de HyEDA, aunque en menor concentración

que cuando se emplean temperaturas de 60 °C. Estudios previos confirman que el aumento de la temperatura del tratamiento conlleva una disminución de la actividad enzimática (Romero-Segura y cols., 2009; Kara y cols., 2011). Resultados previos de esta tesis (Figura 20) indican que la actividad β-glucosidasa es máxima a 30 °C y disminuye más del 80 % a 70 °C. El inconveniente de someter las aceitunas a tratamientos térmicos elevados es la posibilidad de producir alteraciones en algunos parámetros tales como la textura (Brenes y cols., 1994) resultando un producto final con baja aceptación para el consumidor.

Aceitunas de las variedades Manzanilla y Hojiblanca se someten a distintos tratamientos térmicos en los cuales se asegura la inactivación de la enzima β-glucosidasa, y se conservan en salmuera (5 % en NaCl y 0,5 % en ácido acético) durante 6 meses. Las características químicas del producto final están recogidas en la Tabla 39.

**Tabla 39.** Parámetros químicos y concentración de oleuropeína e HyEDA (mM) en salmueras de aceitunas Manzanilla y Hojiblanca conservadas durante 6 meses en fermentadores de 3 kg y sometidas a distintos tratamientos térmicos previos a su colocación en salmuera.

	Tratamiento térmico	NaCl (%)	pH	Acidez Libre (% ácido láctico)	Oleuropeína (mM)	HyEDA (mM)
<b>Manzanilla</b>	Control	3,5 (0,2)*	4,5 (0,0)	0,6 (0,1)	3,08 (0,97)	0,64 (0,16)
	60 °C/10 min	3,4 (0,0)	3,7 (0,0)	1,4 (0,0)	11,83 (0,68)	0,00 (0,00)
	70 °C/5 min	3,2 (0,0)	3,7 (0,0)	1,6 (0,0)	18,78 (1,38)	0,00 (0,00)
	80 °C/5 min	3,4 (0,0)	3,7 (0,0)	1,7 (0,2)	9,43 (1,98)	0,00 (0,00)
<b>Hojiblanca</b>	Control	3,0 (0,0)	3,9 (0,0)	1,5 (0,0)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
	60 °C/10 min	3,0 (0,1)	3,6 (0,0)	1,9 (0,1)	1,87 (0,07)	0,00 (0,00)
	70 °C/5 min	2,9 (0,0)	3,6 (0,1)	1,9 (0,0)	3,77 (1,38)	0,00 (0,00)
	80 °C/5 min	3,1 (0,2)	3,7 (0,1)	1,7 (0,1)	3,03 (0,67)	0,00 (0,00)

\* Desviación estándar de duplicados

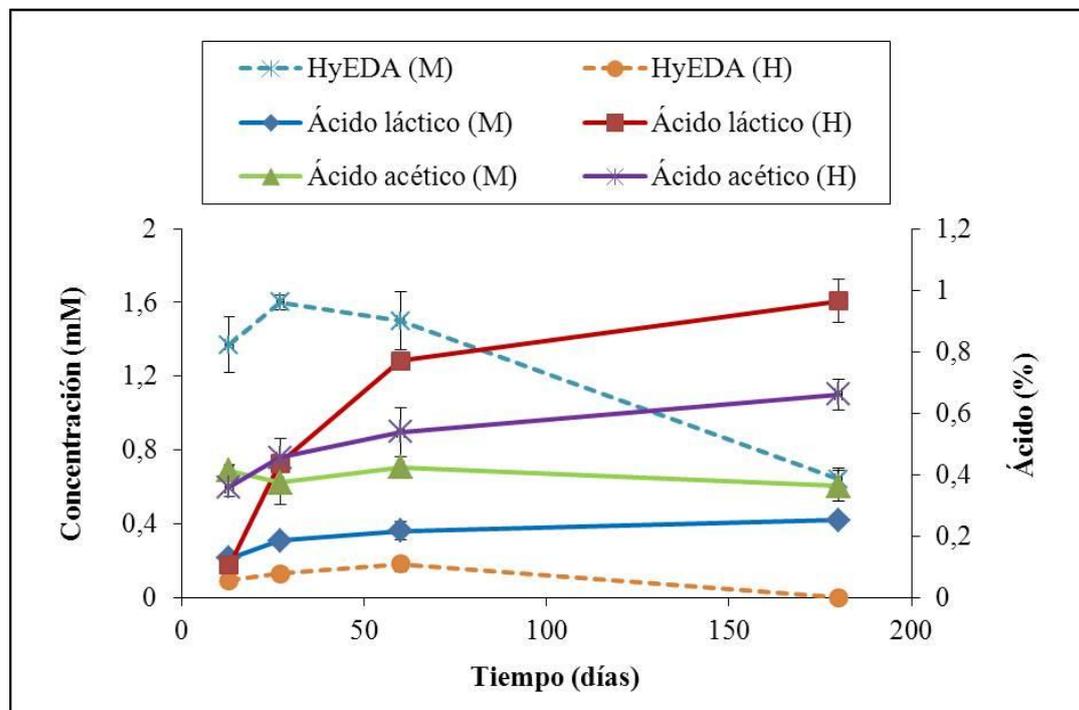
Las salmueras de los fermentadores control de las aceitunas de la variedad Manzanilla mantienen un pH más elevado y una acidez libre inferior que en las

aceitunas sometidas a los distintos tratamientos térmicos, lo que es indicativo de que la fermentación no ha tenido lugar en los controles. Con respecto a la variedad Hojiblanca, los parámetros de pH y acidez libre son relativamente similares, tanto en las aceitunas tratadas térmicamente como en las controles. La fermentación láctica ocurre en todos los casos debido a la ausencia de HyEDA.

De otra parte, los tres tratamientos de calor aplicados evitan la formación de este compuesto, coincidiendo con resultados previos en los que la concentración de HyEDA en pulpa de aceitunas era inferior en aceitunas escaldadas que en frutos no calentados (Montedoro y colbs., 2002). Por el contrario, en las aceitunas control de la variedad Manzanilla, que no han sido sometidas a ningún calentamiento, se genera este compuesto inhibitorio que impide el desarrollo de la fermentación láctica, a pesar de haberse inoculado los fermentadores.

Los resultados de la evolución del ácido láctico y acético de las salmueras de aceitunas control, no tratadas térmicamente, así como la concentración de HyEDA en ambas variedades durante los 6 meses de almacenamiento en salmuera se muestran en la Figura 61. La presencia de HyEDA en la salmuera de aceitunas Hojiblanca es más baja comparada con la de la variedad Manzanilla. Según resultados previos (Ramírez y colbs., 2014a), la aceituna Hojiblanca es una variedad que presenta una menor concentración de oleuropeína y una actividad  $\beta$ -glucosidasa menor en comparación con la variedad Manzanilla. De hecho, en la Figura 62 se observa en las salmueras de conservación de las muestras control que la concentración de oleuropeína en las aceitunas Hojiblanca es nula. Por esta razón, la concentración de HyEDA formada es más baja y sólo se detecta en los primeros meses de conservación. Según los resultados obtenidos, concentraciones bajas de HyEDA entre 0,09-0,18 mM (Figura 61) permiten el desarrollo de la fermentación ya que no inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas inoculadas. Estos datos se encuentran en consonancia con los obtenidos por Medina y colbs. (2007), que indican que se necesita concentraciones superiores a 0,25 mM de HyEDA para inhibir el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* en aceitunas en salmuera.

**Figura 61.** Concentración de HyEDA (mM), ácido acético y láctico (%) en aceitunas Manzanilla (M) y Hojiblanca (H) durante el almacenamiento en salmuera. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.

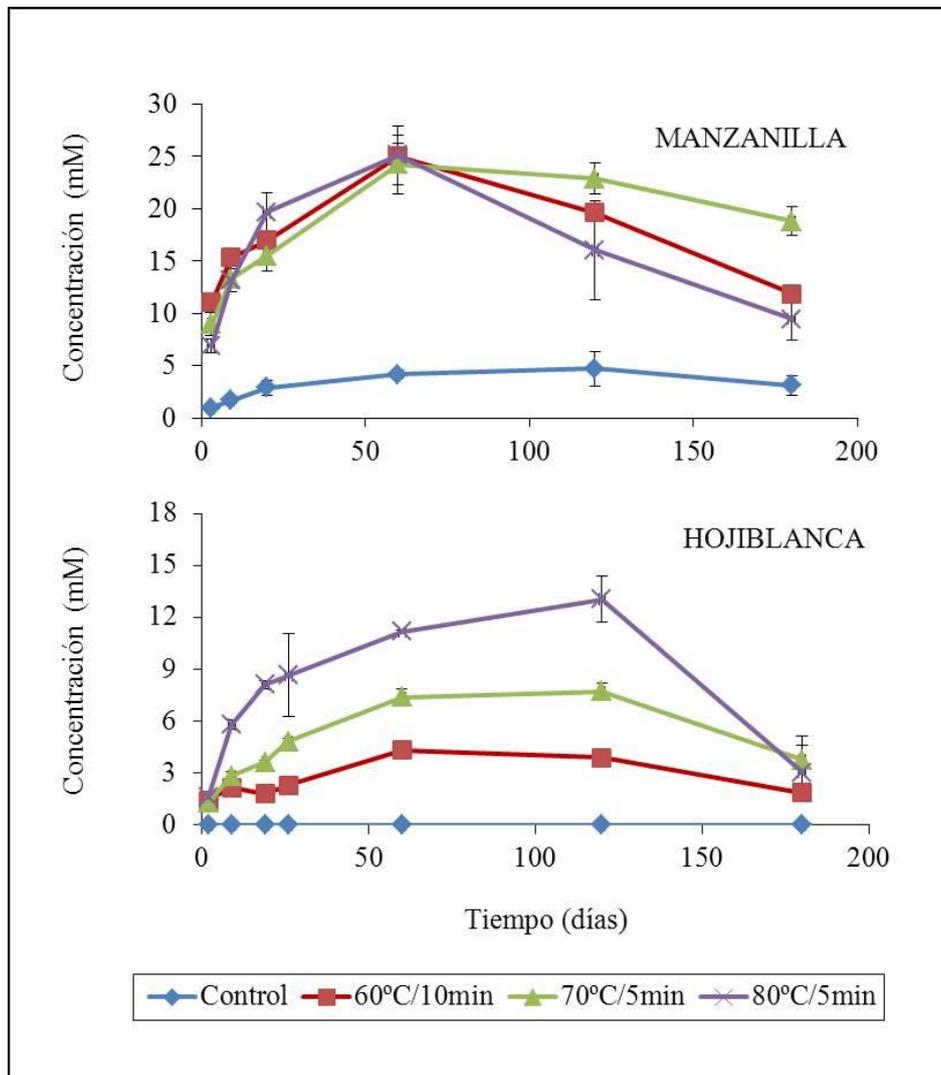


Como se observa en la Figura 61 para las aceitunas Hojiblanca, en los primeros 60 días se forma la mayor parte del ácido láctico procedente de la fermentación. Por el contrario, en aceitunas Manzanilla apenas hay formación de ácido láctico a lo largo de la conservación. La baja concentración detectada se debe al no desarrollo de bacterias lácticas ya que se ven inhibidas por las altas concentraciones de HyEDA encontradas en estas salmueras. La concentración de ácido acético no sufre cambios a lo largo de todo el proceso para ambas variedades.

Por otra parte, en las salmueras en las que se encuentran conservadas las dos variedades estudiadas (Figura 62) se observa que la concentración de oleuropeína es más elevada en las salmueras procedentes de aceitunas tratadas térmicamente, situándose en los primeros días entre 7-11 mM para la variedad Manzanilla mientras que para la Hojiblanca en torno a 1,4 mM de oleuropeína. Medina (2008) también observó el aumento en la concentración de oleuropeína en salmueras de aceitunas Manzanilla tratadas térmicamente. La concentración aumentó durante los 60 primeros

días, a partir de los cuales comienza a descender, mientras que para la variedad Hojiblanca empieza a disminuir a partir de los 120 días. La mayor concentración de oleuropeína en las salmueras de aceitunas tratadas térmicamente probablemente es debido al aumento de la permeabilidad de los frutos cuando se someten al tratamiento térmico.

**Figura 62.** Evolución de la concentración de oleuropeína (mM) en salmueras de aceitunas Manzanilla y Hojiblanca sometidas a distintos tratamientos térmicos previos a su colocación en salmuera. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.



Las aceitunas Manzanilla sometidas a los tratamientos térmicos presentan un color verde parecido al de aceitunas verdes fermentadas (Tabla 40), no existiendo

diferencias significativas para los tres tratamientos térmicos aplicados. Por el contrario, en las aceitunas control el color es más oscuro, los valores de los parámetros  $L^*$  y  $b^*$  son inferiores mientras que el parámetro  $a^*$  es mayor, siendo significativamente distintos a los de las aceitunas tratadas térmicamente. Con respecto a la variedad Hojiblanca, los parámetros de color  $L^*$  y  $b^*$  no muestran diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que el parámetro  $a^*$  presenta un valor significativamente mayor para el control, más rojizo. Esta mejora del color ocurre en las dos variedades siendo más significativa en la variedad Manzanilla. En la Figura 63 se puede observar esta diferencia de color entre las aceitunas control y aquellas tratadas térmicamente para la variedad Manzanilla y después de 6 meses de fermentación.

**Tabla 40.** Parámetros físicos de aceitunas Manzanilla y Hojiblanca conservadas durante 6 meses en salmuera en fermentadores de 3 kg, sometidas a distintos tratamientos térmicos previos a su colocación en salmuera. Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

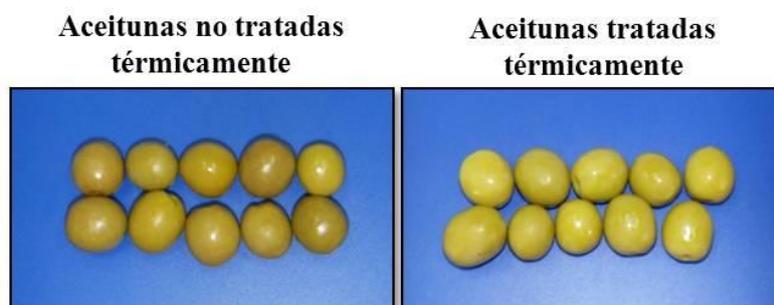
	Tratamiento térmico	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Textura (kN/100 g fruto deshuesado)
<b>Manzanilla</b>	Control	46,7 (0,1)* a	6,5 (0,1) a	31,3 (2,0) a	6,5 (0,5) a
	60 °C/10 min	54,0 (0,9) b	1,8 (0,1) b	37,7 (0,7) b	6,1 (0,0) a
	70 °C/5 min	54,2 (1,1) b	1,6 (0,0) b	38,0 (0,8) b	5,1 (0,0) a
	80 °C/5 min	54,5 (1,0) b	1,7 (0,1) b	37,8 (0,9) b	3,9 (1,0) b
<b>Hojiblanca</b>	Control	51,8 (1,2) a	5,0 (0,2) a	30,8 (0,3) a	7,9 (0,5) a
	60 °C/10 min	54,0 (0,3) a	2,9 (0,2) b	32,3 (0,5) a	4,5 (0,9) b
	70 °C/5 min	51,2 (1,0) a	2,3 (0,2) b	31,8 (1,4) a	4,5 (0,9) b
	80 °C/5 min	52,6 (1,0) a	1,8 (0,3) c	32,9 (0,8) a	4,3 (0,7) b

\* Desviación estándar de duplicados

Asimismo, no se observan diferencias significativas en relación a la textura de las aceitunas Manzanilla sometidas a los tratamientos de 60 °C/10 minutos y 70 °C/5 minutos con respecto al fruto no tratado térmicamente. Por el contrario, en los frutos que se someten a 80 °C/5 minutos se produce una importante pérdida de textura (Tabla

40). Sin embargo, en las aceitunas Hojiblanca, los tres tratamientos térmicos provocan una disminución en la textura, siendo estadísticamente diferente al control, aunque en este caso, a diferencia de la variedad Manzanilla puede resultar un aspecto positivo ya que las aceitunas de la variedad Hojiblanca se caracterizan por ser muy duras y fibrosas.

**Figura 63.** Aceitunas Manzanilla no tratadas térmicamente (Controles) y sometidas a un tratamiento térmico (60 °C/10 minutos), finalizada su fermentación/conservación después de 6 meses.



Por tanto, se podría decir que la aplicación de tratamientos térmicos no demasiado intensos (60 °C/10 minutos) es suficiente para inactivar las  $\beta$ -glucosidasas y, por tanto, evitar la formación del antimicrobiano HyEDA, con lo que se favorece el desarrollo de bacterias lácticas. Además, las aceitunas obtenidas tienen unas características similares a las elaboradas al estilo español con NaOH, el color desarrollado es más claro y no existe una pérdida importante de textura. Sin embargo, la concentración en oleuropeína de los frutos permanece muy elevada hasta después de 6 meses de fermentación, por lo que el amargor es muy acentuado.

#### 4.3.2.2. Estudio de la capacidad hidrolítica de las BAL sobre la molécula de oleuropeína

##### 4.3.2.2.1. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en soluciones modelo

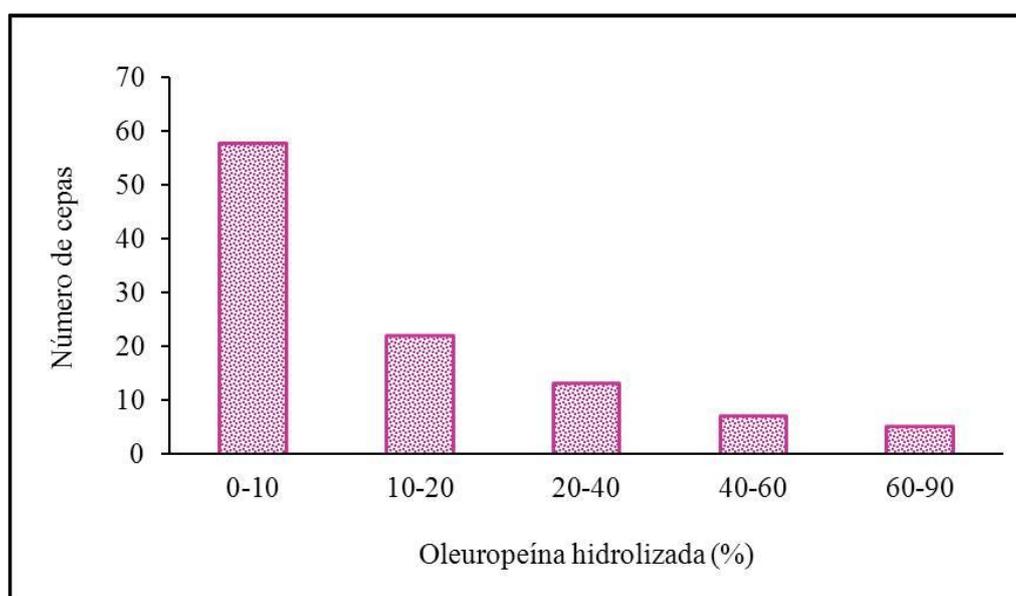
La alternativa natural, sin el empleo de NaOH, para eliminar el amargor, es decir la oleuropeína, pueden ser los microorganismos fermentativos, especialmente bacterias lácticas. Existen numerosos estudios en los cuales se han seleccionado bacterias lácticas

con capacidad  $\beta$ -glucosidasa, no productoras de aminas biógenas (Bleve y colbs., 2015) y que pueden hidrolizar la oleuropeína (Servilli y colbs., 2006).

Por tanto, se llevó a cabo un estudio para la selección de cepas de BAL con capacidad de hidrolizar la oleuropeína en aceitunas verdes en salmuera. Todas las cepas de BAL se aislaron de salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo español o naturales en salmuera.

Se inoculan las cepas, en un medio mínimo con unas concentraciones de sal, acidez y oleuropeína comercial similares a las que se encuentran en las salmueras de aceitunas. El medio mínimo también contiene glucosa, peptona y extracto de levadura que aportan los nutrientes necesarios para la supervivencia de las bacterias. Este experimento se realiza con 105 cepas de bacterias lácticas, de las cuales como se representa en la Figura 64 más de la mitad (58 cepas) no presentan capacidad para hidrolizar la oleuropeína. Por el contrario, de todas las cepas estudiadas, 7 cepas son capaces de hidrolizar entre el 40-60 %, y únicamente 5 cepas, son capaces de hidrolizar un porcentaje elevado de oleuropeína que se sitúa, entre el 60 y 90 % de la concentración inicial.

**Figura 64.** Distribución de cepas de BAL según su porcentaje de hidrólisis en soluciones modelo.



Las cepas con mayor capacidad hidrolítica son BAL 46, BAL 64, BAL 80, BAL 94 y la cepa de colección CECT 748. Todas ellas son especies de lactobacilos propias de las fermentaciones lácticas que ocurren en las aceitunas (De Castro y colbs., 2002; Hurtado y colbs., 2012; Lucena-Padrós y colbs., 2014) e hidrolizan más del 75 % de la oleuropeína en 10 días en condiciones anaeróbicas como se puede ver en la Tabla 41, excepto la BAL 94 que hidroliza un porcentaje inferior al 65 % de la oleuropeína añadida inicialmente. Estas cepas pertenecen a las especies *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus pentosus* según su identificación por análisis API50 y por el método descrito por Torriani y colbs. (1999).

**Tabla 41.** Porcentaje de oleuropeína hidrolizada por cepas de BAL en soluciones modelo después de 10 días.

Cepa	Oleuropeína inicial (mM)	Oleuropeína final (mM)	Oleuropeína hidrolizada (%)
BAL 64 ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )	6,55 (0,02)*	1,46 (0,14)	77,69 (2,96)
BAL 94 ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	6,91 (0,06)	2,45 (0,22)	64,55 (4,03)
BAL 80 ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )	6,91 (0,06)	1,73 (0,12)	74,95 (2,19)
BAL 46 -	6,85 (0,12)	1,32 (0,08)	80,75 (1,20)
CECT 748 ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	6,55 (0,02)	1,31 (0,06)	79,95 (1,20)

\* Desviación estándar de duplicados

Una vez identificadas las cepas con mayor capacidad para hidrolizar la oleuropeína en un medio mínimo, se diseña un experimento en el cual las bacterias se inoculan en salmueras asépticas procedentes de aceitunas que han sido sometidas a un tratamiento térmico y, por tanto, tienen una elevada concentración de oleuropeína. Estas salmueras no contienen el compuesto antimicrobiano HyEDA, por lo tanto no deben ejercer actividad inhibitoria frente a las BAL inoculadas. Este ensayo se realiza con la finalidad de estudiar la capacidad hidrolítica en un medio que contiene alta concentración de oleuropeína y otros componentes propios de las aceitunas que pueden afectar al metabolismo de las BAL.

Los datos mostrados en la Tabla 42 indican el porcentaje de oleuropeína hidrolizada por las bacterias lácticas seleccionadas como las más efectivas. A diferencia

de lo que ocurre cuando la oleuropeína empleada es comercial, la hidrólisis en las salmueras es inferior al 31 %. A los 10 días de la inoculación no se detecta desarrollo microbiano en ninguna de las salmueras, el recuento de UFC/mL disminuye por debajo del límite de detección. De nuevo, la cepa BAL 94 es la menos efectiva frente a la hidrólisis de la oleuropeína. Sin embargo, el resto de cepas tienen una capacidad de hidrólisis similar, en torno al 20-30 %.

**Tabla 42.** Porcentaje de oleuropeína hidrolizada después de 10 días por cepas de BAL en salmueras de aceitunas sometidas a un tratamiento térmico previo a su colocación en salmuera (80 °C/5 minutos).

Muestra	Oleuropeína (mM)	Oleuropeína hidrolizada (%)
Control sin inocular	11,36 (0,45)*	0,00 (0,00)
BAL 64	7,93 (0,09)	30,20 (1,13)
BAL 94	9,88 (0,39)	13,05 (4,88)
BAL 80	8,13 (0,23)	28,40 (2,83)
BAL 46	8,19 (0,10)	27,91 (1,26)
CECT 748	9,01 (0,19)	20,69 (2,37)

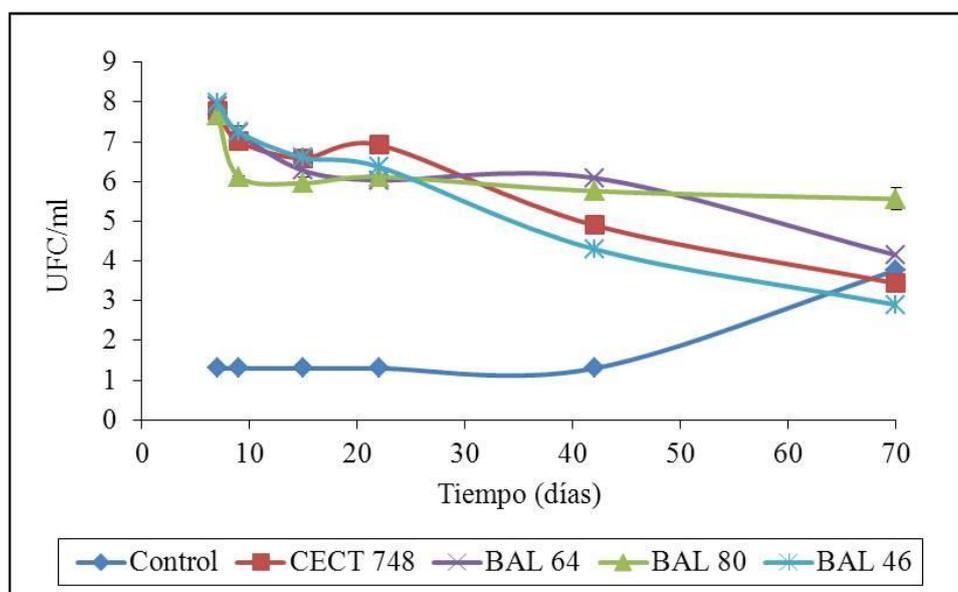
\* Desviación estándar de duplicados

La capacidad hidrolítica de las BAL en salmuera es inferior que en el medio mínimo. En las salmueras utilizadas al ser asépticas no se han consumido los azúcares, por lo que las BAL prefieren ésta fuente directa de nutrientes en vez de la glucosa presente en la oleuropeína. Además, la mayor concentración de oleuropeína presente en las salmueras con respecto al medio mínimo puede disminuir la capacidad hidrolítica de las bacterias, aunque Medina y cols. (2007) afirmaron que concentraciones de 5,8 mM de oleuropeína no impiden el desarrollo de *Lactobacillus pentosus* y *plantarum*, aunque no se conoce si concentraciones mayores ejercen un efecto contrario.

#### 4.3.2.2.2. Efecto de las cepas de BAL sobre la concentración de oleuropeína en aceitunas verdes naturales en salmuera a escala piloto

Se inoculan fermentadores que contienen aceitunas previamente calentadas a 60 °C durante 15 minutos con las cepas que mostraban mayor capacidad para hidrolizar la oleuropeína. La evolución de las BAL en los distintos fermentadores durante el período de almacenamiento se representa en la Figura 65.

**Figura 65.** Evolución de las bacterias lácticas inoculadas (UFC/mL) en fermentadores de aceitunas Manzanillas sometidas a un tratamiento térmico de 60 °C/15 minutos antes de su colocación en salmuera. Las barras de error indican la desviación estándar de duplicados.

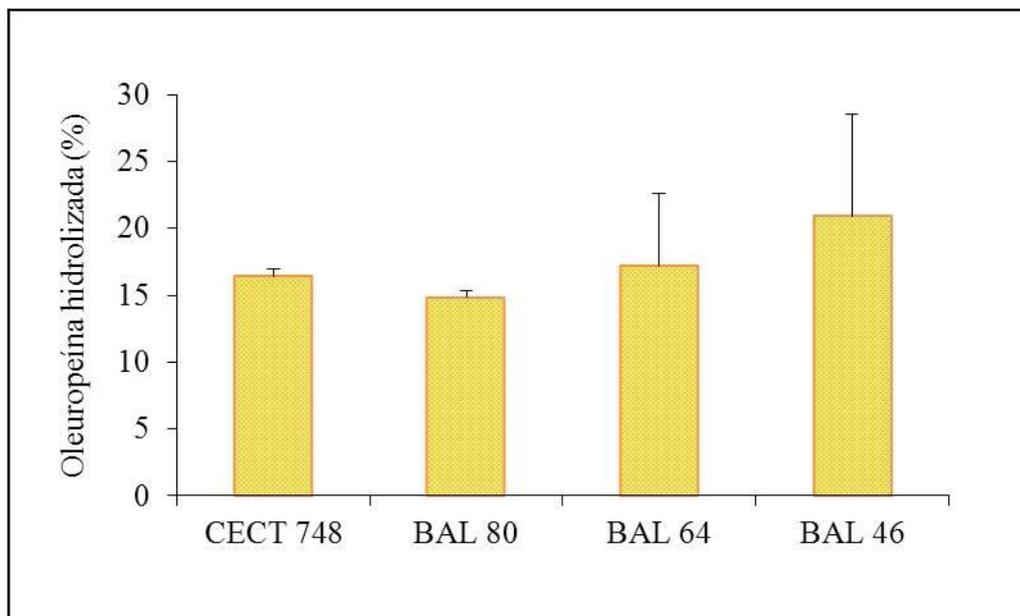


En el fermentador control (aceitunas calentadas sin inocular) no se detecta desarrollo de bacterias hasta los 43 días de almacenamiento. A partir de entonces, se observa crecimiento debido a una fermentación espontánea por bacterias del ambiente. En los fermentadores inoculados, el inóculo inicial es elevado (alrededor del  $10^8$  UFC/mL) y se mantiene constante durante los 40 primeros días a partir de los cuales se produce una disminución, excepto para el inoculado con la BAL 80. La falta de nutrientes, entre los que se encuentran los azúcares, podría ser un motivo por el que se produzca esta disminución. Sin embargo, los resultados obtenidos de la cuantificación

de azúcares en salmuera indican que su concentración aumenta durante el almacenamiento. Otra razón para este hecho son las bajas temperaturas del invierno que se alcanzaron en la planta piloto y por consiguiente la ralentización en el crecimiento de las bacterias lácticas.

La cepa BAL 80 es la más resistente a las bajas temperaturas ya que su número de células permanece constante durante todo el proceso fermentativo. Sorprendentemente los fermentadores inoculados con esta cepa son los que menor porcentaje de oleuropeína han hidrolizado tanto en la pulpa de las aceitunas como en la salmuera después de 6 meses (Figura 66). De otra parte, hay que indicar que las cepas seleccionadas que se inoculan en los fermentadores hidrolizan la oleuropeína sólo entre el 15-20 % aproximadamente respecto al fruto tratado térmicamente pero no inoculado.

**Figura 66.** Oleuropeína hidrolizada (%) después de 6 meses en fermentadores de aceitunas Manzanillas calentadas a 60 °C/15 minutos antes de su colocación en salmuera e inoculadas con BAL seleccionadas. El porcentaje se obtiene de los balances de masa de la pulpa y la salmuera de los fermentadores. Las barras indican el error estándar de duplicados.



Con respecto a los parámetros fisicoquímicos (Tabla 43) podemos observar que todas las aceitunas tratadas térmicamente han fermentado lácticamente,

independientemente de haber sido inoculadas o no. Para todas ellas los valores de pH son bajos, alrededor del 3,4, y tienen una acidez libre del 1,5 %, excepto para las aceitunas control en salmuera cuyo valor de pH es más elevado y la acidez libre inferior. Los parámetros de color para las aceitunas que han sido calentadas presentan valores similares entre sí y característicos de aceitunas fermentadas como verdes estilo español. Por el contrario, las aceitunas control en salmuera tienen un color más oscuro, ya que la fermentación no ha tenido lugar. En lo referente a la textura, no se observan grandes diferencias para las aceitunas de los distintos fermentadores, todas las aceitunas presentan una buena textura.

**Tabla 43.** Parámetros fisicoquímicos de aceitunas después de 6 meses de conservación en salmuera. Las aceitunas fueron colocadas directamente en salmuera sin inocular o bien tratadas térmicamente y luego colocadas en salmuera sin inocular e inoculadas con cepas de BAL. (TTSI: Tratado térmicamente sin inocular; TTI: Tratado térmicamente inoculado).

	NaCl (%)	pH	Acidez libre (% ácido láctico)	Textura (kN/100 g fruto deshuesado)	L	a*	b*
Control en salmuera	6,2 (0,1)*	4,4 (0,1)	0,4 (0,1)	6,6 (0,5) <i>a</i>	47,9 (0,1) <i>a</i>	7,3 (0,1) <i>a</i>	29,8 (0,9) <i>a</i>
Control TTSI	7,9 (0,0)	3,3 (0,2)	1,6 (0,0)	6,3 (0,3) <i>a</i>	54,5 (0,9) <i>b</i>	1,9 (0,1) <i>b</i>	39,6 (1,1) <i>b</i>
TTI (CECT 748)	6,5 (0,8)	3,4 (0,0)	1,5 (0,1)	6,5 (0,4) <i>a</i>	56,5 (0,5) <i>c</i>	1,9 (0,1) <i>b</i>	39,5 (0,4) <i>b</i>
TTI (BAL 80)	7,1 (0,0)	3,5 (0,1)	1,5 (0,1)	6,7 (0,5) <i>a</i>	56,7 (0,1) <i>c</i>	1,7 (0,3) <i>b</i>	39,7 (0,6) <i>b</i>
TTI (BAL 64)	7,0 (0,1)	3,4 (0,2)	1,5 (0,0)	6,2 (0,7) <i>a</i>	56,1 (0,2) <i>c</i>	1,8 (0,0) <i>b</i>	39,3 (1,1) <i>b</i>
TTI (BAL 46)	7,1 (0,1)	3,4 (0,1)	1,5 (0,1)	6,5 (0,5) <i>a</i>	55,8 (1,0) <i>c, b</i>	1,8 (0,2) <i>b</i>	38,9 (0,8) <i>b</i>

\*Desviación estándar de duplicados

Por otra parte, las aceitunas una vez fermentadas, se deshuesaron y lavaron 2 veces con agua durante 24 horas antes de envasarlas con una salmuera nueva (8,5 % en NaCl y 1 % en ácido acético) durante un mes. Transcurrido este tiempo y considerando que se había alcanzado el equilibrio de la composición química entre los frutos y la salmuera, se hizo una cata del producto final por expertos en aceitunas de mesa. La conclusión fue que los frutos seguían estando muy amargos, no siendo similares a las aceitunas verdes estilo español.

Con todos los resultados obtenidos, se observa que aunque las cepas seleccionadas de bacterias lácticas tengan capacidad para hidrolizar la molécula de oleuropeína *in vitro*, es insuficiente para eliminar todo el amargor que poseen las aceitunas. El producto obtenido, a pesar de fermentar lácticamente y poseer un color y una textura adecuada, es un producto no aceptable por el consumidor debido a la elevada concentración en oleuropeína que posee el producto final.

Los experimentos de inoculación realizados hasta ahora se han llevado a cabo fundamentalmente con la variedad Manzanilla. Esta variedad posee una elevada concentración de oleuropeína, además de ser la variedad más empleada para la elaboración de aceitunas de mesa al estilo español. No obstante, sería interesante la aplicación de este nuevo proceso de elaboración en variedades de aceitunas más habituales como verdes en salmuera, que son más dulces, y contienen menos concentración de oleuropeína, como por ejemplo la Aloreña y la Gordal.

En la Tabla 44, se puede ver, como en ocasiones anteriores, que las aceitunas sometidas al tratamiento térmico (60 °C/15 minutos) fermentan lácticamente viéndose reflejado en la disminución de los valores de pH y el aumento de acidez libre. El color de las aceitunas en salmuera sin tratar de las variedades Manzanilla, Hojiblanca y Aloreña es más oscuro que las tratadas térmicamente, y similar para las aceitunas en salmuera de la variedad Gordal. Estas últimas tienen un color, valores de pH y acidez libre similares a las inoculadas debido a que han fermentado de forma espontánea.

Por otra parte, el tratamiento térmico provocará un aumento en la concentración de oleuropeína, sobre todo para la variedad Manzanilla, no siendo tan acusado para las variedades Hojiblanca y Gordal, y prácticamente inexistente para la variedad Aloreña aunque no se disponen de los datos referentes a la concentración en la pulpa. Sin embargo, cuando las aceitunas se deshuesan y se lavan, el poco amargor residual que queda en las aceitunas de la variedad Manzanilla no resulta desagradable para los panelistas, no quedando amargor ni en las Gordales ni en las Aloreñas. El mayor defecto observado fue la baja textura en estas últimas aunque incluso el control tenía una baja textura, lo cual es indicativo de que los frutos estaban maduros, y esto también explicaría que el tratamiento térmico les afectara con mayor intensidad.

**Tabla 44.** Parámetros fisicoquímicos y concentración de oleuropeína (mM) en distintas variedades de aceitunas conservadas durante 6 meses en salmuera. Las aceitunas fueron colocadas directamente en salmuera sin inocular o tratadas térmicamente (60 °C/15 min) previo a su colocación en salmuera y posterior inoculación con la BAL 80. (TT: con tratamiento térmico; NA: no analizado)

	NaCl (%)	pH	Acidez libre (% Ácido láctico)	Oleuropeína en salmuera (mM)	Oleuropeína en pulpa (mM)	Textura (kN/100 g fruto deshuesado)	Color		
							<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
Manzanilla en salmuera no inoculada	6,2 (0,1)*	4,3 (0,1)	0,6 (0,1)	3,28 (1,01)	4,64 (0,73)	6,4 (0,7) <i>a</i>	49,5 (0,5) <i>a</i>	7,5 (0,7) <i>a</i>	35,0 (0,8) <i>a</i>
Manzanilla TT inoculada	8,6 (0,1)	3,4 (0,2)	1,7 (0,2)	11,35 (0,32)	15,28 (0,37)	4,9 (0,8) <i>b</i>	58,1 (0,9) <i>b</i>	2,1 (0,1) <i>b</i>	44,3 (0,3) <i>b</i>
Hojiblanca en salmuera no inoculada	5,1 (0,0)	4,3 (0,0)	0,5 (0,0)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,6 (0,6) <i>a</i>	49,4 (0,5) <i>a</i>	3,6 (0,7) <i>a</i>	31,7 (0,6) <i>a</i>
Hojiblanca TT inoculada	6,2 (0,6)	3,5 (0,1)	1,3 (0,1)	4,44 (0,17)	6,18 (0,05)	6,4 (0,4) <i>b</i>	50,7 (1,0) <i>a</i>	2,1 (0,1) <i>a</i>	36,0 (0,7) <i>b</i>
Gordal en salmuera no inoculada	5,7 (0,1)	3,5 (0,2)	1,1 (0,1)	0,00 (0,00)	0,10 (0,02)	4,4 (0,7) <i>a</i>	54,8 (1,4) <i>a</i>	6,8 (0,3) <i>a</i>	41,2 (1,3) <i>a</i>
Gordal TT inoculada	5,6 (0,0)	3,5 (0,1)	1,2 (0,2)	0,75 (0,01)	2,86 (0,01)	2,1 (0,3) <i>b</i>	53,6 (1,2) <i>a</i>	3,9 (0,2) <i>b</i>	43,3 (2,2) <i>a</i>
Aloreña en salmuera no inoculada	6,0 (0,0)	4,1 (0,0)	0,8 (0,0)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,6 (0,8) <i>a</i>	57,0 (0,8) <i>a</i>	9,4 (0,0) <i>a</i>	36,0 (2,1) <i>a</i>
Aloreña TT inoculada	6,3 (0,0)	3,6 (0,2)	1,4 (0,1)	0,21 (0,10)	NA	2,3 (0,2) <i>b</i>	62,3 (0,5) <i>b</i>	2,0 (0,0) <i>b</i>	39,5 (0,7) <i>a</i>

\* Desviación estándar de duplicados

Los resultados indican que hay que seguir profundizando en la selección de cepas de bacterias lácticas con mayor capacidad para hidrolizar la oleuropeína, insuficiente para las altas concentraciones encontradas para la variedad Manzanilla. Sin embargo, se han obtenido resultados favorables para otras variedades tales como la Hojiblanca, Gordal y Aloreña, que poseen menor contenido. El amargor residual presente en los frutos tras el proceso de conservación se puede eliminar en las etapas posteriores de procesado (lavado, deshuesado, envasado, etc). Además, el problema de la menor textura que presentan algunas variedades como la Gordal y Aloreña puede solventarse empleando partidas de aceitunas menos maduras y/o con la adición de calcio a las salmueras de conservación. El producto obtenido posee un color más atractivo, similar al que poseen las aceitunas elaboradas al estilo español, y diferente al de las aceitunas verdes en salmuera, lo que también sería un aspecto positivo a tener en cuenta con respecto a la mayor aceptabilidad que tendrían estas nuevas aceitunas por los consumidores.



## **5. Conclusiones**

---



1. Los compuestos fenólicos identificados en las aceitunas sin procesar de las variedades Gordal, Manzanilla y Hojiblanca son similares cualitativamente aunque no cuantitativamente, siendo su concentración más elevada para la variedad Manzanilla, seguida de la variedad Hojiblanca y menor en la variedad Gordal.
2. Las variedades Manzanilla y Gordal son las que presentan mayor actividad PPO y  $\beta$ -glucosidasa. Además, la variedad Manzanilla es la que presenta mayor actividad POD, mientras que la variedad Gordal es la que posee mayor actividad esterasa.
3. Existe una elevada variabilidad en la composición fenólica, así como en la actividad oxidasa e hidrolasa, entre muestras de una misma variedad con igual madurez y entre campañas agrícolas.
4. La oxidación enzimática de la oleuropeína, catalizada por PPO, origina el oscurecimiento que aparece en las aceitunas cuando son golpeadas durante la recolección. Estas manchas oscuras pueden ser evitadas al emplear recubrimientos comerciales y un posterior almacenamiento de los frutos bajo atmósfera de nitrógeno.
5. El oscurecimiento superficial de las aceitunas verdes naturales en salmuera se debe a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos y no a su composición en pigmentos cloroplásticos.
- 6 La oxidación enzimática de la oleuropeína por la acción de la PPO endógena es la responsable de la pérdida de amargor durante la elaboración de aceitunas deshidratadas con sal.
7. La aplicación de sobrepresiones con oxígeno en aceitunas naturales que llevan 1 mes en salmuera permite la oxidación enzimática de la oleuropeína, dando lugar a un nuevo producto no amargo, ligeramente oscuro y sabor aceptable.
8. El endulzamiento de aceitunas verdes naturales en salmuera se produce por la hidrólisis enzimática ejercida por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa y la esterasa endógenas durante los primeros meses y, posteriormente, por la hidrólisis química de la oleuropeína. Estas reacciones están muy influenciadas por las condiciones químicas del medio y la temperatura de conservación.

9. La inactivación térmica de la  $\beta$ -glucosidasa endógena evita la formación de inhibidores del crecimiento de BAL, lo cual permite desarrollar un nuevo producto con color y textura similar a las aceitunas verdes estilo español, aunque sin tratamiento con NaOH. Sin embargo, no se han encontrado cepas de estos microorganismos capaces de hidrolizar la oleuropeína en cantidad suficiente para reducir totalmente el amargor del producto final.



## **6. Bibliografía**

---



Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA). 2015. Datos producción nacional de aceitunas de mesa.

Alkan, D., Tokatli, F. y Ozen, B. 2012. Phenolic characterization and geographical classification of commercial extra virgin olive oils produced in Turkey. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 261-268.

Amiot, M. J., Fleuriet, A. y Macheix, J. J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 823-826.

Amiot, M. J., Fleuriet, A. y Macheix J. J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Fleuriet, A. y Macheix, J. J. 1990. The technological debittering process of olives: characterization of fruits before and during alkaline treatment. *Sciences des Aliments*, 10, 619-631.

Antolovich, M., Bedgood, D., Bishop, A. G., Jardine, D., Prenzler, P. D. y Robards, K. 2004. LC-MS investigation to oxidation products of phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 962-971.

Arroyo López, F. N., Romero, C., Durán Quintana, M. C., López López, A., García García, P. y Garrido Fernández, A. 2005. Kinetic study of the physicochemical and microbiological changes in "Seasoned" olives during the shelf-life period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5285-5292.

Arslan, O., Erzençin, M., Sinan, S. y Ozensoy, O. 2004. Purification of mulberry (*Morus alba L.*) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetics and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88, 479-484.

Arslan, D. 2012. Physico-chemical characteristics of olive fruits of Turkish varieties from the province of Hatay. *Grasas y Aceites*, 63, 158-166.

Arslan, D., Karabekir, Y. y Schreiner, M. 2013. Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, 54, 1897-1906.

Ayaz, F., Demir, O., Torun, H., Kolcoglu, A. y Colak, A. 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic content in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106, 291-298.

Aydin, N. y Kadioglu, A. 2001. Changes in the chemical composition. Polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 27, 85-92.

Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Research International*, 50, 401-408.

Bastoni, L., Biando, A., Piccioni F. y Uccella, N. 2001. Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 73, 145-151.

Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A. y Arroyo-López, F. N. 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 89-96.

Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S. y Boukhriss, M. 2009. Saline water irrigation effects on fruit development, quality and phenolic composition of virgin olive oils, Cv. Chemlali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2803-2811.

Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L. y Sánchez-Gimeno, A. C. 2013. Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2207-2220.

Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. y Mayer, A. M. 1997a. Catechol oxidase from green olives properties and partial purification. *Phytochemistry*, 16, 1153-1158.

Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. y Mayer, A. M. 1977b. Olive catechol oxidase. Changes during fruit development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 545-550.

Ben-Shalom, N. Harel, E. y Mayer, A. 1978. Enzymatic browning in green olives and its prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 398-402.

Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Food safety issues WHO/FSF/FOS/98.2*. Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva.

Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M. y Boskou, D. G. 2002. Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3688-3692.

Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A. Mita, G., Tasioula-Margari, M. y Logrieco A. F. 2015. Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology*, 46, 368-382.

BOE, Boletín Oficial del Estado. 2001. Real Decreto 1230/2001 de 8 de Noviembre. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa.

BOE, Boletín Oficial del Estado. 2013. Real Decreto 176/2013 de 8 de Marzo, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios.

Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E. Z. y Arroyo-López, F. N. 2015. Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.

- Bouaziz, M., Chamkha, M. y Sayadi, S. 2004. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5476-5481.
- Bouaziz, M., Jemai, H., Khaboub, W. y Sayadia, S. 2010. Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 90, 1750-1758.
- Bourquelot, E. y Vintilesco, J. 1908. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retiré de l'olivier (*Olea europea* L.). *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., París*, 147, 533-535.
- Bowers, E. M., Ragland, L. O. y Byers L. D. 2007. Salt effects on  $\beta$ -glucosidase: pH-profile narrowing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, 1500-1507.
- Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 1988. Regeneration of Spanish style green table olive brines by ultrafiltration. *Journal of Food Science*, 53, 1733-1736.
- Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 1992. Phenolic compounds related to the black color formation during the processing of ripe olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1192-1196.
- Brenes, M., García, P., Durán, M. C. y Garrido, A. 1993a. Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives. *Journal of Food Science*, 58, 347-350.
- Brenes, M., García, P., Romero, C. y Garrido, A. 1993b. Estudio de los factores que afectan a la velocidad de neutralización de la pulpa durante la elaboración de aceitunas tipo negras. *Grasas y Aceites*, 44, 190-194.
- Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 1994. Influence of salts and pH on the firmness of olives in acid conditions. *Journal of Food Quality*, 17, 335-346.

Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, A. H. y Garrido, A. 1995a. Biochemical changes in phenolics compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2702-2706.

Brenes, M., Romero, C., García, P. y Garrido, A. 1995b. Effect of pH on the colour formed by Fe-phenolic complexes in ripe olives. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 67, 35-41.

Brenes, M. y de Castro, A. 1998. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 353-358.

Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J. J. y Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3535-3540.

Brenes, M., Medina, E., García, A., Romero, C. y de Castro, A. 2010. Olives and olive oil compounds active against pathogenic microorganisms. En "Olives and Olive Oil and Health Disease Prevention". Editorial Preedy and Watson. Academic Press. Capítulo 109, 1013-1019.

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F. y Nucci, R. 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162, 791-798.

Brod, F. C. A., Vernal, J., Bertoldo, J. B., Terenzi, H. y Arisi, A. C. M. 2010. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Molecular Biotechnology*, 44, 242-249.

Burns, J. K., Ferguson, L., Glozer, K., Krueger, W. H. y Rosecrance, R. C. 2008. Screening fruit loosening agents for black ripe processed table olives. *HortScience*, 43, 1449-1453.

- Capasso, R., Evidente, A., Visca, A., Gianfreda, L., Maremonti, M. y Greco, G. 1997. Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea europea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 61, 365-377.
- Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da Silva, J. A., Silva, A. M. S., Renard, C. M. G. C. y Coimbra, M. A. 2006. Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace. *Journal of the Science and Agriculture*, 86, 1495-1502.
- Cardoso, S. M., Mafra, I., Reis, A., Georget, D. M. R., Smith, A. C., Waldron, K. W. y Coimbra, M. A. 2008. Effect of dry-salt processing on the textural properties and cell wall polysaccharides of cv. Thassos black olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2079-2086.
- Caruso, G., Guccia, R., Urbanib, S., Esposto, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Selvaggini, R. y Servili, M. 2014. Effect of different irrigation volumes during fruit development on quality of virgin olive oil of cv. Frantoio. *Agricultural Water Management*, 134, 94-103.
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Rovere, P. y Amati, A. 1997. Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. *Food Chemistry*, 60, 647-649.
- Castro-García, S., Castillo-Ruiz, F. J., Jiménez-Jiménez, F., Gil-Robles, J. A. y Blanco-Roldán, G. L. 2015. Suitability of Spanish “Manzanilla” table olive orchards for trunk shaker harvesting. *Biosystems Engineering*, 129, 388-395.
- Cecchi, L., Migliorini, M., Cherubini, C., Giusti, M., Zanoni, B., Innocenti, M. y Mulinacci, N. 2013. Phenolic profiles, oil amount and sugar content during olive ripening of three typical Tuscan cultivars to detect the best harvesting time for oil production. *Food Research International*, 54, 1876-1884.

Certel, M., Uslu, M. K. y Ozdemir, F. 2004. Effects of sodium caseinate-and milk concentrate-based edible coatings on the postharvest quality of Bing cherries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1229-1234.

Cevik, S., Ozkan, G., Kiralan, M. y Bayrak, A. 2014. Effect of harvest time on physicochemical quality parameters, oxidation stability, and volatile compounds of extra virgin olive oil. *Acta Alimentaria*, 43, 526-537.

Chang, S., Tan, C., Frankel, E. N. y Barrett, D. M. 2000. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 147-151.

Char, C., Silveira, A. C., Inestroza-Lizardo, C., Hinojosa, A., Machuca, A. y Escalona, V. H. 2012. Effect of noble gas-enriched atmospheres on the overall quality of readytoeat arugula salads. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 50-55.

Chauhan, O. P., Raju, P. S., Singh, A. y Bawa, A. S. 2011. Shellac and aloe-gel-based surface coatings for maintaining keeping quality of apple slices. *Food Chemistry*, 126, 961-966.

Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4142-4147.

Cimato, A., Sani, G., Mattei, A. y Osti, M. 1990. Cultivars and environment as regulating factors in polyphenol and tocopherol contents of the tuscan oil. *Acta Horticulturae*, 286, 457-460.

Civello, P. M., Martínez, G. A., Chaves. A. R. y Añón, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa Duch.*): partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596-2601.

CODEX. 2013. Normativas del CODEX para las aceitunas de Mesa- CODEX STAN. 66-1981.

Columela, L. J. M. De Re Rustica. 42. Trad. Por Juan M<sup>a</sup> Álvarez de Sotomayor. 1979. Editado por Sociedad Nestlé, A. E. P. A. Santander.

Concellon, A., Anon, M. y Chaves, A. 2004. Characterization and changes in polyphenoloxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. Food Chemistry, 88, 17-24.

Consejo Oleícola Internacional (COI), 2004. Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa. Datos de Producción, exportación y consumo de aceitunas de mesa. Madrid.

Coxam, V., Puela, C. y Daviccoa. M. J. 2010. Olives and olive oil in the prevention of osteoporosis. En "Olives and olive oil in health and disease prevention". Editorial Preedy and Watson. Capítulo 131, 1195-1203.

Criado, M. N., Morelló, J. R., Motilva, M. J. y Romero, M. P. 2004. Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81, 633-640.

Da Cruz Vieira, I. y Fatibello-Filho, O. 1998. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. Analyst, 123, 1809-1812.

Damtoft, S., Franzyk, H. y Rosendal Jensen, S. 1993. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Oleaceae*. Phytochemistry, 34, 1291-1299.

Damtoft, S., Franzyk, H. y Jensen, S. R. 1995. Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Secoiridoid precursors. Phytochemistry, 40, 773-784.

- De Castro, A., García, P., Romero, C., Brenes, M. y Garrido, A. 2007. Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. *Journal of Food Engineering*, 80, 1206-1212.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Cuomo, F. y López, F. 2015. Evidence of oleuropeína degradation by olive leaf protein extract. *Food Chemistry*, 175, 568-574.
- De Stefano, G. y Sciancalepore, V. 1993. Polyphenol oxidase and peroxidase in five olives varieties. *Industrie Alimentari*, 32, 731-733.
- Değirmencioğlu, N. 2011. Influence of temperature and modified atmosphere on the microbial profile of packed Gemlik drysalted olives. *Journal of Food Safety*, 31, 115-124.
- Değirmencioğlu, N., Gürbüz, P., Değirmenciğlu, A., Şahan, Y. y Özbey, H. 2011. Effect of MAP and vacuum sealing on sensory qualities of dry-salted olive. *Food Science and Biotechnology*, 20, 1307-1313.
- Divakar, S. 2013. *Enzymatic Transformation*. Capítulo 2: Glycosidases, 5-17.
- Doğan, S., Turan, P. y Dogan, M. 2006. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Process Biochemistry*, 41, 2379-2385.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Alkan, M. y Arslan, O. 2008. Inhibition kinetic and mechanism of polyphenol oxidase from various sources by diethyldithiocarbamic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1316-1322.
- Drusas, A., Vagenas, G. K. y Saravacos, G. D. 1988. Diffusion of sodium chloride in green olives. *Journal of Food Engineering*, 7, 211-222.
- Du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. y Krieger-Weber, S. 2011. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures an overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 876-906.

Dufour, J.P., Malcorps, P. H. y Silcock, P. 2003. Control of ester synthesis during brewery fermentation. En “Brewing Yeast Fermentation Performance”. Part 5 “The Role of Brewing Yeast in Beer Flavour Development”. Editado por Katherine Smart, Oxford Brookes University, Oxford, UK, Blackwell Science. Capítulo 21, 213-233.

Ebrahimzadeh, H., Motamed, N., Rastgar-Jazii, F., Montasser-Kouhsari, S. y Shorkaii, E. H. 2003. Oxidative enzyme activities and soluble protein content in leaves and fruits of olives during ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 181-196.

Erel, R., Kerem, Z., Ben-Gatt, A., Dag, A., Schwartz, A., Zipori, I., Basheer, L. y Yermiyahu, U. 2013. Olive (*Olea europaea* L.) Tree nitrogen status is a key factor for olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11261-11272.

Esem, A. 2003.  $\beta$ -Glucosidase. En *Handbook of Food Enzymology*. Capítulo: Hydrolases. Whitaker, J., Vorage, A. y Wong, D. Editorial Dekker, New York, 791-803.

Espin, J., Tudela, J. y García F. 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (*Cynara scolymus* L.). *Lebensmittel Wissenschaft Technology*. 30, 819-825.

Espinal Ruiz, M. 2010. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba palmira Ica I (*Psidium guajava*). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.

Esti, M., Cinquanta, L. y La Notte, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 32-35.

Fenster, K. M., Rankin, S. A. y Steele, J. L. 2003. Accumulation of short n-chain ethyl esters by esterases of lactic acid bacteria under conditions simulating ripening Parmesan cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2818-2825.

Ferguson, L. 2006. Trends in olive harvesting. *Grasas y Aceites*, 57, 9-15.

Ferguson, L., Rosa, U. A., Castro-García, S., Lee, S. M., Guinard, J. X., Burns, J., Krueger, W. H., O'Connell, N. V. O. y Glozer, K. 2010. Mechanical harvesting of California table and olive oils. *Advances in Horticultural Science*, 24, 53-63.

Fernández, M. J. y González, F. 1956. Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. II. Grasas y Aceites, 7, 185-189.

Fernández, M. J., Castro, R., Garrido, A., González, F., González Cancho, F., Nosti, M., Heredia, A., Mínguez, M. I., Rejano, L., Durán, M. C., Sánchez, F., García, P. y de Castro, A. 1985. *Bioteología de la aceituna de mesa*. Instituto de la Grasa y sus derivados, Sevilla.

Fleming, H. P., Walter, W. M. y Etchells, J. L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology*, 26, 777-782.

Franck, C., Lammertyn, J., Ho, Q., Verboven, P., Verlinden, B. y Nicolai, B. 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 1-13.

Frankel, E. N. 2011. Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 785-792.

Gandul-Rojas, B., Roca, M. y Gallardo-Guerrero, L. 2012. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant). *LWT Food Science and Technology*, 46, 311-318.

García, P., Brenes, M. y Garrido, A. 1991. Effect of oxygen and temperature on the oxidation rate during darkening step of ripe olive processing. *Journal of Food Engineering*, 13, 259-271.

García, P., Brenes, M., Romero, C., y Garrido, A. 1995. Respiration and physicochemical changes in harvested olive fruits. *Journal of Horticultural Science*, 70, 925-933.

García, P., Brenes, M., Romero, C. y Garrido, A. 2001a. Color fixation in ripe olives. Effect of type of iron salt and other processing factors. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81, 1364-1370.

García, A., Brenes, M., Martínez, F., Alba, J., García, P. y Garrido, A. 2001b. High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78, 625-629.

García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C. y Garrido, A. 2003. Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*, 216, 520-525.

García, A., Romero, C., Medina, E., García, P., De Castro, A. y Brenes, M. 2008. Debittering of olives by polyphenol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11862-11867.

García, P., Romero, C. y Brenes, M. 2014. Influence of olive tree irrigation and the preservation system on the fruit characteristics of Hojiblanca black ripe olives. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 403-407.

García-Palazón, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P. y Zabetakis, I. 2004. The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria  $\times$  ananassa*). *Food Chemistry*, 88, 7-10.

García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A. y Pérez, A. G. 2011. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 44, 629-635.

García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C. y Pérez, A. G. 2015. Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 171, 364-369.

Garrido Fernández, A., Fernández-Díez, M. y Adams, M. R. 1997. Table olives: production and processing. Editorial Chapman and Hall, London.

Gençer, N., Sinan, S. y Arslan, O. 2012. Kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various olives (*Olea europaea* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 24, 2159-2161.

Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaouid, M. y Asehraoua, A. 2011. Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites*, 62, 84-89.

Gikas, E., Papadoulou, N. y Tsaibopoulos, A. 2006. Kinetic study of the acidic hydrolysis of oleuropein, the major bioactive metabolite of olive oil. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29, 497-508.

Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M. y Fregapane, G. 2006. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7130-7136.

Gómez-Rico, A., Fregapane, G. y Salvador, M. D. 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41, 433-440.

Goodwin, D. C. y Hertwig, K. M. 2003. Peroxidase catalyzed oxidation of capsaicinoids: steady state and transient state kinetic studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417, 18-26.

Goupy, P., Fleuriet, A., Amiot, M. J. y Macheix, J. J. 1991. Enzymatic browning, oleuropein content and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 92-95.

Guegen, Y., Chemardin, P., Janbon, G., Arnaud, A. y Galzy, P. 1996. A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2336-2340.

Gutiérrez-Rosales, F., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J. y Mínguez-Mosquera, M. I. 2010. Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12924-12933.

Gutiérrez-Rosales, F., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J. y Mínguez-Mosquera, M. I. 2012.  $\beta$ -glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4348-4358

Hao, J., Shena, W., Yuc, G., Jiaa, H., Lia, X., Fenga, Z., Wangd, Y., Weberd, P., Wertzd, K., Sharmane, E. y Liuf, J. 2010. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 634-644.

Harborne, J. B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. En: *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, California.

Hatibe Ertürk K., Sinan S. y Turán, Y. 2011. Purification of  $\beta$ -glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512.

Hermoso, M., Uceda, M., Frías, L. y Beltrán, G. 2001. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. 4ª edición. Ediciones Mundi-Prensa, Junta de Andalucía. Capítulo 6: Maduración, 153-172.

- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D. y Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110, 428-435.
- Hornero-Méndez, D., Gallardo-Guerrero, L., Jarén-Galán, M. y Mínguez-Mosquera, M. I. 2002. Differences in the activity of superoxide dismutase, polyphenol oxidase and Cu-Zn content in the fruit of Gordal and Manzanilla olive varieties. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 113-120.
- Innocenti, M., la Marca, G., Malvagia, S., Giaccherini, C., Vincieri, F. F. y Mulinacci, N. 2006. Electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 20, 2013-2022.
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K. y Takeda, I. 1971. Biosynthesis of oleuropein-type secoiridoid glucosides by *Oleaceae*. *Tetrahedron Letters*, 43, 4073-4076.
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K. y Takeda, I. 1974. Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XXIII. Biosynthesis of the secoiridoids glucosides, gentiopicroside, morroniside, oleuropein and jasminin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletins*, 22, 676-686.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M. y Nicolas, J. J. 1990. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1437-1441.
- Jemai, H., Bouaziz, M. y Sayadi, S. 2009. Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2961-2968.
- Jiang, Y. y Li, Y. 2001. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73, 139-143.

- Jiménez-Jiménez, F., Castro-García, S., Blanco-Roldán, G. L., Ferguson, L., Rosa, U. y Gil-Ribes, J. A. 2013. Table olive cultivar susceptibility to impact bruising. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 100-106.
- Kailis, S. y Harris, D. 2007. *Producing table olives*. Landlinks Press, Collingwood VIC 3066, Australia.
- Kaltsa, A., Papaliaga, D., Papaioannou, E. y Kotzekidou, P. 2015. Characteristics of oleuropeinolytic strains of *Lactobacillus plantarum* group and influence on phenolic compounds in table olives elaborated under reduced salt conditions. *Food Microbiology*, 48, 58-62.
- Kara, H. E., Sinan, S. y Turan, Y. 2011. Purification of  $\beta$ -glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzymatic. *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512.
- Karioti, A., Chatzopoulou, A., Bilia, A. R., Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. y Skaltsa, H. 2006. Novel secoiroidoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70, 1898-1903.
- Kawamoto, T., Sonomoto, K. y Tanaka, A. 1987. Esterification in organic solvents: selection of hydrolases and effects of reaction conditions. *Biocatalysis*, 1, 137-145.
- Kesen, S., Kelebek, H. y Selli, S. 2014. LC-ESI-MS Characterization of phenolic profiles Turkish olive oils as influenced by geographic origin and harvest year. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 91, 385-394.
- Khoufi, S., Hamza, M. y Sayadi, S. 2011. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technology*, 102, 9050-9058.

Klieber, A., Bagnato, N., Barrett, R. y Sedgley, M., 2002. Effect of post-ripening nitrogen atmosphere storage on banana shelf life, visual appearance and aroma. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 15-24.

Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H. y Nakamura, M. 1999. Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9159-9164.

Kountouri, A. M., Kaliora, A. C., Koumbi, L. y Andrikopoulos, N. K. 2009. In-vitro gastric cancer prevention by a polyphenol-rich extract from olives through induction of apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, 18, 33-39.

Kubo, I. y Matsumoto, A. 1984. Molluscicides from olive *Olea europaea* and their efficient isolation by countercurrent chromatographies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 687-688.

Kumar, V., Kishor, T. y Murugan, K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados Cherry (*Malpighia glabra L.*). *Food Chemistry*, 110, 328-333.

Kumral, A., Korukluoglu, M., Romero, C., de Castro, A., Ruiz-Barba, J. L. y Brenes, M. 2013. Phenolic inhibitors involved in the natural fermentation of Gemlik cultivar black olives *European Food Research and Technology*, 236, 101-107.

Kuwajima, H., Uemura, T., Takaishi, K. y Inoue, H. 1988. A secoiroidoid glucoside from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 27, 1757-1759.

Langdon, T.T. 1987. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technology*, 41, 64-67.

- Lebeda, A., Kirstkova, E. y Dolezal, K. 1999. Peroxidase isozyme polymorphism in cucurbita pepo cultivars with various morphotypes and different level of field resistance to powdery mildew. *Scientia Horticulturae*, 81, 103-112.
- Li, Y-Y., Jiang, C-J., Wan, X-C., Zang, Z-Z. y Li D-X. 2005. Purification and partial characterization of  $\beta$ -Glucosidase from fresh leaves of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37, 363-370.
- Liang, Y. S., Chen, N. L. y Ke, L. S. 2012. Influence of dipping in sodium metabisulfite on pericarp browning of litchi cv Yu Her Pau (Feizixiao). *Postharvest Biology and Technology*, 68, 72-77.
- Loru, D., Incani, A., Deiana, D., Corona, G., Atzeri, A., Melis, M. P., Rosa, A. y Dessi, M. A. 2009. Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicology and Industrial Health*, 15, 301-310.
- Lu, S., Luo, Y. y Feng, H. 2006. Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by sodium chlorite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3693-3696.
- Luaces, P., Romero, C., Gutiérrez, F., Sanz, C. y Pérez, A. G. 2007. Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameter of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2721-2727.
- Lucena-Padrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A. y Ruiz-Barba, J. L. 2014. Microbial diversity and dynamics of Spanish-style Green table olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiology*, 42, 154-165.
- Lurie, S. Fallik, E. Handros, A. y Aspira, R. 1997. The posible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 141-149.

- Machado, M., Felizardo, C., Fernandes-Silva, A. A., Nunes, F. M. y Barros, A. 2013. Polyphenolic compounds, antioxidant activity and L-phenylalanine ammonia-lyase activity during ripening of olive cv. "Cobrançosa" under different irrigation regimes. *Food Research International*, 51, 412-421.
- Maestro, R., León, R., Ruiz, V., Fiestas, P. y Vázquez, A. 1994. Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y Aceites* 45, 332-335.
- Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A. y Pereira, J. A. 2011. Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 450-457.
- Malheiro, R., Mendes, P., Fernandes, F., Rodrigues, N., Bento, A. y Pereira, J. A. 2014. Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food and Function*, 5, 3132-3142.
- Malmiri, H. J., Osman, A., Tang, C. P. y Rahman, R. A. 2012. Effects of edible surface coatings (sodium carboxymethyl cellulose, sodium caseinate and glycerol) on storage quality of berangan banana (*Musa sapientum* cv Berangan) using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 252-261.
- Mantzouridou, F. y Tsimidou, M. Z. 2011. Microbiological quality and biophenol content of hot air-dried Thassos cv. table olives upon storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 786-795.
- Marsilio, V., Lanza, B. y Pozzi, N. 1996. Progress in table olive debittering: degradation *in vitro* of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 593-597.
- Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C. y De Angelis, M. 2000. Oven-dried table olives: textural properties as related to pectic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1271-1276.

- Martinelli, F., Basile, B., Morelli, G., d'Andria, R. y Tonutti, P. 2012. Effects of irrigation on fruit ripening behavior and metabolic changes in olive. *Scientia Horticulturae*, 144, 201-207.
- Martínez, M. V. y Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195-200.
- Martín-Peláez, S., Covas, M. I., Fitó, M., Kušar, A. y Pravst, I. 2013. Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 760-771.
- Mazzei, R., Giorno, L., Piacentini, E., Mazzuca, S. y Drioli, E. 2009. Kinetic study of a biocatalytic membrane reactor containing immobilized  $\beta$ -glucosidase for the hydrolysis of oleuropeína. *Journal of Membrane Science*, 339, 215-223.
- Mazzuca, S., Spadafora, A. y Innocenti, A. M. 2006. Cell and tissue localization of  $\beta$ -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Science*, 171, 726-733.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A. y de Castro, A. 2007. Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 9817-9823.
- Medina, E. 2008. Antimicrobianos polifenólicos y oleosídicos en alimentos derivados de la aceituna. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M. y García, A. 2008. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*, 110, 932-937.
- Medina, E., García, A., Romero, C., de Castro, A. y Brenes, M. 2009. Study of the anti-lactic acid bacteria compounds in table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1286-1291.

- Medina, E., Morales-Sillero, A., Ramírez, E., Rallo, P., Brenes, M. y Romero, C. 2012. New genotypes of table olives: profile of bioactive compounds. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2334-2341.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Garrido-Fernández, J. 1989. Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1-7.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Montañó-Asquerino, A. y Garrido-Fernández, J. 1991. Determination of chlorophylls and carotenoids by high-performance liquid chromatography during olive lactic fermentation. *Journal of Chromatography*, 585, 259-266.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Gandul-Rojas, B. 1994. Mechanism and kinetics of carotenoid degradation during the processing of green table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1551-1554.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Gallardo-Guerrero, L. 1995. Anomalous transformation of chloroplastic pigments in Gordal variety olives during processing for table olives. *Journal of Food Protection*, 58, 1241-1248.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2014.
- Mishra, B. B., Gautam, S. y Sharma, A. 2012. Browning of fresh-cut eggplant: impact of cutting and storage. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 44-51.
- Montañó, A., Rejano, L. y Sánchez, A. H. 1986. Proceso rápido de elaboración de aceitunas verdes aderezadas. *Grasas y Aceites*, 37, 141-147.
- Montañó, A., Sánchez, A. H. y de Castro, A. 2000. Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *Journal Food Science*, 65, 1022-1027.

- Montedoro, G. y Servili, M. 1991. *Chimica e qualità dell' olio di oliva: i fattori che la condizionano*. Libro de abstracts del Congreso “ L' olio di oliva ed il suo futuro”, Spoleto (Italia), 33-55.
- Montedoro, G., Servili, J. M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E. y Macchioni, A. 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2228-2234.
- Montedoro, G. F., Baldioli, M., Selvaggini, R., Begliomini, A. L. y Taticchi, A. 2002. Relationship between phenolic composition of olive fruit and olive oil: the importance of the endogenous enzymes. *Acta Horticulturae*, 586, 551-556.
- Morello, J. R., Romero, M. P. y Motilva, M. J. 2004. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6002-6009.
- Muñoz-Muñoz, J. L., García, -Molina, F., García-Ruíz, P. A., Arribas, E., Tudela, J., García- Cánovas, F. y Rodríguez-López, J. N. 2009. Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols. *Food Chemistry*, 113, 435-444.
- Murata, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S. y Homma, S. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1495-1499.
- Nanos, G. D., Kiritsakis, A. K. y Sfakiotakis, E. M. 2002. Preprocessing storage conditions for green “Conservolea” and “Chondrolia” table olives. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 109-115.
- Njombolwanaa, N.S., Erasmus, A., Van Zyl J. G., Du Plooy W., Cronje P. J. R. y Fouriea P. H. 2013. Effects of citrus wax coating and brush type on imazalil residue loading, green mould control and fruit quality retention of sweet oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 362-371.

Núñez de Castro, I. 2001. Enzimología. Editorial Pirámide.

O'Beirne, D., Murphy, E. y Eidhin, D. N. 2011. Effects of argon enriched low-oxygen atmospheres and of high-oxygen atmospheres on the kinetics of polyphenoloxidase (PPO). *Journal of Food Science*, 76, E73-E77.

O'Brien, P. J. 2000. Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 113-139.

Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M. A. y Peragón, J. 2008. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*, 28, 45-54.

Ortega-García, F. y Peragón, J. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10331-10340.

Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M.A. y Peragón, J. 2010. Polyphenol oxidase and oleuropein in olives and their changes during olive ripening. En "Olives and olive oil in health and disease prevention". Editorial Preedy and Watson. Capítulo 25, 233-238.

Othman, N. B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. y Hamdi, M. 2009. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662-669.

Padiglia, A. Cruciani, E. Pazzaglia, G. Medda, R. y Floris, G. 1995. Purification and characterization of *Opuntia* peroxidase. *Phytochemistry*, 38, 295-297.

Paiva-Martins, F. y Gordon, M. H. 2005. Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food*, 53, 2704-2709.

- Panagou, E. Z., Tassou, C. C. y Katsaboxakis, K. Z. 2002. Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 635-641.
- Panagou, E. Z. 2006. Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 °C. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 322-329.
- Panda, T. y Gowrishankar, B. S. 2005. Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 160-169.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C. R. y Larroche, C. 2008. *Enzyme technology*. Editorial Springer. Parte I: General and Fundamentals, 2, 11-37. Parte II: Industrial Enzymes, 21, 399-433.
- Panizzi, L., Scarpati, M. L. y Oriente, E. G. 1960. Structure of the bitter glucoside oleuropein. Note II. *Gazzetta Chimica Italiana*, 90, 1449-1485.
- Pereira, G. D., Machado, F. L. D., y de Costa, J. M. C. 2013. Quality of ‘‘Delta Valencia’’ orange grown in semiarid climate and stored under refrigeration after coating with wax. *Food Science and Technology*, 33, 276-281.
- Petridis, A., Therios, I. y Samouris, G. 2012. Genotypic variation of total phenol and oleuropein concentration and antioxidant activity of 11 Greek olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Hortscience* 47, 339-342.
- Piscopo, A., De Bruno, A., Zappia, A. y Poiana, M. 2014. Antioxidant activity of dried green olives (Carolea cv.). *LWT-Food Science and Technology*, 58, 49-54.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E. y Valente-Mesquita, V. L. 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24, 361-375.

Ragazzi, E. y Veronese, G. 1973. Indagini sui componente fenolici degli oli di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 50, 443-452.

Ramírez, E., García, P., de Castro, A., Romero, C. y Brenes, M. 2013. Debittering of black dry-salted olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1319-1324.

Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M. y Romero, C. 2014a. Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9569-9575.

Ramírez, E., Romero, C. y Brenes, M. 2014b. Informe final Proyecto Feder Innterconecta: Aprovechamiento y valoración biotecnológica de los subproductos del olivar para su aplicación en el sector de la industria alimentaria y agricultura (ASOAN).

Ramírez, E., Gandul-Rojas, B., Romero, C., Brenes, M. y Gallardo-Guerrero, L. 2015a. Composition of pigments and color changes in green table olives related to processing type. *Food Chemistry*, 166, 115-124.

Ramírez, E., Sánchez, A. H., Romero, C. y Brenes, M. 2015b. Combined use of nitrogen and coatings to improve the quality of mechanically harvested Manzanilla olives. *Food Chemistry*, 171, 50-55.

Ramos-Escudero, F., Morales, M. T. y Asuero, A. G. 2015. Characterization of bioactive compounds from monovarietal virgin olive oils: relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *International Journal of Food Properties*, 18, 348-358.

Ranalli, A., De Mattia, G., Patumi, M. y Proietti, P. 1999. Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas y Aceites*, 50, 249-259.

Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S. y Iannucci, E. 2003. The glyceridic and nonglyceridic constituents of virgin olive oil alter use of a novel method of enzyme extraction. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 17-27.

Ranalli, A., Marchegiani, D., Contento, S., Girardi, F., Nicolosi, M. P. y Brullo, M. D. 2009. Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 678-687.

Ranjitha, P., Karthy, E. S. y Mohankumar, A. 2009. Purification and partial characterization of esterase from marine *Vibrio fischeri*. *Modern Applied Science*, volumen 3, número 6, páginas 73-82.

Reglamento (UE) nº 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Rejano, L. y Garrido, A. 2008. El aderezo de las aceitunas. En “El cultivo del olivo”. Editores: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo. Ediciones Mundiprensa. Junta de Andalucía. Capítulo 19.

Rejano, L., Sánchez, A. H. y Vega, V. 2008. New trends on the alkaline treatment “cocido” of Spanish-style green table olives. *Grasas y Aceites*, 59, 195-202.

Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C. L., Caggia, C. y Spagna, A. 2011. An alkaline  $\beta$ -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Research*, 11, 487-493.

Riou, C., Salmon, J-M., Vallier, M-J., Günata, Z. y Barre, P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose- tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3607-3614.

- Rivera, A. Restrepo y P. Narváez, C. 2004. Polifenoloxidasa y peroxidasa de pulpa de uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Revista Colombiana de Química*, 33, 57-66.
- Rodríguez-Borbolla, J. M., Gómez-Herrera, C., González-Cancho, F., Fernández-Díez, M. J., Gutiérrez-González, R., Izquierdo-Tamayo, A., González-Pellisó, F., Vázquez-Ladrón, R. y Guzmán-García, R. 1956. El aderezo de aceitunas verdes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Rodríguez-Borbolla, J. M. y Rejano, L. 1979. Sobre la preparación de la aceituna al estilo sevillano. La fermentación I. *Grasas y Aceites* 30, 175-185.
- Rojas, V., Gil, J. V., Pinaga, F. y Manzanares, P. 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 283-289.
- Romero, C., Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 1996. Respiration of olives stored in sterile water. *Journal of Horticultural Science*, 71, 739-745.
- Romero, C., Brenes, M., García, P. y Garrido, A. 2002a. Hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3835-3839.
- Romero, C., García, P., Brenes, M., García, A. y Garrido, A. 2002b. Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*, 215, 489-496.
- Romero, M. P., Tovar, M. J., Girona, J. y Motilva, M. J. 2002c. Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5349-5354.

- Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A. y Garrido, A. 2004a. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1973-1979.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A. y Garrido, A. 2004b. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 479-484.
- Romero-Segura, C., Sanz, C. y Pérez, A. G. 2009. Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7983-7988.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C. y Pérez, A. G. 2012. The role of olive  $\beta$ -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 45, 191-196.
- Sánchez, A. H., de Castro, A., Rejano, L. y Montaña, A. 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5975-5980.
- Sánchez, A. H., García, P. y Rejano, L. 2006. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57, 86-94.
- Sánchez, A. H., Romero, C., Ramírez, E. y Brenes, M. 2013. Storage of mechanically harvested Manzanilla olives under controlled atmospheres. *Postharvest Biology and Biotechnology*, 81, 60-65.
- Santos, M. M., Piccirillo, C., Castro, P. M. L., Kalogerakis, N. y Pintado, M. E. 2012. Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2435-2440.

Saraiva, J., Nunes, C. y Coimbra, M. 2007. Purification and characterization of olive (*Olea europea* L.) peroxidase. Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101, 1571-1579.

Saravia, J. A., Cláudia, C. S., Coimbra N. y Coimbra, M. 2010. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidases. En "Olives and Olive Oil and Health Disease Prevention". Editorial Preedy and Watson. Academic Press, 325-332.

Schiedt, H. y Liaaen-Jensen, S., 1995. Isolation and analysis. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, y H. Pfander (Eds.) *Carotenoids: Isolation and analysis*, volume 1A, páginas 81-108. Switzerland: Birkhäuser Verlag.

Schmidt Hebbel, H. y Pennacchiotti Monti, I. 2001. Las enzimas en los alimentos. Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. Editorial Digital. Capítulo 2: Generalidades sobre enzimas; 3: Clasificación de las enzimas.

[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/schmidt02/index.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidt02/index.html)

Sciancalepore, V. y Longone, V. 1984. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 320-321.

Sciancalepore, V. 1985. Enzymatic browning in five olive varieties. *Journal of Food Science*, 50, 1194-1195.

Segovia-Bravo, K. A., Jarén-Galán, M., García-García, P. y Garrido-Fernández, A. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from the Manzanilla cultivar (*Olea europaea pomiformis*) and prevention of browning reactions in bruised olive fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6515-6520.

Segovia-Bravo, K., Jarén-Galán, M., García-García, P. y Garrido-Fernández, A. 2009. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. *Food Chemistry*, 114, 1380-1385.

- Segovia-Bravo, K., García-García, P., López-López, A. y Garrido-Fernández, A. 2011. Effect of bruising on respiration, superficial color, and phenolic changes in fresh Manzanilla olives (*Olea europaea pomiformis*): development of treatments to mitigate browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5456-5464.
- Segovia-Bravo, k. A., García- García, P., López-López, A. y Garrido-Fernández, A. 2012. Effect of inert atmosphere on the postharvest browning of Manzanilla olives and optimization by response surface methodology of the aqueous treatments. *Journal of Food Science*, 77, S194-S201.
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposito, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G. F. y Corsetti, A. 2006. The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. Itrana and Leccino): A pilot-scale application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3869-3875.
- Servili, M., Esposito, S., Lodolini, E., Selvaggini, R., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G.F., Serravalle, M. y Gucci, R. 2007. Irrigation effects on quality, phenolic composition and selected volatiles of virgin olive oil cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6609-6618.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R. y Montedoro, G. 2008. Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10048-10055.
- Shahidi, F. y Naczk, M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.
- Shomer, J., Ben-Shalom, N., Harel, E. y Mayer, A. M. 1979. The intracellular location of catechol oxidase in the olive fruit. *Annals of Botany*, 44, 261-163.

Shoseyov, O., Bravdo, B. A., Ikan, R. y Chet, I. 1990. Immobilized endo- $\beta$ -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1973-1976.

Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Bronze, M., Coelho, A. V. y Villas-Boas, M. 2010. Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 61, 157-164.

Soliva-Fortuni, R., Elez, P., Caldero, M. y Martín, O. 2002. Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado puree preserved by combined methods. *Journal of Food Engineering*, 55, 131-137.

Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J. C., Mayer, A. M. y Harel, E. 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 105, 1301-1331.

Song, L., Gao, H., Chen, H., Mao, J., Zhou, Y., Chen, W. y Jiang, Y. 2009. Effects of short term anoxic treatment on antioxidant ability and membrane integrity of postharvest kiwifruit during storage. *Food Chemistry*, 114, 1216-1221.

Soufi, O., Romero, C. y Hayette, L. 2014. Ortho-diphenol profile and antioxidant activity of Algerian black olive cultivars: Effect of dry salting process. *Food Chemistry*, 157, 504-510.

Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A. y Pereira, J. A. 2014. Antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrancosa olives affected through the maturation process. *Journal of Functional Foods*, 11, 20-29.

Spadafora, A., Mazzuca, S., Chiappetta, F. F., Parise, A., Perri, E. y Innocenti, A. M. 2008. Oleuropein-specific- $\beta$ -glucosidase activity marks the early response of olive fruits (*Olea europaea*) to mimed insect attack. *Agricultural Sciences in China*, 7, 703-712.

Stefanouadaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K. y Harwood, J. 2009. Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7048-7055.

Supapvanich, S., Prathaan, P. y Tepsorn, R. 2012. Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract *Postharvest Biology and Technology*, 73, 46-49.

Tassou, C. C., Panagou, E. Z. y Katsaboxakis, K. Z. 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19, 605-615.

Tassou, C. C., Katsaboxakis, C. Z., Georget, D. M. R., Parket, M. L., Waldron, K. W., Smith, A. C. y Panagou, E. Z. 2007. Effect of calcium chloride on mechanical properties and microbial characteristic of cv. Conservolea naturally black olives fermented at different sodium chloride levels. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 87, 1123-1131.

Taticchi, A., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R. y Servili, M. 2013. The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 136, 975-983.

Tekaya, M., Mechri, B., Bchir, A., Attia, F., Cheheb, H., Daassa, M. y Hammami, A. 2013. Effect of nutrient-based fertilisers of olive trees on olive oil quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2045-2052.

Tekaya, M., Mechri, B., Cheheb, H., Attia, F., Chraief, I., Ayachi, M., Boujneh, D. y Hammami, M. 2014. Changes in the profiles of mineral elements, phenols, tocopherols and soluble carbohydrates of olive fruit following foliar nutrient fertilization. *Food Science and Technology*, 59, 1047-1053.

- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G. y Corsetti, A. 2013. Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 203-208.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Ciarrocchi, A., Fasoli, G., Suzzi, G. y Corsetti, A. 2014. *Lactobacillus pentosus* dominates spontaneous fermentation of Italian table olives. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 710-717.
- Torres, R. Valentines, M. Usall, J. Viñas, I. y Larriguadiere, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanism in Golden Delicious apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 235-242.
- Torriani, S, Zapparoli, G. y Suzzi, G. 1999. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75, 207-215.
- Tovar, M. J., Romero, M. P., Girona, J. y Motilva, M. J. 2002. L-Phenilalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 892-898.
- Tzika, E., G. Sotiroudis, T., Papadimitriou, V. y Xenakis, A. 2009. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology*, 228, 487-495.
- Uceda, M. y Hermoso, M. 2001. La calidad del aceite de olive. En: "El cultivo del olivo". Editorial Mundi-Prensa, Madrid, 588-614.
- Ünal, M. Ü., Taş,, C. y Şener, A. 2011. Determination of biochemical properties of polyphenol oxidase from Domat olives. *GIDA*, 36, 185-192.
- Vázquez, A. y Maestro, R. 1970. Los colorantes antociánicos de la aceituna madura. *Grasas y Aceites* 21, 208-214.

Vázquez, A., Graciani, E. y Maestro, R. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites* 25, 269-279.

Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M. y Andrade, P. B. 2005. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89, 561-568.

Vlahov, G. 1992. Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 157-159.

Walter, JR, W. M., Fleming, H. P. y Etchells, J. L. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology*, 26, 773-776.

Welinder K. G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388-393.

Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.

Wu, Z. S., Zhang, M. y Wang, S. 2012. Effects of high pressure argon treatments on the quality of fresh-cut apples at cold storage. *Food Control*, 23, 120-127.

Wuyts, N., de Waele, D. y Swennen, R. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 308-314.

Yorulmaz, A., Poyrazoglu, E. S., Ozcan, M. y Tekin, A. M. 2012. Phenolic profiles of Turkish olives and olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1083-1093.

Yorulmaz, A., Erinc, H. y Tekin, A. 2013. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 647-658.

You, Y., Jiang, Y., Duan, X., Su, X., Song, L., Liu, H., Sun, J. y Yang, H. 2007. Browning inhibition and quality maintenance of fresh-cut chinese water chestnut by anoxia treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, 595-606.

Zago, M., Lanza, B., Rossetti, L., Muzzalupo, I., Carminati, D. y Giraffa, G. 2013. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains to use as starters in fermented table olives: oleuropeinase activity and phage sensitivity. *Food Microbiology*, 34, 81-87.

Zoidou, E., Melliou E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P. y Skaltsounis, A. L. 2010. Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 46-50.