The background of the cover is a microscopic image of olive cells, showing various colored cell walls and internal structures in shades of green, brown, and pink. The cells are arranged in a somewhat regular pattern, with some larger cells and many smaller ones.

**Factores bioquímicos implicados
en la degradación oxidativa
de **compuestos fenólicos**
durante el proceso de extracción
del **aceite de oliva virgen****

TESIS DOCTORAL

**Rosa María García Rodríguez
Sevilla 2013**



Instituto de la Grasa
Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales



Universidad de Sevilla
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

**FACTORES BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA
DEGRADACIÓN OXIDATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS
DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

Memoria que presenta Rosa María García Rodríguez
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Fdo. Rosa María García Rodríguez

<u>I. INTRODUCCION</u>	1
I.1. EL OLIVO Y EL ACEITE DE OLIVA	1
I.1.1. El cultivo del olivo	1
I.1.2. El aceite de oliva	3
<i>I.1.2.1. El proceso de elaboración del aceite de oliva</i>	4
<i>I.1.2.2. La clasificación del aceite de oliva</i>	6
<i>I.1.2.3. La composición del aceite de oliva virgen</i>	8
<i>I.1.2.4. El aceite de oliva virgen y la salud humana</i>	11
I.2. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LAS ENZIMAS OXIDO-REDUCTASAS	13
I.2.1. Los compuestos fenólicos en plantas	13
I.2.2. Los compuestos fenólicos en la aceituna y el aceite de oliva virgen	15
I.2.3. El metabolismo de los compuestos fenólicos: el papel de las enzimas óxido-reductasas	21
I.3. LAS PROTEÍNAS PEROXIDASAS EN PLANTAS	26
<u>II. OBJETIVOS</u>	31
<u>III. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	32
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO	32
III.1.1 Frutos	32
III.1.2. Aceites	34
<i>I.2.1. Ensayos tecnológicos</i>	34
III.2. AISLAMIENTO Y MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	37

III.2.1. Obtención del extracto crudo a partir de polvo acetónico.....	37
III.2.2. Actividad peroxidasa.....	37
III.2.2.1. Aislamiento de proteínas con actividad peroxidasa en semilla y pulpa de <i>aceituna</i>	37
III.2.2.2. Medida espectrofotométrica de la actividad peroxidasa.....	38
III.2.2.3. Medida de la actividad peroxidasa por HPLC.....	39
III.2.3. Actividad polifenol oxidasa.....	39
III.2.3.1. Extracción de proteínas con actividad polifenol oxidasa en semilla y pulpa <i>de aceituna</i>	39
III.2.3.2. Medida espectrofotométrica de la actividad polifenol <i>oxidasa</i>	40
III.2.3.3. Medida de la actividad polifenol oxidasa por HPLC.....	41
III.2.4. Actividad β -glucosidasa.....	42
III.2.4.1. Extracción de proteínas con actividad β -glucosidasa de pulpa y <i>semilla de aceituna</i>	42
III.2.4.2. Medida espectrofotométrica de la actividad β -glucosidasa.....	42
III.3. PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE SEMILLA.....	43
III.3.1. Obtención del extracto crudo.....	43
III.3.2. Precipitación con sulfato amónico.....	44
III.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico.....	44
III.3.4. Cromatografía de intercambio catiónico.....	45
III.3.4.1. Determinación del peso molecular de las proteínas.....	46
III.3.4.1.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	46
III.3.4.1.2. Tinción de los geles.....	47
III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE SEMILLA.....	48
III.4.1. Especificidad y selectividad de sustrato.....	48
III.4.2. Determinación de parámetros cinéticos.....	49

III.4.3. Efecto del pH.....	49
III.4.4. Efecto de la temperatura.....	49
III.4.5. Efecto de la fuerza iónica.....	50
III.4.6. Efecto de inhibidores de la oxidación.....	50
III.5. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	50
III.5.1. Extracción de la fracción fenólica de aceite de oliva virgen.....	50
III.5.2. Extracción de la fracción fenólica de pulpa y pasta de frutos de aceituna.....	51
III.5.3. Extracción de la fracción fenólica de semilla.....	51
III.5.4. Purificación de demetiloleuropeína a partir de un extracto de fenoles de pulpa de aceituna.....	52
III.5.5. Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC.....	52
III.6. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	57
III.6.1. Determinación de proteínas.....	57
III.6.2. Análisis estadístico.....	57
III.7. REACTIVOS Y APARATOS.....	57
III.7.1. Reactivos.....	57
III.7.2. Aparatos.....	58
IV. RESULTADOS.....	60
IV.1. ACTIVIDADES ÓXIDO-REDUCTASAS Y METABOLISMO DE COMPUESTOS FENOLICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA Y EL PROCESO DE EXTRACCION DEL ACEITE.....	60
IV.2. CONTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA A LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE ACEITUNA Y ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	68
IV.2.1. Extracción y medida de la actividad peroxidasa.....	68

IV.2.1.1. <i>Extracción de proteínas con actividad peroxidasa</i>	68
IV.2.1.2. <i>Optimización de la medida espectrofotométrica de la actividad peroxidasa</i>	69
IV.2.2. Distribución de la actividad peroxidasa en los distintos tejidos de la aceituna....	72
IV.2.3. Evolución de la actividad peroxidasa durante la maduración de la aceituna.....	73
IV.2.4. Actividad peroxidasa y oxidación de fenoles del olivo.....	74
IV.2.3.1 <i>POX y oxidación de compuestos fenólicos de la aceituna</i>	75
IV.2.3.2 <i>POX y oxidación de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen</i>	77
IV.3. CONTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD POLIFENOL OXIDASA A LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	82
IV.3.1. Extracción y medida de la actividad polifenol oxidasa.....	82
IV.3.1.1. <i>Extracción de proteínas con actividad polifenol oxidasa</i>	82
IV.3.1.2. <i>Optimización de la medida espectrofotométrica de la actividad polifenol oxidasa</i>	83
IV.3.2. Distribución de la actividad polifenol oxidasa en los distintos tejidos de la aceituna.....	86
IV.3.3. Evolución de la actividad polifenol oxidasa durante la maduración de la aceituna.....	86
IV.3.4. Actividad polifenol oxidasa y oxidación de fenoles del olivo.....	88
IV.3.4.1. <i>PPO y oxidación de compuestos fenólicos de la aceituna</i>	88
IV.3.4.2. <i>PPO y oxidación de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen</i>	94
IV.4. PURIFICACION y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINAS CON ACTIVIDAD POX EN SEMILLA DE ACEITUNA.....	97
IV.4.1. Purificación de proteínas con actividad peroxidasa en semilla de aceituna.....	97
IV.4.1.1. <i>Obtención del extracto crudo</i>	97
IV.4.1.2. <i>Precipitación con sulfato amónico</i>	98

IV.4.1.3. Cromatografía de intercambio aniónico.....	99
IV.4.1.4. Cromatografía de intercambio catiónico.....	100
IV.4.1.5. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	102
IV.4.2. Caracterización de las isoenzimas de peroxidasa de aceituna POXan y POXcat....	103
IV.4.2.1. Especificidad de sustrato y selectividad de la enzima peroxidasa.....	103
IV.4.2.2.1. Especificidad y selectividad de POXan y POX cat frente a los compuestos fenólicos de la aceituna.....	104
IV.4.2.2.2. Especificidad y selectividad de POXan y POX cat frente a los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen.....	109
IV.4.2.2. Determinación de parámetros cinéticos.....	112
IV.4.2.3. Efecto del pH.....	117
IV.4.2.4. Efecto de la temperatura.....	118
IV.4.2.5. Efecto de la fuerza iónica.....	121
IV.4.2.6. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad peroxidasa.....	121
IV.4.2.6. Efecto de posibles inhibidores de la actividad oxidativa.....	122
IV.5. FACTORES BIOQUIMICOS QUE AFECTAN A LA OXIDACIÓN DE FENOLES CATALIZADA POR PEROXIDASA Y POLIFENOL OXIDASA DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	123
IV.5.1. Modificación de la temperatura y su efecto sobre el perfil fenólico del aceite de oliva virgen.....	124
IV.5.1.1. Modificación de las actividades POX y PPO durante la conservación postcosecha de la aceituna a diferentes temperaturas: efecto en el perfil fenólico del aceite.....	124
IV.5.1.1. Modificación de la temperatura durante la etapa de batido en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen: efecto en el perfil fenólico del aceite...	129
IV.5.2. Modulación de la actividad POX durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen y su efecto en el perfil fenólico del aceite.....	130
IV.5.2.1. Efecto de la adición de peroxidasa de rábano.....	130

<i>IV.5.2.2. Efecto de la adición de peroxidasa de aceituna</i>	131
<i>IV.5.2.3. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno</i>	136
<i>IV.5.2.4. Efecto de la adición de azida sódica</i>	138
IV.5.3. Modulación de la actividad PPO durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen y su efecto en el perfil fenólico del aceite	140
<i>IV.5.3.1. Efecto de la adición de polifenol oxidasa de aceituna</i>	141
<i>IV.5.3.2. Efecto de la adición de tropolona</i>	142
IV.5.4. Otros ensayos	144
<i>IV.5.4.1. Adición de lipoxigenasa</i>	144
<i>IV.5.4.2. Adición de metabisulfito sódico y ácido cítrico</i>	145
<i>IV.5.4.1. Adición de ácido ascórbico</i>	150
<i>IV.5.4.2. Adición de ácido gálico y ácido oxálico</i>	150
 <u>V. DISCUSIÓN</u>	 152
 <u>VI. CONCLUSIONES</u>	 169
 <u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	 172

I.1. EL OLIVO Y EL ACEITE DE OLIVA

I.1.1. El cultivo del olivo

El origen del cultivo del olivo se sitúa en las regiones de las antiguas Persia y Mesopotamia y se remonta a 4.000 años a.C. aproximadamente (Boskou, 1996). Los vestigios encontrados en Siria, Palestina, Anatolia, Egipto, dejan constancia de la extensión de los olivares en la época, pero no es hasta el siglo XVI a.C. cuando los fenicios comienzan a difundir el olivo por las islas griegas para, más adelante en el siglo VI a.C., propagarlo por toda la cuenca del Mediterráneo. Existen numerosas citas en la literatura concernientes al cultivo del olivo y a los usos del aceite. En ésta está recogida su introducción en la alimentación y su comercialización, así como el empleo del aceite como ungüentos contra grietas y quemaduras y su uso en lámparas para el alumbrado. El olivo fue introducido en España hacia el año 1050 a.C. por los fenicios pero no comenzó a desarrollarse hasta la llegada de Escipión (212 a.C.) y la dominación de Roma (45 a.C.).



Figura 1. Olivo centenario localizado en Palma de Mallorca.

Actualmente España es el país con el mayor olivar del mundo (1,9 millones de hectáreas) además de ser el mayor productor y exportador mundial (41,2% de la producción mundial), concentrándose en Andalucía el 60% de la superficie y el 75% de la producción de aceite de oliva y aceituna de mesa en España. En lo que respecta al consumo de aceite de oliva, el promedio anual es de 560.000 toneladas.

El olivo (*Olea europea* L.) es la única especie de la familia Oleaceae con fruto comestible. Es un árbol con un tamaño mediano, que en casos extremos alcanza los 10 metros de altura dependiendo de la variedad y que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda *et al.*, 2000). Su tamaño y potencial para dar fruto está muy relacionado con las condiciones ambientales aunque el olivo es un árbol con mucha capacidad de adaptación. Su copa natural es redondeada y es en la superficie de ésta donde se localiza el fruto ya que el olivo requiere intensidades de luz elevadas para desarrollar los brotes (Tombessi y Cartechini, 1986). Es un árbol polimorfo que tiene una etapa juvenil con hojas claramente diferentes de las que se observan en la etapa adulta. Sus hojas son persistentes pudiendo sobrevivir incluso más de tres años. El desarrollo de la inflorescencia en la yema es bastante uniforme. El tiempo que transcurre desde la diferenciación de la primera flor hasta la última, no suele exceder de dos semanas. En condiciones normales de desarrollo, todos los ovarios que no han sido fertilizados caen, quedando en el árbol únicamente aquellos que terminarán por transformarse en sus frutos normales, las aceitunas. No obstante, en algunas variedades de olivo es relativamente frecuente que pueden desarrollarse frutos partenocárpicos conocidos como zofairones. La aceituna es una drupa compuesta por tres tejidos: el exocarpo (1-2%), mesocarpo (70-90%) y endocarpo (9-27%) que contiene una única semilla (1,2-3,5%).

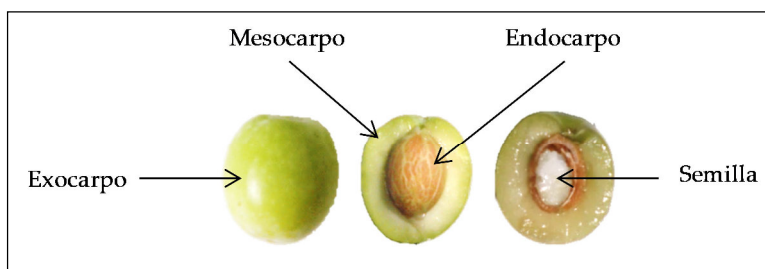


Figura 2. Corte transversal de una aceituna.

El olivo florece al final de la primavera en el hemisferio norte y la lignificación del endocarpo tiene lugar entre las 10 y 12 semanas después de la floración (SDF), ocurriendo en ese momento la biosíntesis y acumulación de aceite, tanto en el mesocarpo como en la semilla (Rapoport, 2001). La aceituna, se desarrolla durante todo el verano hasta que alcanza la maduración fisiológica en septiembre y octubre; donde el fruto alcanza su tamaño definitivo y es de color completamente verde. A partir de este punto (alrededor de las 28 SDF) se produce la maduración organoléptica del fruto, la cual se reconoce por un viraje de color de verde a morado llegando a un tono prácticamente negro al final de la maduración (Sánchez, 1994). Este proceso dura entre 35 y 40 semanas a partir de la floración, y es el resultado de una combinación de sucesos bioquímicos y fisiológicos regulados por factores genéticos que también depende de la variedad y la edad del olivo, las condiciones climatológicas y la carga del árbol (Connor y Fereres, 2005). Desde la fertilización hasta la maduración negra completa se observan cinco fases de desarrollo del fruto (Hartmann, 1949; Shulman y Lavee, 1979): en la fase I se produce un período de latencia inicial; después de la rápida división celular se produce un crecimiento rápido de las células (a partir de los 10-15 días después de la fertilización), principalmente del endocarpo, que constituye la fase II, donde se desarrolla y se endurece el endocarpo (a principios de julio) suponiendo un 80% del volumen total del fruto; en la fase III el crecimiento es más lento y se embrión y el endocarpo alcanzan su tamaño final; en la fase IV se produce el ensanchamiento rápido del mesocarpo y comienza la biosíntesis y acumulación de aceite; durante la fase V el crecimiento rápido se frena (otoño), se produce la maduración de los frutos y se sigue acumulando aceite aunque en menor medida; la fase VI es una segunda fase de latencia. Cada parte del fruto crecerá a una velocidad diferentes (Tombesi et al., 1994).

I. 1.2. El aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen (AOV) se define como el zumo de la aceituna, extraído sólo por métodos físicos que no produzcan alteración del jugo original, con exclusión expresa de los aceites obtenidos con disolventes, por procedimientos de reesterificación o por cualquier

mezcla de aceites de otra naturaleza (Alba, 2001). Se trata por tanto de un zumo natural que cuando se obtiene de frutos de máxima calidad da lugar a un producto de notables características organolépticas y nutritivas (García-Muriana *et al.* 2004).

1.1.2.1. El proceso de elaboración del aceite de oliva virgen

Para obtener un aceite de calidad el fruto debe ser cosechado en su grado óptimo de maduración (Aparicio y Morales, 1998), recogerlo directamente del árbol y no del suelo, transformarlo rápidamente con el fin de que no permanezca mucho tiempo almacenada y se comiencen a producir procesos fermentativos, utilizar las instalaciones adecuadas y actuar en condiciones óptimas de limpieza (Kiritsakis, 1991; Papanastassiou, 1966; Frezzotti, 1956). Las aceitunas se trasladan a la almazara, se clasifican en función de la variedad, del estado del fruto o de cualquier otro parámetro como el tipo de suelo del que provienen, cualquier tratamiento al que se haya sometido el árbol, etc.

El proceso industrial de elaboración del AOV consta de varias etapas en las que se moltura la aceituna, se bate la pasta formada, se extrae el aceite y, por último, se separa del resto de la pasta (Alba, 2001).

Los sistemas de molturación y mezcla son varios. El más antiguo era de empiedro por medio de cilindros o rulos cónicos que giraban sobre una cuba de piedra que recogía la pasta y que mediante un sistema de arrastre mezclaba la pasta con ruedas dentadas y la conducía hasta la salida a través de un sinfín. Más adelante la piedra se sustituyó por el acero inoxidable apareciendo el sistema de martillo, con un doble tambor en cuyo interior se encuentran dos cribas concéntricas con los “martillos” dispuestos como una hélice. El proceso en este sistema tiene lugar a una velocidad más elevada que en el mencionado anteriormente, de modo que puede que la temperatura en este punto aumente produciéndose un aceite de peor calidad. Los molinos metálicos son más prácticos y económicos pero pueden tener inconvenientes debido a las emulsiones que generan como consecuencia de la alta velocidad a la que funcionan interfiriendo en las características organolépticas del AOV, además de sufrir mayor desgaste.

Con la molienda se rompen las membranas celulares y se libera el aceite que se encontraba como gotas dispersas en el mesocarpo y, en menor medida, en la semilla. Es en este punto cuando entran en contacto las enzimas y los sustratos que intervienen en la biosíntesis de los compuestos responsables de la calidad del AOV, como es el caso de los compuestos volátiles y los polifenoles. En relación a estos últimos, existen estudios comparativos entre aceites extraídos con molinos de empiedro y de metal siendo éstos los que producen AOV con mayor contenido de compuestos fenólicos (Alloggio *et al.*, 1996) y por tanto con un mayor amargor (Angerosa y Di Giacinto, 1995). La siguiente etapa es el batido, en la que la pasta se remueve lentamente de manera continua para uniformarla y provocar la coalescencia de las gotas de aceite dispersas facilitando la posterior extracción del AOV. El batido se realiza en termobatidoras controlando la temperatura entre 22-25 °C durante 20-30 minutos en el caso de los molinos de empiedro y entre 25-30 °C durante 30-75 minutos en los molinos de martillo. El objetivo de ampliar el tiempo de batido no es más que evitar las posibles emulsiones que se forman. Con esto se mejora la extracción del aceite pero normalmente se perjudica la calidad de éste. Al aumentar la temperatura y el tiempo de batido aumenta la acidez y disminuyen los compuestos volátiles (Luaces, 2007). Con la temperatura se promueve el paso de compuestos fenólicos al aceite (Taticchi, 2013); sin embargo, al aumentar el tiempo de batido se favorece la degradación de los polifenoles mediante las enzimas oxidativas. Por tanto, lo ideal es llegar a unas condiciones de compromiso entre los distintos factores responsables de la calidad del AOV.

La separación de los componentes de la pasta se puede realizar de varios modos: por filtración selectiva, por presión o por centrifugación. El principio de la filtración selectiva se basa en la posibilidad de permitir el paso del aceite a través de un sistema filtrante en el que queda retenida el agua. Debido a que la recuperación no es muy buena, es común acoplarlo a un sistema de centrifugación. Antiguamente el aceite en las pastas se extraía con prensas, las cuales se han ido perfeccionando con el paso de los años hasta llegar a las prensas hidráulicas, empleadas en la actualidad. Este método de presión requiere mucha limpieza y mano de obra, por lo que está en desuso. En la actualidad, se emplean con mayor frecuencia los sistemas de

centrifugación. Se introduce la pasta de aceituna en un cilindro horizontal para hacerla girar a gran velocidad en ausencia de aire, consiguiendo la separación del orujo, del alpechín y del aceite en función de su densidad. Dependiendo del número de fases que se quieran obtener se emplean sistemas continuos de dos fases (orujo húmedo o alperujo y aceite) o de tres fases (orujo, alpechín y aceite). Para favorecer la separación de las tres fases es necesario añadir agua templada, lo que supone un mayor consumo de energía térmica y de agua, la generación de más cantidad de residuos acuosos (alpechín) y la disminución del contenido de polifenoles en el aceite. El sistema de dos fases no tiene estos inconvenientes (Hermoso *et al.*, 1995), de manera que el contenido en polifenoles es más elevado consiguiéndose así aceite de mayor estabilidad oxidativa y una intensidad de amargor superior a la que se encuentra en los aceites obtenidos mediante el sistema de tres fases. Ambos sistemas han sustituido al sistema de prensas por ser más rápidos, más limpios y por necesitar menos mano de obra aunque más especializada. Independientemente del sistema de separación empleado es necesario un último paso que se realiza en una centrífuga vertical que funciona a gran velocidad (7.000 rpm).

Un vez obtenido el AOV, y en relación con su conservación conviene tener en cuenta que el material más apropiado para los depósitos de almacenamiento es el acero inoxidable de calidad alimentaria y que la temperatura óptima de almacenamiento oscila entre los 15-25°C, Además se deben eliminar los restos de alpechín para que su carga enzimática no provoque alteraciones en los atributos de calidad del AOV y evitar tanto las radiaciones que puedan dar lugar a la formación de radicales y el contacto con el aire para que no se favorezcan procesos oxidativos.

1.1.2.2. La clasificación del aceite de oliva

Los aceites de oliva se pueden clasificar en distintas categorías en función de una serie de parámetros físico-químicos y organolépticos.

- a) Aceite de oliva virgen extra: Es el aceite de oliva de máxima calidad. Su acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo es 0,8%, no debe contener defectos y debe poseer un frutado superior a 0.
- b) Aceite de oliva virgen: Es un aceite de oliva de segunda categoría. Su acidez libre, expresada en ácido oleico, como máximo es 2%, puede contener defectos cuya mediana sea igual o inferior a 3.5 y debe poseer un frutado superior a 0.
- c) Aceite de oliva lampante: Su acidez libre, expresada en ácido oleico, es superior a 2%, contiene defectos cuya mediana superior a 3,5. A diferencia de los dos anteriores no se considera apto para el consumo humano y debe someterse a un proceso de refinado para rectificar sus defectos en el que pierde el olor, el color y el sabor. Para su comercialización es necesario mezclarlos con aceite de oliva virgen o virgen extra de acidez inferior al 1%.
- d) Aceite de oliva: Es el resultado de mezclar aceite de oliva refinado con aceite de oliva virgen o virgen extra. Su acidez libre, expresada en ácido oleico, es inferior al 1%.

Además de los aceites de oliva vírgenes, aquéllos que se obtiene directamente de la aceituna, en las almazaras se pueden obtener otro tipo de aceite a partir de un subproducto: el orujo.

- e) Aceite de orujo de oliva crudo: Es el aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos. No es apto para el consumo humano por lo que requiere refinado.
- f) Aceites de orujo de oliva refinado: Aceite obtenido mediante refinado de aceite de orujo de oliva crudo, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior al 0,3%. Éste tampoco es apto para el consumo humano.
- g) Aceite de orujo de oliva: Es el aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes distintos del lampante, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no podrá ser superior al 1%.

1.1.2.3. La composición del aceite de oliva virgen

El AOV está constituido principalmente por triglicéridos ($\geq 98\%$) y mezclas complejas de componentes menores ($\sim 2\%$) de naturaleza química muy diversa. Respecto a la composición de ácidos grasos, la principal diferencia entre el AOV y otros aceites es su alto contenido en ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado que supone entre el 56% y 84% del contenido total de ácidos grasos, y la presencia de ácido linoleico (3-21%), un ácido poliinsaturado esencial en nuestra dieta. Bajo la denominación de componentes menores se engloban compuestos de muy diversa naturaleza como: compuestos volátiles, ácidos grasos libres, alcoholes terpénicos libres o esterificados con los ácidos grasos, esteroides, pigmentos (clorofilas y carotenoides), tocoferoles y compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de especial interés dentro de los componentes minoritarios del AOV ya que son fundamentales en tres aspectos distintos. Desde el punto de vista nutricional confieren actividad antioxidante, desde el punto de vista tecnológico condicionan la estabilidad de los aceites y desde el punto de vista organoléptico son responsables del sabor amargo del AOV (Mateos *et al.*, 2003).

Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles responsables del aroma del AOV son componentes de naturaleza química muy diversa, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres, entre otros, que están presentes en el aceite en muy bajas concentraciones. Algunos de los compuestos identificados en la fracción volátil del AOV están ya presentes en el tejido intacto de la aceituna, mientras que otros no aparecen, o se detectan sólo como trazas, dentro de las células del fruto (Montedoro *et al.*, 1993), formándose rápidamente cuando se produce la rotura de la estructura celular (como ocurre durante el proceso de obtención de AOV), como resultado de reacciones enzimáticas en presencia de oxígeno. Dentro de este grupo de compuestos destacan los aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono, así como sus correspondientes ésteres volátiles que son los principales responsables de las notas aromáticas verdes características del AOV y cuyos precursores son los ácidos grasos linoleico y linolénico que son metabolizados a través de la ruta bioquímica de la lipoxigenasa (Oliás *et al.*, 1993). Sin embargo, además de estos compuestos volátiles, que podríamos clasificar como deseables,

existen una serie de compuestos que también se forman durante el procesado de la aceituna o durante la conservación del aceite que se identifican como notas aromáticas no deseadas y que son responsables de algunos defectos organolépticos de los aceites (Morales *et al.*, 2005). El perfil de compuestos volátiles de un aceite está fuertemente condicionado por la variedad de aceituna y por su grado de maduración (Aparicio y Morales, 1998).

Alcoholes alifáticos grasos

Constituyen una clase importante de compuestos dentro de los componentes menores ya que se usan como criterio para la clasificación del aceite de oliva en las distintas categorías. Los principales alcoholes lineales presentes en el aceite de oliva son docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol, mientras que los alcoholes con número impar de átomos de carbono se encuentran como trazas. El contenido total de alcoholes alifáticos no suele exceder de 350 mg/kg.

Esteroles

Los esteroles se clasifican en: fitoesteroles, alcoholes triterpénicos y metilesteroles. Están presentes en el intervalo de 1800-5000 mg/kg en el AOV (Mulinacci *et al.*, 2005) y su contenido en el mismo permite, en ocasiones, identificar el origen geográfico y la variedad de las correspondientes aceitunas (Aparicio, 2000). También puede utilizarse como criterio de pureza del aceite.

Pigmentos

Las clorofilas y los carotenoides son los responsables del color del AOV. Los pigmentos clorofílicos son responsables del color verdoso del aceite, siendo las feofitinas (productos de oxidación de las clorofilas) los compuestos mayoritarios, mientras que los carotenoides son los que proporcionan el color amarillento al aceite. El carotenoide más abundante es la luteína, seguida del β -caroteno y las xantofilas. La cantidad de pigmentos en un aceite depende en gran medida de la variedad, grado de maduración de la aceituna, del sistema de obtención del aceite y de las condiciones de almacenamiento del mismo. Los pigmentos clorofílicos se cuantifican en el AOV en concentraciones de 10-30 mg/kg (Boskou, 2002) mientras que la concentración de los carotenoides no excede de 10 mg/kg (Boskou, 2002). Estos compuestos juegan un papel importante en la salud, en la trazabilidad del

alimento, en la autenticación y en la estabilidad oxidativa actuando como antioxidantes en condiciones de oscuridad y como prooxidantes en condiciones de luz.

Tocoferoles

Los α -, β -, γ - y δ -tocoferoles son fenoles lipofílicos y sólo los tres primeros se cuantifican en el AOV, siendo el α -tocoferol el más abundante, pudiendo estar presente en el intervalo de 12-400 mg/kg. Al igual que los pigmentos, los tocoferoles contribuyen a las propiedades antioxidantes del AOV y su perfil se usa con frecuencia como criterio de pureza.

Ésteres no-glicéridos

La mayor parte de los ácidos grasos presentes en el AOV se encuentran esterificados con el glicerol, como ya se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, pequeñas cantidades de éstos forman ésteres con diferentes alcoholes como metanol, etanol y otros alcoholes de cadena larga y también con esteroides como β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y con alcoholes triterpénicos. La concentración total de este grupo de compuestos se encuentra entre 100-250 mg/kg.

Hidrocarburos

El principal hidrocarburo presente en el AOV es el escualeno, 1.250-7.500 mg/kg, y constituye alrededor del 50 % de la fracción insaponificable. Otros hidrocarburos (pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano) se usan en la caracterización varietal y en el origen geográfico del aceite (Aparicio, 2000). El contenido total de hidrocarburos es de 1.500-8.000 mg/kg.

Ceras

Las ceras son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes alifáticos de cadena larga y cuyo interés radica en que son indicadores tanto de la calidad como de la pureza de un AOV. El AOV se distingue del refinado y del aceite de orujo porque contiene alto contenido de ceras de 36 y 38 átomos de carbono y bajo contenido de ceras de 40, 42, 44 y 46 átomos de carbono, mientras que los otros aceites se caracterizan por una relación inversa.

Fosfolípidos

El contenido total de éstos está en el intervalo de 40-135 mg/kg. Estos compuestos pueden

afectar al estado fisicoquímico de aceites no filtrados y se consideran antioxidantes secundarios (Koidis y Boskou, 2006).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de especial interés dentro de los componentes menores del AOV ya que son fundamentales para las propiedades tanto nutricionales, como tecnológicas y organolépticas del AOV (Morales y Tsimidou, 2000). Los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del AOV son los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol y tirosol, formados a partir de dos glucósidos fenólicos presentes en la aceituna, la oleuropeina y el ligustrósido. Las características de estos compuestos se describen más ampliamente en el apartado I.2.2.

I.1.2.4. El aceite de oliva virgen y la salud humana

El AOV es la principal fuente de grasas de la dieta mediterránea (Boskou, 2000). El concepto de la dieta mediterránea, rica en vegetales, fruta, pescado y cereales, aflora en los años 50. Desde entonces han sido muchos los estudios epidemiológicos que demuestran que la incidencia de enfermedades coronarias y ciertos cánceres como el de mama, colon y próstata disminuye en aquellas regiones en las que se tienen estos hábitos alimenticios (Trichopoulou, 2004). En 1979, Keys et al., evidenciaron la relación existente entre la reducción del riesgo de padecer enfermedades coronarias con la dieta mediterránea a pesar de su alto contenido en grasa monoinsaturada; así como la disminución de sufrir cáncer, parkinson y alzheimer (Sofi, 2008).

Los efectos beneficiosos del AOV se atribuyen a su peculiar perfil de ácidos grasos, con un alto contenido en ácido oleico, y a la presencia de componentes minoritarios entre los que destacan los compuestos fenólicos (Visioli, 1995). Ambas características lo distinguen de otros aceites vegetales (Boskou, 2000) y le proporcionan resistencia a la oxidación (Gutfinger, 1981) y un sabor muy peculiar.

Estudios en animales han probado la fuerte actividad protectora del AOV contra la carcinogénesis, el carcinoma de colon y de mama (Fabiani, 2009), la protección contra el cáncer de piel inducido por la radiación UV (Ichihashi, 2000) y la reducción de la aparición de

tumores en el hígado en ratones (Thuy, 2001). También se ha comprobado que el consumo del aceite de oliva virgen con un alto contenido de fenoles reduce un 30% el daño oxidativo del ADN en mujeres durante la menopausia (Salvini, 2006). Según estudios *in vivo*, los compuestos fenólicos del AOV reducen el daño oxidativo de lípidos (Covas, 2006), la disfunción endotelial (Ruano, 2005), el perfil protrombótico (Ruano, 2007), y el estado inflamatorio (Fitó, 2008).

Los compuestos orto-difenólicos presentes en la aceituna y en el AOV son los que parecen tener mayor actividad biológica. En este sentido, la contribución en la biosíntesis de tromboxano en células humanas fue evaluada por Petroni *et al.* (1995), así como la inhibición de la agregación plaquetaria, estudiada con hidroxitirosol posteriormente (Priora *et al.*, 2008). Los estudios de Mann *et al.* (1999) demostraron que el hidroxitirosol reducía el daño oxidativo de los eritrocitos humanos, y poseía un efecto protector respecto al riesgo de padecer trombosis y al daño por aterosclerosis, sobre el que se investigó más adelante por González-Santiago *et al.* (2006). Además este compuesto también ejerce un papel protector frente al cáncer, induciendo la apoptosis de las células tumorales (Fabiani, *et al.*, 2001), aumenta la resistencia de las células del cerebro a la oxidación (Schaffer, 2007) y mantiene su potencial antiinflamatorio (Bitler, 2005). La actividad antioxidante de la oleuropeína (principal glucósido fenólico presente en el fruto del olivo) ha sido también muy estudiada. Existen estudios *in vivo* de Briante *et al.* (2004) y Marsella *et al.* (2004) en los que se reporta la protección del LDL frente a Cu^{2+} y la oxidación celular. Además la oleuropeína ha demostrado poseer actividad antioxidante *ex vivo* en el corazón de ratas (Manna *et al.*, 2004); por otro lado, se ha visto su actividad antiinflamatoria *in vitro* (Carluccio *et al.*, 2003) e *in vivo* (Miles *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2006) y su implicación en la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, efecto también observado para la aglucona de la oleuropeína que es uno de los compuestos mayoritarios del AOV (Dell'agli *et al.*, 2006).

Aunque existen numerosos estudios científicos que apuntan que existe una relación directa entre el contenido fenólico y los efectos beneficiosos del AOV, para explorar y comprender el mecanismo de acción de estos compuestos y su papel en la prevención de

enfermedades y en la mejora de la salud humana, son necesarios amplios estudios de absorción, metabolismo, excreción, toxicidad, etc. En este sentido, y aunque los ensayos *in vitro* son de gran utilidad y proporcionan mucha información, parece evidente que se requieren más estudios *in vivo*.

I.2. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LAS ENZIMAS OXIDO-REDUCTASAS

I.2.1 Los compuestos fenólicos en plantas

Los compuestos englobados bajo el término fenoles, poseen variadas estructuras químicas que en la mayoría de los casos contienen un grupo aromático con uno o más grupos -OH. Debido a la gran heterogeneidad de sus estructuras el término polifenoles no es el más adecuado para identificarlos y es preferible recurrir a una definición basada en su origen metabólico que describe a los fenoles de plantas como aquellas sustancias derivadas de la ruta del ácido shikímico y el metabolismo de los fenilpropanoides (Ryan *et al.*, 2002) tal y como se recoge en el diagrama adjunto (Obied *et al.*, 2008).

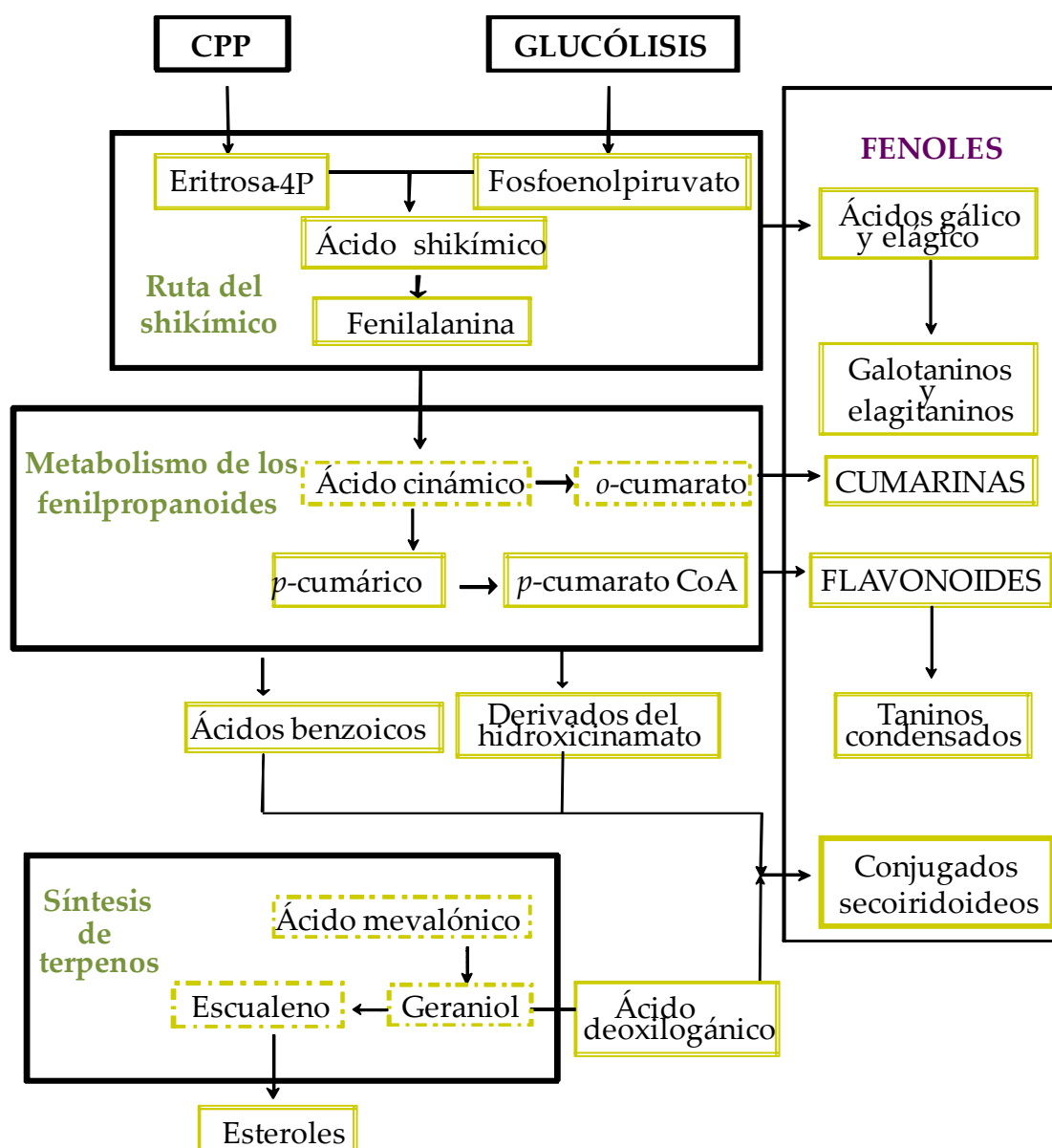


Figura 3. Diagrama resumen de la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido shikímico y del metabolismo de los fenilpropanoides (Obied et al., 2008).

La biosíntesis de los compuestos fenólicos se inicia con la formación de ácido shikímico a partir de la glucólisis no oxidativa de la glucosa (Haslam, 1993) y a partir de él se desencadena una serie de reacciones en las que se sintetizan precursores de lignina y flavonoides. La ruta del ácido shikímico es la responsable de la formación de dos aminoácidos

aromáticos: fenilalanina y tirosina. La fenilalanina es el principal precursor de la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas superiores, siendo el sustrato inicial en el metabolismo de los fenilpropanoides. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) tiene un papel clave en la biosíntesis de los fenilpropanoides catalizando, la eliminación estereoespecífica no oxidativa (Parr y Bolwell, 2000) de amonio a partir de la fenilalanina o la tirosina para dar trans-cinamato (Haslam, 1993). La ruta del ácido shikímico está básicamente restringida a los cloroplastos (Leuschner y Schultz, 1991), mientras que las enzimas relativas al metabolismo de los fenoles se localizan libres en el citoplasma, débilmente asociadas a la endomembrana citoplasmática o, en el caso de las hidrolasas, unidas a microsomas (Parr y Bolwell, 2000), por lo que debe existir un mecanismo para transportar los sustratos entre los distintos compartimentos (Fernández-Bolaños, 1995). Las rutas metabólicas son muy complejas, con múltiples caminos alternativos que varían significativamente de un tejido a otro, de unas condiciones de crecimiento a otras y en respuesta a distintos estímulos medioambientales.

Los compuestos fenólicos se encuentran en todas las partes de la planta pero su naturaleza y concentración varía enormemente entre los distintos tejidos. Dentro de la célula, aunque algunos se localizan en las paredes celulares o en las cutículas extracelulares, la mayoría de los compuestos fenólicos se almacenan principalmente en las vacuolas (Hutzler, 1998; Subbotina, 1997; Bayliss, 1997). En la mayoría de los casos se almacenan como fenoles conjugados. La conjugación aumenta la solubilidad, de manera que podría potenciarse el transporte de los compuestos fenólicos a través de distintos compartimentos intracelulares (Damtoft et al., 1993).

I.2.2. Los compuestos fenólicos en la aceituna y en el aceite de oliva virgen

Los compuestos fenólicos más importantes en la aceituna y en el AOV son, como se ha mencionado con anterioridad, los compuestos secoiridoideos que son exclusivos de plantas de la familia *Oleaceae* a la que pertenece el olivo (*Olea europaea* L). Los secoiridoideos, que fueron identificados hace más de cincuenta años por Cantarelli et al., (1961) y Montedoro et al., (1969), son derivados de los iridoideos. Los compuestos iridoideos son monoterpenos que

poseen un anillo de seis carbonos fusionado con otro de cinco, siendo precisamente la apertura de este ciclopentano la que da lugar a la familia de los secoiridoideos.

Los glucósidos fenólicos son los componentes importantes de la aceituna representando entre un 1-3% en peso de la pulpa fresca (Garrido, 1997). Los principales glucósidos secoiridoideos en la aceituna son la oleuropeína y el ligustrósido, cuyas agluconas son ésteres del ácido elenólico con hidroxitirosol y tirosol respectivamente (Soler-Rivas *et al.*, 2000), la demetiloleuropeína y el nucénido (Garrido, 1997). Otros glucósidos fenólicos identificados en la aceituna son el verbascósido, un derivado del ácido hidroxicinámico (Andary, 1982; Servili, 1999), y ciertos glucósidos de flavonas como luteolin-7-glucósido y apigenin-7-glucósido (Ryan *et al.*, 2002). La oleuropeína, demetiloleuropeína y verbascósido se encuentran en todas las partes constitutivas del fruto como la piel, la pulpa y la semilla; mientras que el nucénido únicamente se ha localizado en la semilla (Servili, 1999). En semilla, a pesar de que existen pocos estudios sobre la composición fenólica además del mencionado nucénido se ha identificado otro glucósido fenólico, el salidrósido (Maestro-Durán *et al.*, 1994). Es importante destacar que aunque ninguno de estos glucósidos fenólicos está presente en el AOV, los principales compuestos fenólicos del aceite son compuestos derivados de la oleuropeína y del ligustrósido que se forman por hidrólisis de los anteriores durante el proceso de extracción del aceite (Angerosa *et al.*, 1995; Montedoro *et al.*, 1993).

Una vez que los glucósidos fenólicos son liberados en la etapa de molturación del fruto durante el proceso mecánico de extracción del AOV (Vierhuis *et al.*, 2001), se originan los compuestos secoiridoideos mayoritarios del aceite de oliva virgen, que son la forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (FAAO) y la forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada (FDAO), identificados por Montedoro *et al.*, (1992) y junto a estos compuestos se encuentran los correspondientes derivados del ligustrósido: la forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido (FAAL) y la forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado (FDAL), los cuales también se encuentran en cantidades elevadas. Además de estos derivados secoiridoideos existen fenoles simples como el hidroxitirosol y el tirosol (que también se encuentran en el fruto) que están presentes en los aceites frescos en bajas concentraciones pero cuyos niveles van incrementándose a medida

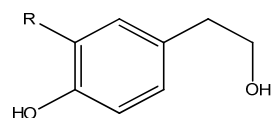
que pasa el tiempo de almacenaje de los aceites (Montedoro, 1992). Junto a los dos alcoholes mencionados y sus correspondientes acetatos también encontramos lignanos como el 1-acetoxipinorresinol y el pinorresinol (Brenes et al., 2000; Owen et al., 2000), flavonas como la luteolina y la apigenina y en menor cantidad, los ácidos ferúlico, p-cumárico, vanílico y cinámico. Ambos, secoiridoideos y lignanos, determinan las notas amargas y picantes del aceite de oliva virgen.

El contenido total de compuestos fenólicos totales en los extractos de aceite oscila en un amplio intervalo entre 40-1000 mg/kg de aceite (Baldioni, 1996) y, mediante estudios en los que se hizo uso del Rancimat, se permitió establecer una alta correlación entre la cantidad total de fenoles y la vida media del AOV (Gutiérrez et al., 1977). Aquéllos que mostraron mayor capacidad antioxidante fueron los *o*-difenoles, hidroxitirosol, FDAO y FAAO frente a los monofenoles y al α -tocoferol (Baldioni et al., 1996; Evangelisti et al., 1997). Por otro lado, las propiedades sensoriales del AOV también fueron evaluadas, encontrándose que los atributos relacionados con el amargor y el carácter picante estaban conectados con la concentración total de los fenoles (Gutiérrez, 1992; Montedoro, 1992; Tsimidou, 1998). En contraposición a estos atributos positivos, se determinó que algunos ácidos fenólicos contribuían a la nota negativa de atrojado (Graciani, 1981).

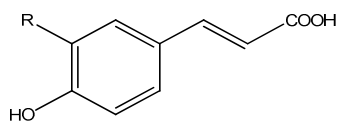
En las últimas décadas se han hecho grandes esfuerzos por identificar nuevos oleósidos conjugados en el olivo y en determinar su química durante el procesado y el almacenamiento del aceite de oliva y su bioactividad debido al interés creciente en los beneficios de la dieta mediterránea sobre la salud.

Los compuestos fenólicos presentes en aceitunas y aceites hasta ahora estudiados están recogidos en la Figura 4. Aquéllos nombrados como FDAO (20) y FDAL (21) son las formas dialdehídicas de las agluconas de la oleuropeína y del ligustrósido descarboximetiladas y como FAAO (22) y FAAL (23) son las formas aldehídicas de las agluconas de la oleuropeína y del ligustrósido respectivamente.

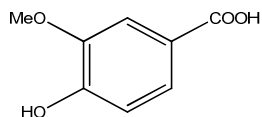
FENOLES SIMPLES



(R = OH) **Hidroxitirosol (HTy)** (1)
(R = H) **Tirosol (Ty)** (2)

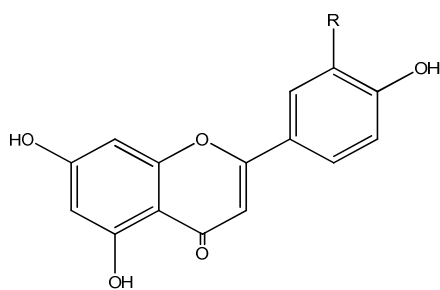


(R = H) **Ácido p-cumárico** (3)
(R = MeO) **Ácido ferúlico** (4)



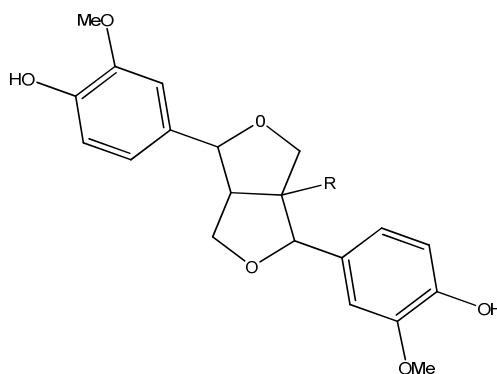
Ácido vanílico (5)

FLAVONAS



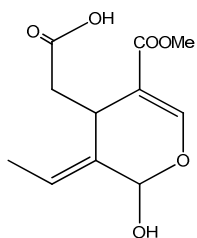
(R = OH) **Luteolina** (6)
(R = H) **Apigenina** (7)

LIGNANOS

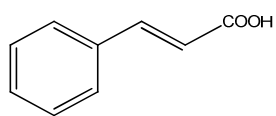


(R = H) **Pinorresinol** (8)
(R = O-CO-CH₃) **1-acetoxipinorresinol** (9)

NO FENÓLICOS

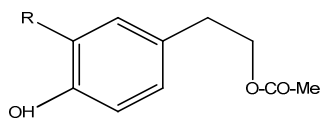


Ácido elenólico (10)



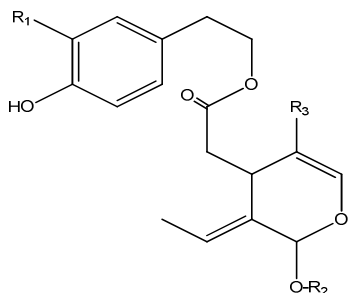
Ácido cinámico (11)

ACETATOS



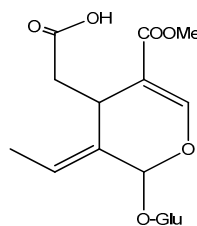
(R = OH) **Acetato de hidroxitirosol (AcHTy)** (12)
(R = H) **Acetato de tirosol (AcTy)** (13)

GLUCÓSIDOS DE HIDROXITIRO SOL Y TIROSOL

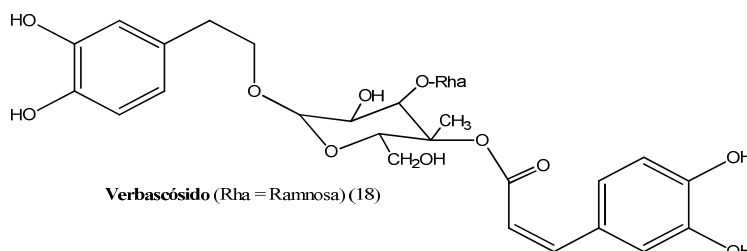


R₁ R₂ R₃

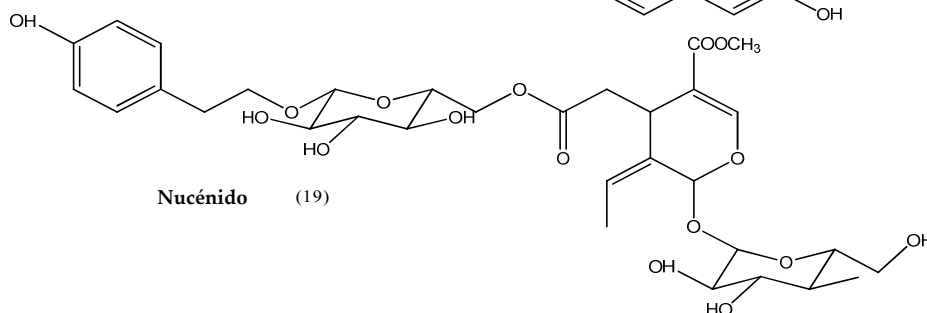
Oleuropeína	OH	Glu	COOMe	(14)
Ligustrósido	H	Glu	COOMe	(15)
Demetiloleuropeína	OH	Glu	COOH	(16)



Glucósido del ácido elenólico (17)

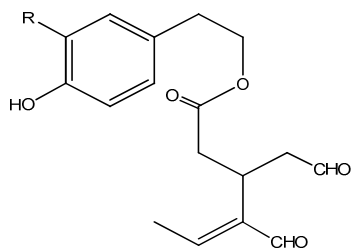


Verbascósido (Rha = Ramnosa) (18)

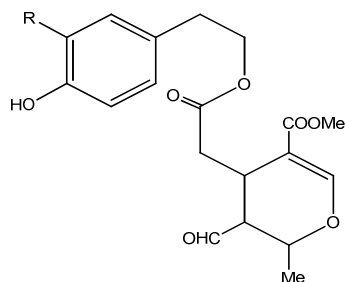


Nucénido (19)

DERIVADOS SECOIRIDOIDEOS



(R = OH) FDAO (20)
(R = H) FDAL (21)



(R = OH) FAAO (22)
(R = H) FAAL (23)

Figura 4. Compuestos fenólicos presentes en la aceituna y en el aceite de oliva virgen.

Los glucósidos fenólicos y sus derivados suelen estar relacionados con la naturaleza antioxidante de los componentes minoritarios del AOV y con reacciones de pardeamiento enzimático. Muchos fenoles, son de hecho buenos antioxidantes, especialmente por su capacidad para secuestrar radicales libres impidiendo la propagación de reacciones radicalarias, y buenos sustratos de reacciones de pardeamiento. Normalmente funcionan como antioxidantes a baja concentración mientras que a altas concentraciones se comportan como pro-oxidantes al actuar como iniciadores de reacciones de oxidación química. Evidentemente su actividad antioxidante es beneficiosa tanto dentro de los alimentos como dentro del organismo ya que en ambos casos evitan la oxidación de otros componentes importantes del alimento o de tejidos y células del cuerpo humano. Por el contrario, su participación en reacciones de pardeamiento, enzimático o no, en productos vegetales tiene casi siempre connotaciones negativas. Los compuestos fenólicos pueden sufrir pardeamiento no enzimático, el cual se ha relacionado con la interacción entre éstos compuestos e iones metálicos como cobre e hierro, formando complejos metálicos (Cheng y Crisosto, 1997) o a través de reacciones de Maillard. En este sentido, algunos estudios han puesto de manifiesto que la auto-oxidación de los fenoles producida como consecuencia del daño provocado en los tejidos puede incrementar el contenido de H_2O_2 y favorecer de este modo la oxidación de los compuestos fenólicos por la POX (Takahama y Oniki, 2000).

En relación al pardeamiento enzimático, los principales agentes oxidantes de los fenoles dentro de los productos vegetales son las óxido-reductasas, polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POX) y lipoxigenasa (LOX), y los radicales libres. La LOX hasta el momento no ha sido relacionada directamente con el metabolismo de los compuestos fenólicos en la aceituna aunque si está claramente demostrada su implicación en la síntesis de compuestos volátiles (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2012) y la degradación oxidativa de clorofilas y carotenos que tiene lugar durante el procesado de la aceituna y que determinan el aroma y el color del AOV.

I.2.3. El metabolismo de los compuestos fenólicos: el papel de las enzimas óxido-reductasas

La composición fenólica de un fruto, determinada genéticamente y modulada por factores ambientales, se ve muy afectada por los procesos hidrolíticos y oxidativos que tienen lugar durante la conservación y el procesado del fruto.

De igual modo, aunque la composición fenólica del AOV depende en buena medida de la variedad de olivo, existen diversos factores como técnicas de cultivo, recolección, conservación y procesado de la aceituna que pueden modificarla (Artajo *et al.*, 2006a y b; Servilli *et al.*, 2004). El efecto de estos factores sobre el perfil fenólico del aceite parece estar estrechamente relacionado con la modificación del nivel de actividad de diferentes enzimas endógenas presentes en el fruto (García *et al.*, 2001; Servili *et al.*, 2007). Durante el proceso de obtención del AOV, por acción de β -glucosidasas presentes en la aceituna, los principales glucósidos fenólicos son hidrolizados para dar lugar a derivados parcialmente solubles en el aceite, como los mencionados FAAO, FDAO, FAAL y FDAL que, por posterior hidrólisis, química o mediada por esterasas, dan lugar a tirosol e hidroxitirosol. Es importante destacar que se ha aislado y purificado una proteína con actividad β -glucosidasa en aceituna (Romero-Segura *et al.*, 2009) que exhibe una potente actividad frente a la oleuropeína y otros glucósidos fenólicos del fruto y cuyos niveles de actividad a lo largo de la maduración de distintas variedades de aceituna guardan buena relación con la composición fenólica encontrada en los correspondientes aceites. Los estudios preliminares sobre las cinéticas de formación y degradación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV (Montedoro *et al.*, 2002) señalan la importancia no sólo de las enzimas implicadas en la formación de compuestos secoiridoideos, como la mencionada β -glucosidasa, sino también el importante papel que juegan las enzimas óxido-reductasas de la aceituna, POX y PPO, hasta el momento muy poco estudiadas, en la degradación de estos compuestos durante el procesado de la aceituna, restringiendo su incorporación al aceite. En relación con el papel de las enzimas óxido-reductasas, se ha puesto de manifiesto la relación inversa entre los niveles de PPO a lo largo de la maduración de la aceituna y los niveles de oleuropeína en los frutos

(Ortega-García *et al.*, 2008) y paralelamente se ha propuesto un modelo para explicar el pardeamiento enzimático en frutos de aceituna golpeados durante la recolección en el que también se atribuye un papel central a la PPO (Segovia-Bravo *et al.*, 2009). En el mismo sentido, es de destacar la importante carga de actividad POX que se ha identificado en la semilla de aceituna y que, según se deduce de experimentos tecnológicos en los que se incrementa el porcentaje de huesos durante la molturación del fruto, afecta negativamente al contenido final de compuestos fenólicos en los aceites (Luaces *et al.*, 2007).

En vista de todo lo anterior, las transformaciones de los principales glucósidos fenólicos en los derivados secoiridoideos, la evolución de éstos hasta hidroxitirosol y tirosol y la degradación mediada por las actividades óxido-reductasas, presumiblemente tendrían lugar a través del mecanismo recogido en la Figura 5.

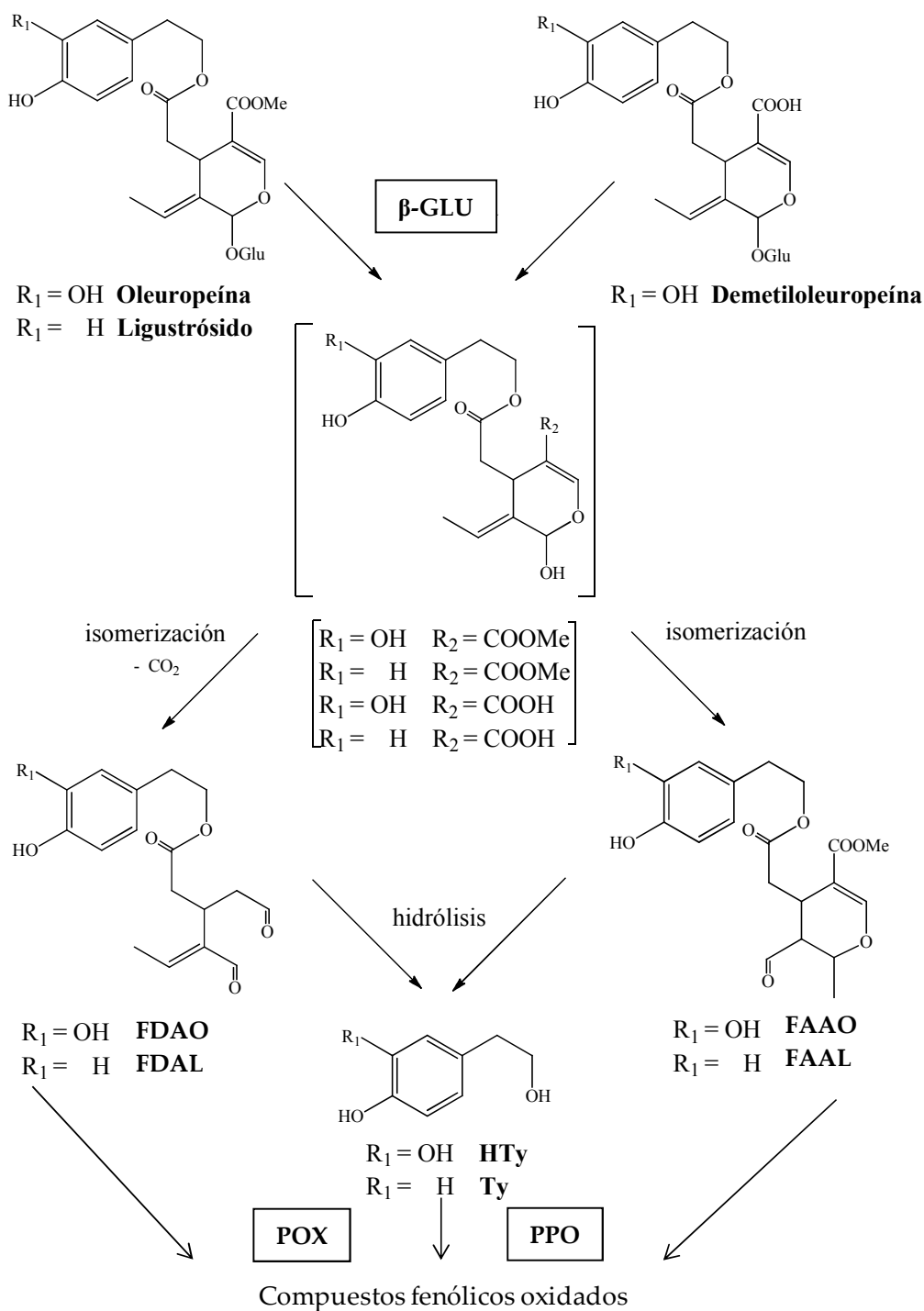


Figura 5. Mecanismo propuesto de formación y degradación de compuestos secoiridoideos en el AOV (modificado de Mateos *et al.*, 2002).

Las enzimas endógenas de la aceituna tienen un papel fundamental durante la molturación de los frutos y el batido de las pastas durante el proceso de obtención del AOV ya que degradan los compuestos fenólicos del aceite (Servili *et al.*, 2008). Además de los radicales libre, los principales agentes oxidativos de los fenoles en plantas son las enzimas óxido-reductasas POX y PPO como se ha comentado anteriormente. Además, la influencia de estas enzimas óxido-reductasas se corroboró, en base a estudios con atmósferas modificadas sobre las pastas que promovieron la reducción del contenido de *o*-difenoles en los aceites (García *et al.*, 2001). Estudios recientes han permitido establecer una correlación directa con el contenido final de los compuestos fenólicos y las actividades óxido-reductasas en función de la disponibilidad de O₂ y de la estabilidad térmica que presentan éstas al emplear diferentes temperaturas en la etapa de batido durante el proceso de obtención del AOV (Taticchi *et al.*, 2013).

La PPO es la principal enzima implicada en la oxidación de fenoles, tanto en procesos fisiológicos asociados a la maduración como en procesos inducidos por cualquier forma de manipulación del fruto que implique daño o rotura de tejidos (Pourcel, 2006). En la oxidación de fenoles por PPO hay dos tipos de reacciones implicadas: la primera consiste en la hidroxilación de monofenoles para formar *o*-difenoles (EC 1.14.18.1) y la segunda en la oxidación de *orto*- y *para*-difenoles hasta las quinonas correspondientes (EC 1.10.3.1) (García-Molina *et al.*, 2007) como se observa en la Figura 6. Posteriormente, una vez que se han formados las quinonas, éstas pueden reaccionar con proteínas o seguir reaccionando entre sí y formando polímeros (Spencer *et al.*, 1988).

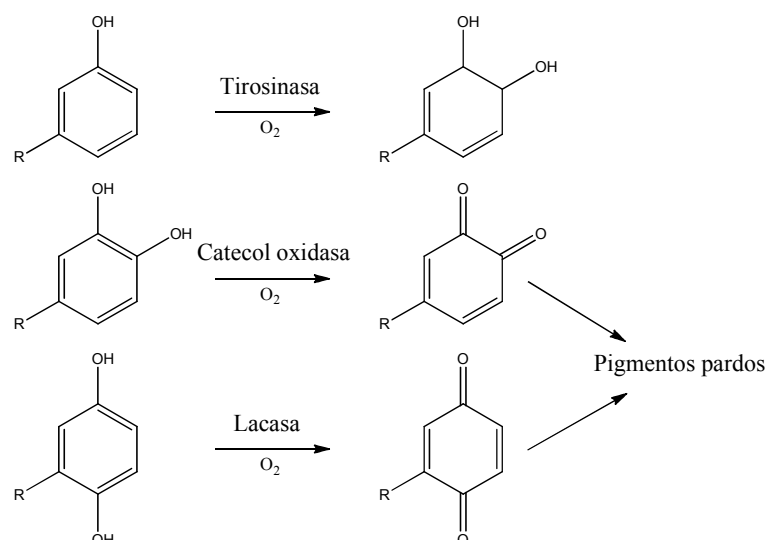


Figura 6. Esquema de las reacciones de oxidación producidas por la enzima PPO.

Numerosos estudios han demostrado que la PPO de aceituna exhibe principalmente la actividad difenolasa (catecol oxidasa). Estas reacciones de oxidación han sido estudiadas en varios sistemas modelo pero no se ha podido profundizar en la caracterización de PPO en plantas debido a la complejidad de las reacciones acopladas a las quinonas, que son productos primarios de oxidación muy inestables y que pueden reaccionar a su vez con otros compuestos, fenólicos o no (Falguera, 2010). Así, es conocido que algunos fenoles de plantas no son oxidados directamente por PPO pero sí por reacciones secundarias de ésta (Pourcel *et al.*, 2006).

La contribución de la POX a la oxidación de fenoles está limitada por la disponibilidad de H_2O_2 , cosustrato imprescindible de la reacción. Sin embargo, se ha demostrado que hay una contribución importante de la POX al pardeamiento enzimático iniciado por la PPO en productos vegetales, que se explicaría por el hecho de que las quinonas formadas por la PPO puedan ser sustrato de la POX (Cantos *et al.*, 2002) y lo que es más importante porque la propia PPO genera H_2O_2 en la oxidación de ciertos fenoles que serviría de cosustrato a la POX. En este sentido, diversos estudios, como los realizados en té y pera, demuestran que ciertas PPO de plantas generan H_2O_2 durante la oxidación de la catequina en

condiciones óptimas de pH (Jiang y Miles 1993; Richard-Forget y Gauillard, 1997), con lo cual estaríamos frente a un fenómeno de sinergia entre ambas óxido-reductasas.

3. LAS PROTEÍNAS PEROXIDASAS EN PLANTAS

Las peroxidasas (EC. 1.11.1.X) son glicoproteínas con distribución ubicua en la naturaleza. Están producidas por un gran número de microorganismos, animales y plantas y catalizan una amplia variedad de reacciones en presencias de peróxidos. Se distinguen dos grandes grupos: las hemo-peroxidasas y las no hemo-peroxidasas tal y como está descrito en la base de datos PeroxiBase creada por Passardi et al., (2007). Dentro del primer grupo se incluyen las peroxidasas de organismos no animales que contiene a su vez tres subgrupos: la Clase I, que comprende las peroxidasas de procariotas y peroxidasas intracelulares de mitocondrias y cloroplastos como las citocromo c peroxidasas y las ascorbato peroxidasas; la Clase II, donde se engloban las peroxidasas extracelulares de hongos como la manganeso peroxidasas y la lignina peroxidasas; y la Clase III, que comprende las peroxidasas de plantas superiores (Passardi, 2005). La Clase III incluye tanto peroxidasas solubles como asociadas a membranas que suelen ser proteínas de cadena simple altamente glicosiladas.

Las POX de plantas (EC. 1.11.1.7) son hemoproteínas que catalizan la oxidación dependiente de H_2O_2 de una amplia variedad de sustratos, entre los que destacan los compuestos fenólicos, como ya se ha mencionado con anterioridad. Además, las peroxidasas de tipo III pueden catalizar la reducción de H_2O_2 , captando electrones de otros compuestos tales como auxinas, metabolitos secundarios, precursores de lignina, etc. (Passardi, 2005).

Las POX de plantas son miembros de una familia multigénica. Debido a su gran número de isoformas están involucradas en un gran número de procesos fisiológicos del ciclo de vida de las plantas. Están presentes desde los primeros momentos de la vida de la planta hasta el final ya que son enzimas clave en el control del crecimiento, en la diferenciación y el desarrollo de la planta: intervienen en procesos de lignificación (Wakamatsu y Takahama, 1993), en la defensa frente a daños en los tejidos o frente a infecciones (Biles y Martyn, 1993), generan especies reactivas de oxígeno, polimerizan compuestos de la pared celular, regulan

los niveles de agua oxigenada (Passardi, 2005), e intervienen en la respuesta a estrés (Veitch, 2004).

Las POX de Clase III se localizan en las vacuolas y en la pared celular, son altamente resistentes a la temperatura (Almagro, 2009) y tienen una elevada capacidad de regeneración tras una inactivación térmica (Vámos-Vigyázó, 1981). Se han aislado tanto isoformas aniónicas como catiónicas de POX en frutas y hortalizas cuyos monómeros tienen un peso molecular que oscila entre 18 y 67 kDa. Las formas catalíticamente activas son muy variables, se han descrito desde formas monoméricas hasta tetraméricas, como es el caso de la POX de brócoli (Duarte-Vázquez, 2007) y la de vainilla (Márquez, 2008). Las múltiples formas de POX descritas y caracterizadas en plantas se diferencian en la función, el peso molecular, la estabilidad térmica, pH óptimo y la especificidad de sustrato (Sergio *et al.*, 2007).

Las POX tienen gran utilidad para el desarrollo de inmunoensayos, en la construcción de biosensores, en síntesis orgánica estereoespecífica (Day, 1990; Crowther, 2001; Colonna, 1999), como desintoxicadoras de suelos, intervienen en procesos de biorremediación, se emplean como decolorantes en la industria papelera, pueden utilizarse para determinar glucosa, alcoholes, glutamato, ácido úrico, colesterol, lactosa, entre otras (Hamid, 2009). Sin embargo, con frecuencia a las POX se le atribuyen connotaciones negativas dentro de la Tecnología de Alimentos ya que contribuyen al deterioro del flavor, color, textura y valor nutricional de los productos vegetales y de los alimentos producidos a partir de ellos (Fils, Sauvage y Nicolas, 1985).

La POX de plantas más ampliamente estudiada es la POX de rábano. Concretamente la mejor caracterizada es la isoenzima C de la peroxidasa de raíz de rábano, HRP C, que está constituida por un polipéptido de 308 residuos aminoácidos y contiene dos centros metálicos diferentes, Fe(III) (integrado en el grupo hemo) y dos átomos de calcio, ambos necesarios para la estructura y la funcionalidad de la enzima. El grupo hemo está anclado en la enzima a través de la His170 y los dos átomos de calcio se encuentran unidos por puentes de hidrógeno al plano del grupo hemo en las posiciones distal y proximal (Veitch *et al.*, 2004). Como se observa en la Figura 7, la estructura de la enzima se caracteriza por hélices- α a través de las

que se visualizan pequeñas regiones de láminas- β . También se pueden observar los dominios distal y proximal entre los que se localiza el grupo hemo, así como los átomos de calcio.

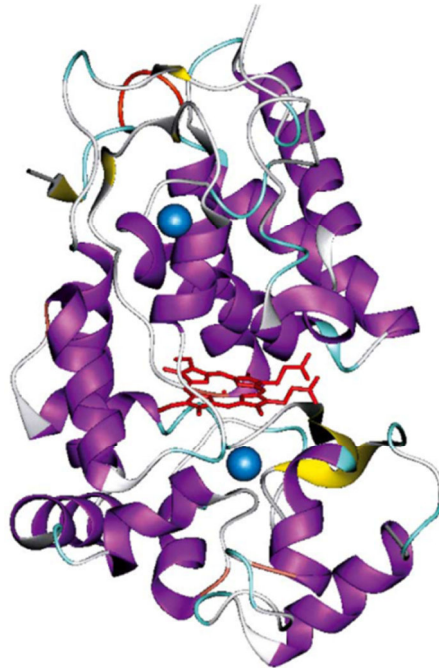


Figura 7. Representación tridimensional de la estructura cristalina cuaternaria de HRP C caracterizada mediante difracción de rayos X por Welinder y Gajhede (1993).

El mecanismo de actuación de la HRP C y otras peroxidasas en relación a su capacidad para oxidar compuestos fenólicos, se muestra en la Figura X.

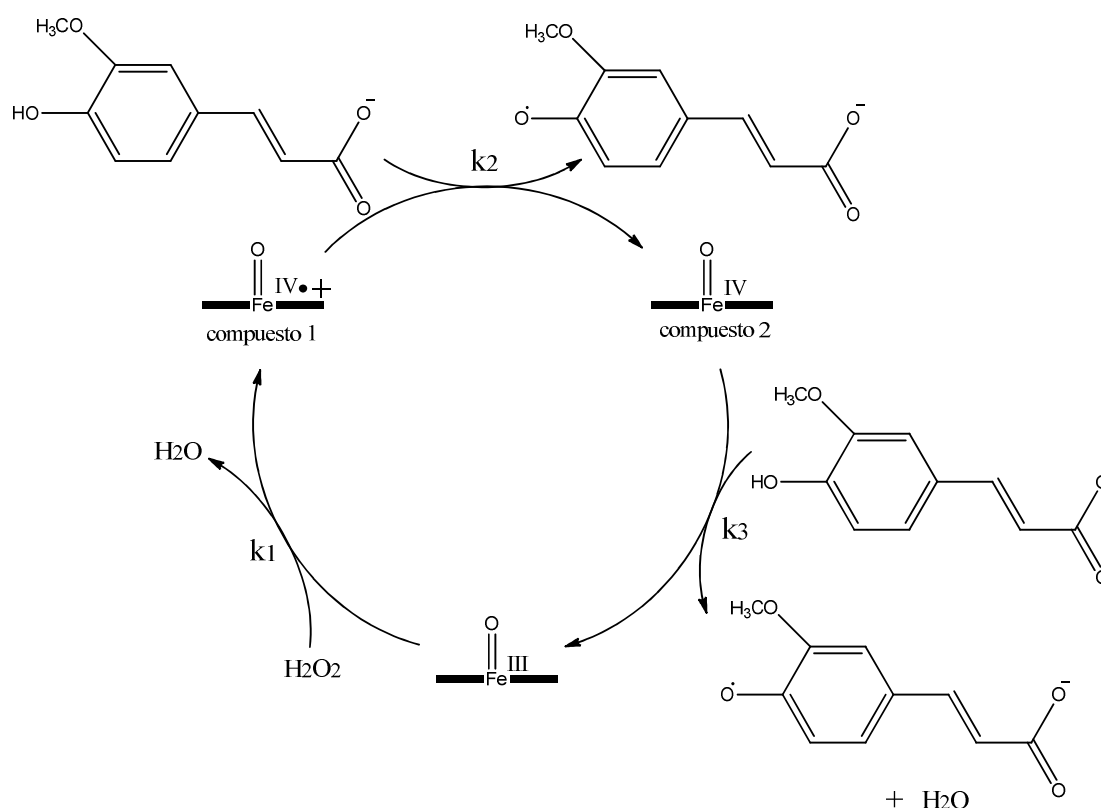


Figura 8. Ciclo catalítico de HRP C para la oxidación del ácido ferúlico. Las constantes k_1 , k_2 y k_3 representan las velocidades de formación del compuesto 1, la reducción del compuesto 1 y la reducción del compuesto 2.

El primer paso es la reacción entre H_2O_2 y el Fe(III) del estado inicial de la enzima, y genera el compuesto 1, un intermedio con alto grado de oxidación que posee un centro oxoferril Fe(IV) y un catión radical de porfirina. Éste se comporta como un potente oxidante capaz de oxidar un sustrato (ácido ferúlico en el ejemplo de la Figura 8) liberando un radical y transformándose en el compuesto 2, que porta un centro Fe(IV) que de nuevo produce la oxidación de otra molécula de sustrato liberando al medio un segundo radical y restaurando el estado inicial de la enzima para comenzar un nuevo ciclo catalítico. La salida de dos radicales por cada ciclo puede producir un complejo perfil de productos de reacción. La mayoría de los productos formados son dímeros, los cuales reaccionan a su vez con un radical secundario en una reacción de acoplamiento (Aizawa y Kunugi, 1983). Además de los dímeros, también se podrían formar trímeros y oligómeros mayores, quinonas e

hidroquinonas derivadas del fenol en cuestión que podrían comportarse como nuevos sustratos susceptibles de oxidación.

A pesar de que se presupone que la POX de aceituna pueda jugar un papel clave en la oxidación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV existen muy pocos datos acerca de la actividad de esta enzima en aceituna. En los primeros estudios realizados se detectó actividad POX en la pulpa de frutos en el estadio de envero (cambio de color) detectándose un incremento significativo de estos niveles a lo largo de la maduración (Garrido-Fernández et al., 1997). Posteriormente se ha descrito la purificación parcial de proteínas con actividad POX presentes en la pulpa de frutos maduros de la variedad Douro (Saraiva et al., 2007) y de la variedad Koroneiki (Tzika et al., 2009). En el primero de ellos se aislaron cuatro isoformas aniónicas y cuatro catiónicas, mientras que en la variedad Koroneiki se obtuvieron sólo dos isoformas. Más recientemente, en frutos de la variedad Hojiblanca, se ha descrito la posible implicación de la POX en la degradación de clorofilas a través de un mecanismo aún no completamente dilucidado (Vergara-Domínguez et al., 2013). En cualquier caso, ninguno de los estudios mencionados se han centrado en analizar las reacciones de oxidación de fenoles naturales del olivo catalizadas por POX.

En resumen, los datos hasta ahora obtenidos acerca de las rutas bioquímicas implicadas en la calidad organoléptica, nutricional y tecnológica del AOV establecen una relación directa entre el contenido de los compuestos responsables de la calidad y la carga enzimática presente en los frutos. Pero es evidente que un conocimiento más profundo del modo de actuación de estas enzimas y de la regulación de los genes que las codifican, abriría posibilidades inmediatas de modulación de la calidad del AOV a través de la modificación de la tecnología de procesado a medio plazo mediante programas de mejora varietal y, a más largo plazo, si se revisa la actual normativa que regula el proceso de obtención del AOV, a través de actuaciones de tipo biotecnológico.

Por ello, esta Tesis Doctoral se ha centrado en los objetivos que se presentan a continuación.

OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca en un proyecto de Tesis Doctoral cuyo objetivo global es el estudio de los factores bioquímicos implicados en la degradación oxidativa de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen. Dicho objetivo global se articula en dos objetivos concretos:

1. Contribución de las actividades oxido-reductasas, POX y PPO, de aceituna a la composición fenólica del aceite de oliva. Influencia de factores tecnológicos.
2. Aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de proteínas con actividad POX en aceituna.

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1. Frutos

Para el desarrollo de la mayor parte de este trabajo se han utilizado olivos (*Olea europaea* L.) de las variedades Picual y Arbequina. Los frutos de aceituna de dichas variedades se cosecharon en el olivar experimental del Instituto de la Grasa (CSIC), en Bellavista (Sevilla). En ambos casos los árboles fueron cultivados en régimen de regadío, con regado y fertilizado por goteo desde el momento de la floración hasta la maduración completa del fruto (abril – enero). Así mismo, en algunos ensayos se emplearon frutos de variedades pertenecientes a la Colección Nuclear de 36 genotipos del Banco Mundial de Olivo del IFAPA/UCO (Córdoba) previamente definida en el proyecto Oleagen.

Para determinar con exactitud el estadio de desarrollo y maduración de los frutos, los árboles fueron marcados en la semana de floración y la edad de las aceitunas se determinó como semanas después de la floración (SDF). Paralelamente se utilizó el índice de maduración (IM), que en función del color de la piel y el mesocarpo de las aceitunas (Hermoso *et al.*, 1991), permite establecer las siguientes categorías:

- 0, aceitunas con epidermis verde intenso.
- 1, aceitunas con epidermis amarilla o verde amarillento.
- 2, aceitunas con epidermis amarillenta, con puntos o áreas rojizas.
- 3, aceitunas con epidermis rojiza o violeta claro.
- 4, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo completamente blanco.
- 5, aceitunas con epidermis negra y la mitad del mesocarpo violeta.
- 6, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo violeta casi en su totalidad.
- 7, aceitunas con epidermis negra y mesocarpo completamente negro.



Figura 9. Aspecto y estadios de las aceitunas de la variedad Picual utilizadas en este trabajo.

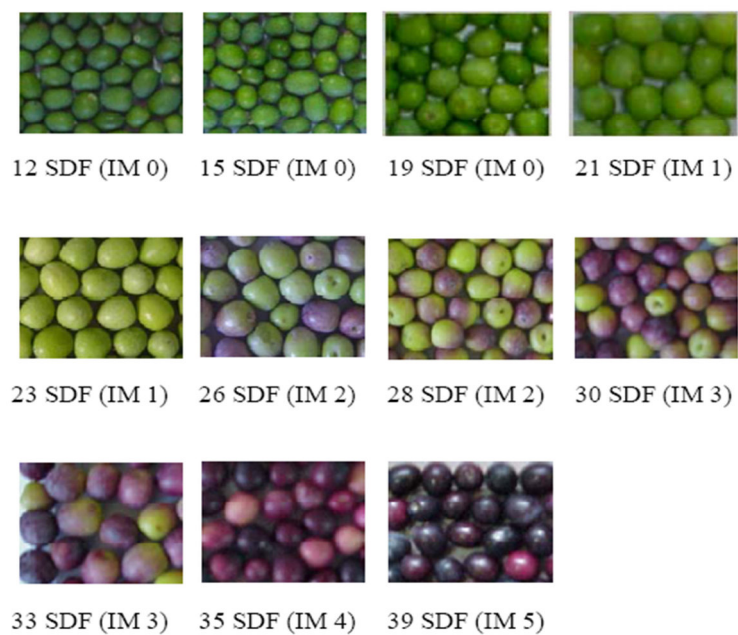


Figura 10. Aspecto y estadios de las aceitunas de la variedad Arbequina utilizadas en este trabajo.

Los estudios varietales se llevaron a cabo con frutos de las variedades Picual, Arbequina, Menya, Piñonera y Shengeh recolectadas con índices de maduración IM= 2-5. Arbequina y Picual fueron estudiadas por ser las que tienen mayor importancia económica en nuestro país. Menya, Piñonera y Shengeh, procedentes de la Colección Nuclear 36, fueron elegidas por poseer un alto, intermedio y bajo contenido en polifenoles.

Para los ensayos tecnológicos de modulación de carga enzimática de POX y PPO se emplearon aceitunas de las variedades Arbequina y Picual tanto en estadio con IM = 1, como IM = 5.

III.1.2. Aceites

Los aceites obtenidos en los distintos ensayos fueron extraídos de frutos de las variedades anteriormente mencionadas utilizando el sistema Abencor (Comercial Abengoa, S.A., Sevilla, España) que simula el proceso industrial de obtención de AOV a escala de laboratorio (Martínez *et al.*, 1975). La molienda de la aceituna se llevó a cabo en un molino de martillo de acero inoxidable a 3.000 rpm y equipado con un tamiz de 5 mm. La pasta resultante se sometió inmediatamente al proceso de batido en contenedores de acero inoxidable de 1,2 L a 50 rpm durante 30 min y una temperatura de 30 °C. Terminada la etapa de batido, las pastas fueron centrifugadas en la centrífuga abierta del sistema a 3500 rpm durante 12 min. Tras la centrifugación y posterior decantación, el aceite obtenido se filtró a través de papel y fue inmediatamente almacenado bajo corriente de nitrógeno a -20 °C, para ser utilizado posteriormente para las correspondientes determinaciones analíticas.

III.1.2.1. Ensayos tecnológicos

Para estudiar los factores limitantes que determinan el perfil fenólico del AOV se llevaron a cabo una serie de ensayos centrados en la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos mediante la actuación de las enzimas POX y PPO. Para ello durante la molturación

y/o batido se añadieron tanto enzimas como inhibidores y co-sustratos de dichas reacciones oxidativas. En todos los ensayos se utilizaron lotes de 500-1.000g de aceitunas, y las adiciones se realizaron en la tolva del molino, de modo que su efecto fuera inmediato durante la trituración del tejido; o bien a diferentes tiempos de batido. A continuación se describen de forma breve los experimentos realizados.

- Adición de POX comercial de rábano. Se adicionaron 400 mg de la enzima POX comercial de rábano sobre lotes de 1 kg de aceitunas Picual (IM =1) y sobre las correspondientes pastas en el tiempo de batido $t = 15$ min.
- Adición de semillas de Arbequina como fuente de POX. Se añadieron cantidades variables de semilla (22-26 g) para incrementar la carga enzimática de POX un 100% respecto a los lotes control tanto en Picual como en Arbequina.
- Adición de H_2O_2 . Para incrementar los niveles de actividad POX en lotes de 1 kg de frutos de Picual en dos estadios de maduración diferentes (IM = 1 y 5) se adicionaron tres dosis distintas de este cofactor en la etapa de molienda: 100, 200 y 500 $\mu L H_2O_2$.
- Adición de NaN_3 . Para disminuir los niveles de actividad POX en lotes de 1 kg de frutos de Picual, en dos estadios de maduración diferentes (IM = 1 y 5), se adicionaron tres dosis distintas de este inhibidor de POX en la etapa de molienda: 66, 132 y 264 mg de NaN_3 .
- Adición de polvos acetónicos de pulpa de aceituna como fuente de PPO. Se llevaron a cabo adiciones de polvos acetónicos de mesocarpo de aceituna sobre lotes de 1 kg de Picual con IM = 5, incrementando los niveles de actividad final de PPO en la molturación un 30% y un 100% respecto al control.
- Adición de tropolona. Para disminuir los niveles de actividad PPO en lotes de 1.000 kg de frutos de Picual I = 1 se adicionaron cuatro dosis diferentes de dicho inhibidor de PPO en el molino: 18 – 480 mg. Además, la dosis más alta fue añadida también a los tiempos de batido $t = 0$ y $t = 15$ minutos.

Además de los ensayos tecnológicos en los que se modularon las actividades POX y PPO, se llevaron a cabo otros ensayos en los que también se dilucidó el papel que juegan

ambas enzimas oxidativas mediante la modificación de la temperatura de batido o la adición de antioxidantes.

- Comparación del perfil fenólico de frutos de la variedad Gordal y los frutos partenocárpicos, conocidos como zofairones, de la misma variedad.
- Adición de semillas a los zofairones de Gordal. Incrementando la actividad POX un 100% respecto al lote control.
- Ensayo de conservación de Arbequina en el tiempo. Se compararon las actividades enzimáticas y el contenido de fenoles, tanto de frutos como de aceites, en aceitunas frescas (recién recolectadas del árbol) y almacenadas durante un mes en cámaras con la temperatura controlada a 4 y 25 °C.
- Modificación de la temperatura de batido: 15 y 45 °C.
- Adición de lipoxigenasa de soja comercial sobre lotes de Arbequina y Picual IM = 1. Se incrementó la actividad LOX 10.000 U.
- Adición de metabisulfito sódico. Fue añadido sobre frutos de Picual IM = 1 en la tolva del molino en diferentes dosis: 500, 1000, 2000 ppm (3 g/kg aceituna); y sobre Arbequina IM = 1 únicamente la dosis más alta.
- Adición de metabisulfito sódico + ácido cítrico (3 g/kg aceituna de MB y 6 g/kg aceituna de ácido cítrico). Esta adición conjunta se realizó sobre lotes de Arbequina y Picual con IM = 1 y 5.
- Adición de ácido ascórbico (3 g/kg aceituna).
- Adición de ácido oxálico (680 mg/kg aceituna).
- Adición de ácido gálico (360 mg/kg aceituna).

III.2. AISLAMIENTO Y MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

III.2.1. Obtención del extracto crudo a partir de polvo acetónico

Aunque se evaluaron los niveles de actividad POX y PPO de pulpa y semilla frescas de aceituna la mayor parte de los ensayos de actividad se realizaron con extractos enzimáticos obtenidos a partir de polvos acetónicos de ambos tejidos. El polvo acetónico se preparó triturando pulpa o semilla fresca de frutos recién cosechados con acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una relación de 10 mL de acetona por gramo de pulpa o de semilla. El extracto del tejido vegetal en acetona se filtró a vacío y, tras varios lavados con acetona y éter a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo un polvo acetónico fino que se secó y conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

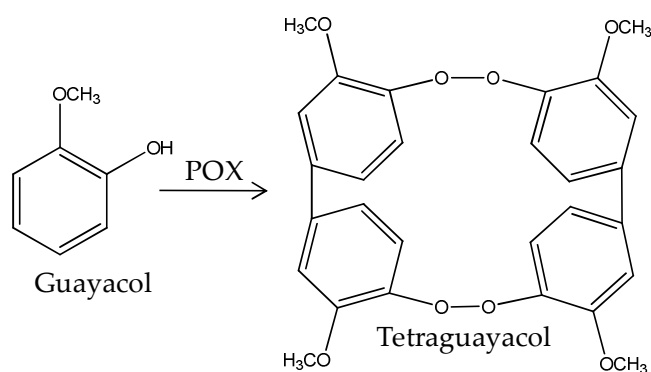
III.2.2. Actividad peroxidasa

III.2.2.1. Aislamiento de proteínas con actividad peroxidasa en semilla y pulpa de aceituna

El tampón empleado en la extracción de proteínas con actividad POX fue tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,7, Tritón X-100 0,1 % (p/v), AEDT 1 mM, PMSF 0,1 mM, benzamidina 0,1 mM, ácido α -aminocaproico 5 mM (tampón A). Para el aislamiento de actividad POX a partir de semilla fresca o congelada se partió de 0,5 g de semilla a los que se le añadieron 2,5 mL de tampón A homogeneizándose la mezcla con Ultra-Turrax con 5 pulsos de 1 minuto cada uno. Para el aislamiento a partir de polvo acetónico de ambos tejidos, pulpa y semilla, se partió de 0,25 g de polvo acetónico a los que se le añadieron 10 mL de tampón de extracción y se homogeneizó con Ultra-Turrax con 3 pulsos de 1 minuto. Posteriormente el extracto se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante, filtrado a través de papel Miracloth, constituyó el extracto crudo. Todo el proceso se llevó a cabo en frío a una temperatura de $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.2.2.2. Medida espectrofotométrica de la actividad peroxidasa

El método espectrofotométrico utilizado para determinar actividad POX se basó en la medida del incremento de absorbancia de la mezcla de reacción a 420 nm, longitud de onda a la que absorbe el tetraguayacol que se forma por la oxidación del guayacol en presencia de enzimas con actividad POX. El medio de reacción contenía tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 2 mM H₂O₂, 5,5 mM guayacol y la cantidad apropiada de extracto enzimático (5-20 µL) en un volumen final de 1,5 mL. Esta mezcla fue incubada directamente en la cubeta durante 2 min, realizándose en paralelo la incubación de un blanco de reacción con extracto enzimático inactivado térmicamente (inactivación por calentamiento del extracto enzimático a 100 °C durante 1 h) y otro con extracto activo en ausencia de H₂O₂. Una unidad de actividad POX (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de guayacol por min. La actividad POX se cuantifica gracias al coeficiente de extinción molar del tetraguayacol en el medio de reacción empleado que es 26.600 M⁻¹·cm⁻¹ (Luaces *et al.*, 2007).



En algunos ensayos las medidas de actividad POX se llevaron a cabo con el sustrato colorimétrico ABTS, cuantificándose en este caso el incremento de absorbancia a 414 nm. La reacción tuvo lugar a pH 4,25 y el coeficiente de extinción molar empleado en los cálculos de actividad fue 31.100 M⁻¹·cm⁻¹.

III.2.2.3. Medida de la actividad peroxidasa por HPLC

En este método de medida de actividad POX se sustituyó el sustrato colorimétrico guayacol por posibles sustratos naturales de la enzima en aceituna: compuestos fenólicos presentes en el fruto y compuestos fenólicos característicos del AOV, obtenidos según se detalla en el apartado III.5.1.-III.5.4.

Medio de reacción: En la reacción de POX con fenoles de aceite se pusieron en contacto 90 μ L de extracto fenólico de AOV concentrado en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 2 mM H₂O₂, y 2-40 μ L de extracto enzimático (EC, POX aniónica de semilla de aceituna, POX catiónica de semilla o POX comercial de rábano) en un volumen final de 100 μ L. Los tiempos de incubación fueron 2, 5, 10, 20 y 30 min. Para la reacción de POX de polvo acetónico de semilla con fenoles de fruto se pusieron en contacto 90 μ L de extracto fenólico en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 2 mM H₂O₂ y 2-40 μ L de extracto enzimático (EC, POX an o POX cat de semilla o POX comercial de rábano) en un volumen final de 100 μ L. Los tiempos de incubación fueron 2, 5, 10, 20 y 30 min. En ambos casos se hicieron blancos de las reacciones empleando enzima inactivada térmicamente además de blancos en los que se empleó extracto activo en ausencia de H₂O₂. La degradación oxidativa causada por la actividad POX sobre los distintos compuestos fenólicos se cuantificó mediante el análisis HPLC que se describe en el apartado III.5.5.

III.2.3. Actividad polifenol oxidasa

III.2.3.1. Extracción de proteínas con actividad polifenol oxidasa en semilla y pulpa de aceituna

EL tampón empleado en la extracción de proteínas con actividad PPO fue tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,7, Tritón X-100 0,1 % (p/v), AEDT 1 mM, PMSF 0,1 mM, benzamidina 0,1 mM, ácido α -aminocaproico 5 mM, SDS 1mM (Tampón B).

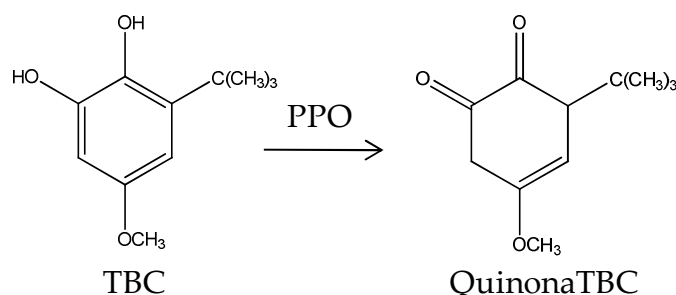
Para el aislamiento de la actividad enzimática PPO a partir de polvo acetónico de pulpa y semilla se partió de 0,25 g de dicho material al que se le añadieron 10 mL de tampón de extracción. La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax con 3 pulsos de 1 minuto cada uno y posteriormente se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante, filtrado a través de Miracloth, constituyó el extracto crudo.

Para la medida de PPO frente a los glucósidos fenólicos característicos del fruto, fue necesario realizar una purificación parcial de esta actividad enzimática debido a la interferencia que producía la presencia de actividad β -glucosidasa en el polvo acetónico de pulpa. Para ello, una vez que se obtuvo el extracto crudo, éste se fraccionó mediante precipitación con sulfato amónico, empleándose como extracto enzimático el precipitado proteico obtenido entre el 30-65% de saturación de esta sal que está prácticamente libre de actividad β -glucosidasa.

III.2.3.2. Medida espectrofotométrica de la actividad polifenol oxidasa

La actividad se cuantificó midiendo la absorbancia a 400 nm, longitud de onda a la que absorbe el compuesto formado por la oxidación del *tert*-butilcatecol (TBC) (Sigma) en presencia de proteínas con actividad PPO.

Medio de reacción: La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, SDS 1mM, 7mM TBC con 2-10 μ L de extracto enzimático en un volumen final de 1,5 mL. Esta mezcla se incubó directamente en la cubeta durante 1 min en paralelo a la incubación con extracto enzimático inactivado térmicamente. Una unidad de PPO se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de TBC por min. El coeficiente de extinción molar empleado para la quinona formada por oxidación del TBC es 1.200 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (García-Molina et al., 2007).



III.2.3.3. Medida de la actividad polifenol oxidasa por HPLC

En esta medida de actividad PPO se sustituyó el sustrato colorimétrico TBC por posibles sustratos naturales de la enzima en aceituna: compuestos fenólicos presentes en el fruto y compuestos fenólicos característicos del AOV, obtenidos según se detalla en el apartado III.5.1-III.5.4.

Medio de reacción: En la reacción de PPO con fenoles de aceite se pusieron en contacto 120 μL de extracto fenólico de AOV concentrado en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 1mM SDS, y 25 μL de extracto enzimático de polvo acetónico de pulpa de aceituna ó 0,5 μL de una disolución de PPO comercial de champiñón (Sigma) 2,5 mg/mL en un volumen final de 1 mL. Los tiempos de incubación fueron 2, 5, 10, 20, 30 y 40 min. Para la reacción de PPO de polvo acetónico de pulpa con fenoles de fruto se pusieron en contacto 90 μL de extracto fenólico de fruto en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 5,7 μL de 1 mM de SDS, y 2 μL de extracto de PPO parcialmente purificado. En ambos casos se hicieron blancos de las reacciones empleando enzima inactivada térmicamente y la enzima activa en presencia de un inhibidor específico de la PPO, la tropolona (0,2 mM). Para estudiar la reacción de PPO comercial de rábano (5 mg/ml) con los fenoles de la aceituna se hizo reaccionar 1 ml de una disolución 6,5 mM de oleuropeína en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,5, 1mM SDS y 1 μL de la enzima. En la reacción de PPO de polvo acetónico de pulpa con los glucósidos de fruto oleuropeína y verbascósido, se pusieron en contacto 1 ml de una disolución de oleuropeína 1,2 mM y otra de verbascósido 1,2 mM en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 1 mM SDS, con 50 μL de PPO de pulpa parcialmente purificada.

III.2.4. Actividad β -glucosidasa

III.2.4.1. Extracción de proteínas con actividad β -glucosidasa de pulpa y semilla de aceituna

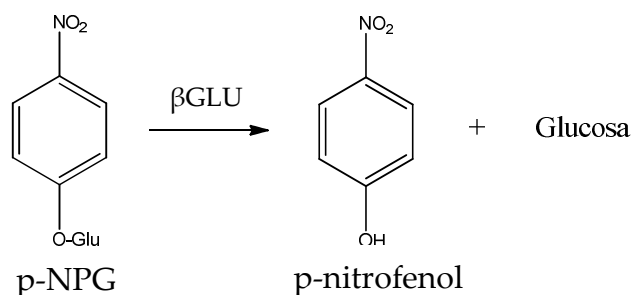
El tampón empleado en la extracción de proteínas con actividad β -glucosidasa fue tampón borato sódico 0,1 M pH 9,0, conteniendo ácido etilendiamino tetraacético (AEDT) 5 mM, fluoruro sulfonil de fenilmetano (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 0,25 % (p/v) (tampón C). Esta actividad enzimática se aisló tanto de pulpa como de semilla de frutos frescos. Para la obtención del extracto crudo de β -glucosidasa de pulpa se partió de 2 g de este tejido y se añadieron 0,7 g de polivinil polipirrolidona (PVPP) (5 % p/v) y 14 mL del tampón C. La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a máxima potencia en cinco pulsos de 1 min. El homogeneizado obtenido se filtró a vacío a través de papel Miracloth y el residuo se lavó 2 veces con 4 mL de tampón de extracción. El extracto filtrado se centrifugó a 27.000 x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido en esta primera centrifugación, se filtró de nuevo a través de Miracloth y se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C para eliminar la grasa remanente. El sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación constituyó el extracto crudo de β -glucosidasa de pulpa. Cuando se partió de semilla, a 0,5 g de tejido se les añadieron 0,18 g de PVPP (7 % p/v) y 2,5 ml de tampón C de extracción. La mezcla se homogeneizó en Ultra-Turrax a máxima potencia dando cinco pulsos de 1 min y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo de β -glucosidasa de semilla. Todo el proceso se realizó en frío a 0-4 °C.

III.2.4.2. Medida espectrofotométrica de la actividad β -glucosidasa

La medida de actividad β -glucosidasa se realizó espectrofotométricamente a partir del método descrito por Briante *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. La actividad se cuantificó midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción a 405 nm, longitud de onda a la que absorbe el *p*-nitrofenol formado como consecuencia de la hidrólisis del sustrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) por acción de la enzima β -glucosidasa.

El medio de reacción habitual contenía 1,5 mL de solución de 15 mM pNPG y la cantidad apropiada de extracto enzimático (5-100 μ L). Para la medida de actividad β -glucosidasa en extractos de pulpa y semilla fresca de aceituna y en extractos de polvo acetónico de pulpa se utilizó tampón fosfato sódico 50 mM pH 5,5. La mezcla de reacción fue incubada directamente en la cubeta a 45 $^{\circ}$ C durante 1 min. En todos los ensayos enzimáticos realizados se llevó a cabo en paralelo un blanco de la reacción en el que se añadía extracto enzimático inactivado térmicamente. Una unidad de actividad (U) β -glucosidasa se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de p-NPG por min.

Se calculó el coeficiente de extinción molar (ϵ) para el *p*-nitrofenol en el medio de reacción empleado, determinándose un $\epsilon = 552,8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en tampón fosfato sódico 50 mM pH 5,5.



III.3. PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE SEMILLA

La purificación de la POX de semilla de aceituna se realizó a partir de polvos acetónicos de semilla de Arbequina en el estadio de maduración correspondiente a 38 semanas después de la floración.

III.3.1. Obtención del extracto crudo

Para la obtención del extracto crudo (EC) se partió de polvo acetónico de semilla procedente de semillas frescas de frutos de Arbequina recién recolectados que fueron

procesadas según la metodología descrita en el apartado III.2.1. Para extraer las enzimas con actividad POX, fue necesario homogeneizar con Ultra-Turrax 3 gramos de polvo acetónico con 120 mL de tampón A (apartado III.2.2.1.), a la máxima potencia con tres pulsos de un minuto cada uno. La mezcla obtenida se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min manteniendo la temperatura a 4 °C. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo.

III.3.2. Precipitación con sulfato amónico

Las proteínas contenidas en el EC fueron precipitadas añadiendo sulfato amónico lentamente, con agitación suave y a baja temperatura (4 °C), hasta alcanzarse un 30% de saturación de la sal. Tras una hora de agitación se centrifugó la mezcla en las mismas condiciones de obtención del extracto crudo (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Se procedió de la misma manera con el sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación saturando, en este caso, al 80% de sulfato amónico, concentración de sal que permitió precipitar todas las proteínas presentes en el sobrenadante del 30%. De nuevo se agitó lentamente en frío y se centrifugó. En esta ocasión, el sobrenadante del 80% de sulfato amónico se descartó y el precipitado proteico 30-80% se resuspendió en 2,5 mL de tampón HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) 50 mM, pH 7,2.

III.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico

Una vez resuspendido el precipitado proteico del 30-80% de sulfato amónico, fue necesario retirar la sal del medio, utilizándose una columna PD-10 (Sephadex G-25), previamente acondicionada con tampón HEPES, que será el tampón utilizado en las cromatografías de intercambio iónico usadas en los pasos siguientes. El extracto obtenido de la columna PD-10 se sometió a una primera cromatografía de intercambio, en este caso, aniónico, tras ser concentrado por ultrafiltración con un concentrador de proteínas con membrana de 30 kDa (Vivaspin 30 kDa MWCO, GE Healthcare) centrifugando a 3.100 rpm manteniendo la temperatura a 4 °C. Se empleó para ello una columna HiTrap Q HP (1,6 x 2,5

cm) equilibrada con tampón HEPES 50 mM, pH 7,2 (Fase móvil A). Una vez lavada la columna, se llevó a cabo la elución de las proteínas retenidas en la fase estacionaria con tampón HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 1,5 M (Fase móvil B) mediante un gradiente lineal tal y como se indica en la Tabla 1. El flujo empleado fue de 1 mL/min y las fracciones recogidas de 1 mL. La elución de las proteínas se siguió mediante la medida de absorbancia a 280 nm y la actividad POX se midió según el método espectrofotométrico descrito en el apartado *III.2.2.2*.

Tabla 1. Gradiente de la fase móvil B empleada en la cromatografía de intercambio aniónico mediante FPLC.

Tiempo (min)	% B
0-15	0
15-40	0-100
40-50	100
50-51	100-0
51-55	0

III.3.4. Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción no retenida en la cromatografía aniónica fue concentrada con un concentrador de proteínas con membrana de 30 kDa (Vivaspin 30 kDa MWCO, GE Healthcare) centrifugando a 3.100 rpm a 4 °C y acondicionada para una segunda cromatografía de intercambio, en este caso, catiónico. Se empleó para ello una columna HiTrap CM FF (1,6 x 2,5 cm) equilibrada con tampón HEPES 50 mM, pH 7,2 (Fase móvil A). La elución de las proteínas retenidas en la fase estacionaria se llevó a cabo empleando tampón HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 1,5 M (Fase móvil B) mediante un gradiente lineal tal y como se indica en la Tabla 2. El flujo empleado en este caso fue de 2 mL/min y las fracciones recogidas de 1 mL. Del mismo modo que en la cromatografía de intercambio aniónico, la elución de las proteínas se midió a 280 nm y la actividad POX según el método espectrofotométrico descrito en el apartado *III.2.2.2*.

Tabla 2. Gradiente de la fase móvil B empleada en la cromatografía de intercambio aniónico mediante FPLC.

Tiempo (min)	% B
0-10	0
10-30	0-100
30-35	100
35-36	100-0
36-40	0

III.3.4.1. Determinación del peso molecular de las proteínas

III.3.4.1.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se desarrolló de acuerdo con el método de Laemmli (1970) en el sistema de electroforesis BioRad. Las concentraciones de acrilamida de los geles de separación y de compactación fueron respectivamente de 10 y 4 % (p/v). El gel separador se preparó mezclando 5 ml de una disolución de acrilamida: bisacrilamida (37,5:1) 30 % (p/v), 3,75 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 150 μ l de SDS 10 % (p/v), 75 μ l de persulfato amónico (APS) 10 % (p/v) y 10 μ l de N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano (TEMED), completando con agua destilada hasta un volumen final de 15 ml. Posteriormente, una vez polimerizado el gel separador, se preparó el gel compactador mezclando 670 μ l de una disolución de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) 30 % (p/v), 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50 μ l de SDS 10 % (p/v), 25 μ l de APS 10 % (p/v) y 10 μ l de TEMED, completando con agua destilada hasta un volumen final de 5 ml.

Las muestras de proteínas (10 μ g) se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de desnaturalización 6X (Tris-HCl 0,35 M pH 6,8, SDS al 10 % (p/v), glicerol al 30 % (v/v), ditiotreitól (DTT) 0,6 M y azul de bromofenol 0,175 mM), completando con agua destilada hasta un volumen final no superior de 24 μ l. y se desnaturalizaron a 100 °C durante 2 min. El tampón empleado en la electroforesis vertical estaba compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS 0,1 % (p/v), y la intensidad aplicada fue de 10 mA/placa durante

el gel concentrador y de 20 mA/placa una vez que el frente hubo sobrepasado el gel de compactación. Además de las muestras, con el fin de determinar el peso molecular de las proteínas separadas en el gel, en el mismo gel se cargó el marcador patrón de proteínas de masa molecular conocida “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder”, suministrado por Thermo Scientific.

III.3.4.1.2. Tinción de los geles

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a la tinción del gel para visualizar las proteínas separadas. Para ello se empleó una disolución de tinción constituida por azul Coomassie R-250 al 0,1 % (p/v), metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 7 % (v/v). Se cubrió el gel con esta disolución durante 20 min con agitación suave y posteriormente se destiñó sumergiéndolo en disolución de desteñido (metanol al 5 % (v/v) y ácido acético al 7 % (v/v)) lavando con ésta hasta la total decoloración del gel.

La determinación de las masas moleculares de las isoformas de POX purificadas se realizó de manera independiente para cada uno de los geles a partir de la representación gráfica del logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas del marcador de peso molecular con respecto a sus movilidades electroforéticas, tomando como referencia el frente de electroforesis. La recta de calibrado con los pesos moleculares de las proteínas patrón se muestra en la Figura 11.

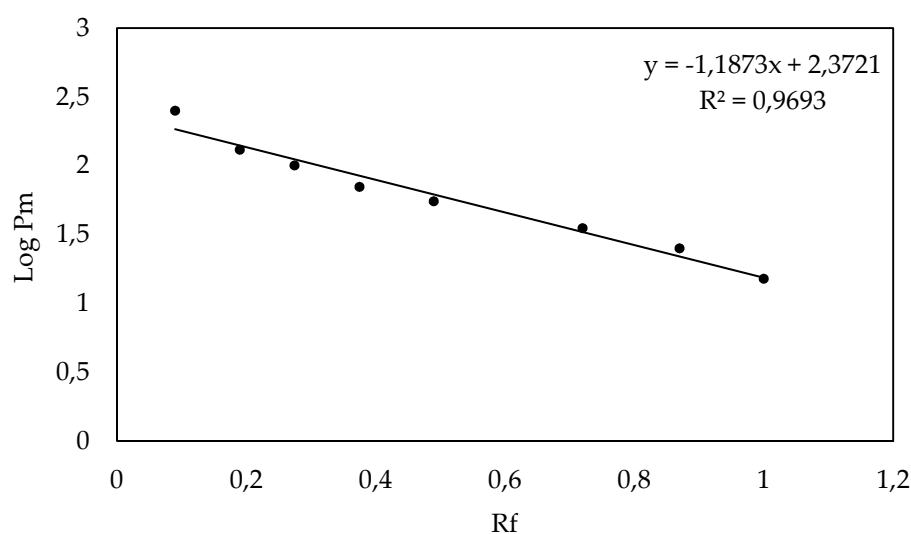


Figura 11. Recta del calibrado del movimiento electroforético relativo de las proteínas patrón en geles SDS-PAGE en función del peso molecular.

III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE SEMILLA

III.4.1. Especificidad y selectividad de sustrato

El estudio de la especificidad de sustrato de las isoformas aniónica y catiónica purificadas se llevó a cabo tanto con los sustratos colorimétricos guayacol y ABTS según se describe en el apartado *III.2.2.2*, como con compuestos fenólicos naturales del olivo purificados y ensayados en disoluciones individuales de concentración 6,5 mM (hidroxitirosol, tirosol, demetiloleuropeína, verbascósido, y oleuropeína). Además de estos ensayos de especificidad de sustrato, se realizaron ensayos para caracterizar la selectividad de ambas isoformas purificadas, mediante una reacción con mezclas de glucósidos fenólicos y de compuestos secoiridoideos característicos del AOV.

III.4.2. Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{máx}$) de las dos isoformas purificadas, POXcat y POXan, se realizó utilizando dos sustratos, guayacol y oleuropeína. El guayacol se ensayó en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0-9 mM utilizándose el método espectrofotométrico indicado en el apartado III.2.2.2. y la oleuropeína se ensayó a distintas concentraciones entre 0-15 mM utilizándose en este caso la medida de actividad en HPLC según se describe en el apartado III.2.2.3.

III.4.3. Efecto del pH

Con el fin de optimizar el pH para las isoformas purificadas de peroxidasa frente al sustrato colorimétrico guayacol y frente a la oleuropeína se prepararon disoluciones tamponadas en un intervalo de pH desde 3 a 10. Se emplearon los tampones acetato sódico, fosfato sódico, HEPES y borato sódico 25 mM.

III.4.4. Efecto de la temperatura

Se realizaron dos tipos de experimentos en relación a la temperatura: la determinación de la temperatura óptima y el estudio de la estabilidad térmica. La determinación de la temperatura óptima se llevó a cabo ensayando la actividad enzimática POXan y POXcat entre 10-70 °C. Para el estudio de estabilidad térmica se incubaron las enzimas en un amplio intervalo de temperaturas comprendido entre 30 y 75 °C durante 1 hora tomando alícuotas a distintos tiempos (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min) y ensayando la actividad enzimática según el apartado III.2.2.2.

III.4.5. Efecto de la fuerza iónica

Otro de los parámetros estudiados fue el efecto de la fuerza iónica del medio de reacción sobre la actividad de las isoformas purificadas. Se ensayó frente a dos sustratos sintéticos, guayacol y ABTS mediante el método espectrofotométrico.

III.4.6. Efecto de inhibidores de la oxidación

Las isoformas purificadas se incubaron durante 1 y 24 horas a 4 °C en presencia de los siguientes iones metálicos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Fe^{2+} , K^+ , Hg^{2+} y otros posibles inhibidores como azida sódica, SDS, ácido cítrico, glucosa, metabisulfito sódico, ácido ascórbico y 2-mercaptoetanol en concentración 1 mM.

III.5. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

III.5.1. Extracción de la fracción fenólica de aceite de oliva virgen

La extracción de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen (AOV) se llevó a cabo utilizando el método descrito por Mateos *et al.*, (2001).

Para la separación de los fenoles del AOV se emplearon columnas de extracción en fase sólida (EFS) con fase diol que retienen los compuestos polares y más específicamente aquellos que presentan grupos hidroxilos.

Se pesaron 2,5 g de AOV en un matraz cónico y se añadieron 0,5 mL de una disolución patrón. Se utilizaron como patrones internos para la cuantificación de las muestras los ácidos *p*-hidroxifenilacético y *o*-cumárico en concentraciones 0,12 mg/mL y 0,01 mg/mL en metanol. A continuación se evaporó el disolvente en un rotavapor a 40 °C bajo vacío y el residuo oleoso se redisolvió en 6 mL de hexano. Seguidamente se activaron las columnas diol haciendo pasar 6 mL de metanol y 6 mL de hexano, sin dejar secar en ningún momento. A continuación se cargó la disolución oleosa en la columna, pasando el disolvente y quedando

el aceite y los patrones retenidos en la fase sólida. Se lavó con dos porciones de 3 mL de hexano, limpiando así de aquellos componentes más apolares que hubieran quedado retenidos en la columna, tales como triglicéridos, ceras, tocoferoles e hidrocarburos. Posteriormente se continuó lavando la columna diol con 4 mL de hexano: acetato de etilo 85:15 (v/v), para eluir los compuestos más polares tales como triglicéridos oxidados, esteroides y diglicéridos. No se recogió ninguno de estos eluatos. Finalmente, los fenoles se eluyeron con 10 mL de metanol recogiendo esta fracción en un matraz cónico, y el disolvente se evaporó en un rotavapor hasta sequedad. El residuo se resuspendió en 500 μ L de MeOH:H₂O 1:1 (v/v) y se dejó reposar durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente el extracto fenólico se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m para su posterior análisis por HPLC.

III.5.2. Extracción de la fracción fenólica de pulpa y pasta de frutos de aceituna

La extracción de compuestos fenólicos a partir de pulpa y pasta de frutos de aceituna se llevó a cabo siguiendo el método de del Río *et al.*, (2003) con ligeras modificaciones. Para realizar la extracción se partió de 1,65 g de pulpa finamente troceada o de pasta de aceituna triturada en el molino del Abencor que se sonicaron durante 5 min con 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación se dejaron reposar durante 24 h a 4 °C, tiempo en el que se extraían los fenoles del tejido. Una vez transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró primero a través de papel de Miracloth y posteriormente a través de un filtro de 0,22 μ m para su análisis por HPLC.

III.5.3. Extracción de la fracción fenólica de semilla

La extracción de compuestos fenólicos presentes en la semilla de aceituna se llevó cabo a partir de dos tejidos diferenciados, el cotiledón y el tegumento, procedentes de 100 aceitunas de 18 SDF en estadio con IM = 0. Se partió de 3 g de cotiledones y de 0,87 g de tegumentos que se extrajeron con Ultra-Turrax empleando EtOH 80%. Se trituró el tejido hasta homogeneidad (2 min aproximadamente) y se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 min

entre 0–4 °C. El sobrenadante se llevó a sequedad y se resuspendió en una mezcla MeOH:H₂O (1:1) que fue filtrada a través de un filtro de 0,22 µm para su posterior análisis por HPLC.

III.5.4. Purificación de demetiloleuropeína a partir de un extracto de fenoles de pulpa de aceituna.

El material de partida empleado fue un extracto de fenoles de pulpa de Arbequina en estadio IM = 1 extraído según se ha detallado en el apartado IV.2. Éste contenía elevados niveles de demetiloleuropeína y acetato de hidroxitirosol, así como verbascósido y oleuropeína en menor medida.

Para la separación de estos fenoles se emplearon columnas de extracción en fase sólida (EFS) C18 que fueron previamente activadas con 10 mL de agua destilada.

Una alícuota de 10 mL del extracto fue diluida con agua destilada en proporción 1:5 y cargada en la columna. Una vez que todos los compuestos fenólicos fueron retenidos en la columna se hicieron eluciones sucesivas con volúmenes de 5 mL de mezclas MeOH:H₂O desde 10 % hasta 100 % recogiendo las correspondientes fracciones de 5 mL mediante filtración por gravedad. Cada fracción fue analizada mediante HPLC. La demetiloleuropeína eluyó en la fracción correspondiente al 30 % de MeOH.

III.5.5. Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC

Tanto la fracción fenólica de AOV como la extraída de pulpa, semilla y pasta de aceitunas se analizó por HPLC según el método descrito por Mateos *et al.*, (2001) con ligeras modificaciones.

El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido Beckman Coulter equipado con un módulo de bomba 126 y detector diodo array 168 y una columna de fase inversa (C₁₈) Mediterranea Sea 18 (4,0 mm d.i. x 250 mm, micropartícula de relleno 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, España). Las fases móviles utilizadas fueron agua: ácido fosfórico (99,5:0,5 v/v) (disolvente A) y metanol: acetonitrilo (50:50 v/v) (disolvente B) y un flujo de 1 mL/min. Las

longitudes de onda de trabajo (λ) fueron 235, 280 y 335 nm y el volumen de inyección de muestra de 20 μ L. El gradiente de elución empleado se describe en la tabla adjunta.

Tabla 3. Gradiente de la fase móvil B empleada en el análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC.

Tiempo (min)	% B
0-25	5-30
25-35	30-38
35-40	38-38
40-45	38-45
45-50	45-52,5
50-55	52,5-100
55-60	100-100
60-61	100-5
61-70	5-5

La cuantificación del ácido cinámico y los compuestos fenólicos, excepto el ácido ferúlico y las flavonas, se realizó a 280 nm utilizando el ácido *p*-hidroxifenilacético como patrón interno. Las flavonas y el ácido ferúlico se cuantificaron a 335 nm, siendo el ácido *o*-cumárico el patrón interno utilizado en este caso. Se calcularon los factores de respuesta de los distintos compuestos y se confirmó su identidad por HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) usando una bomba 126 con un detector diodo array 168 (Beckman, Inc., USA) en línea con un espectrómetro de masas (Finnigan Mat, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización ESI-II con la misma columna y condiciones de gradiente previamente descritas.

En la figuras adjuntas pueden verse los cromatogramas correspondientes a los perfiles fenólicos de semillas, frutos y aceites de las variedades Picual y Arbequina.

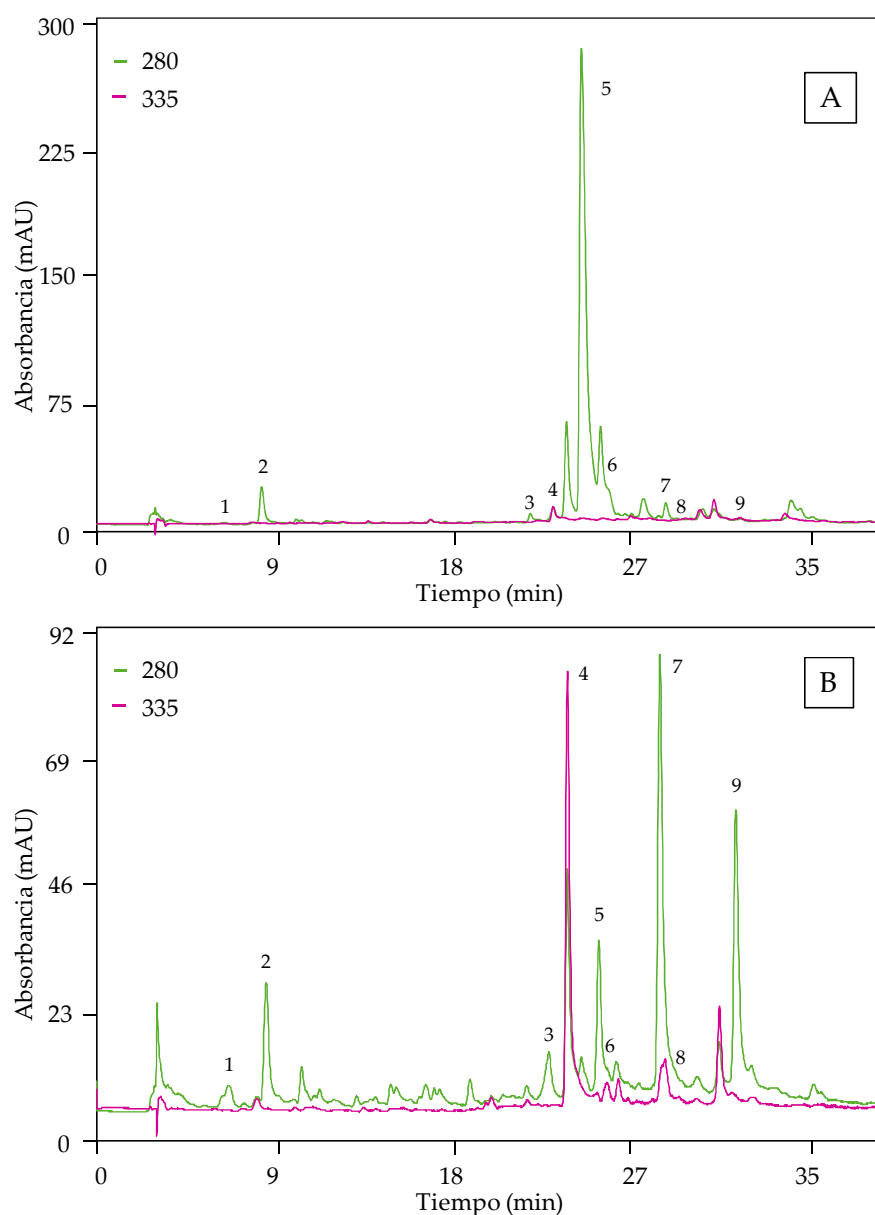


Figura 12. Perfiles fenólicos típicos de cotiledón (A) y tegumento (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis A y B corresponden a los compuestos: 1. Glucósido de hidroxitirosol + Hidroxitirosol, 2. Tirosol, 3. Demetiloleuropeína, 4. Verbascósido, 5. Nucénido; 6. Luteolin-7-glucósido, 7. Oleuropeína, 8. Apigenin-7-glucósido, 9. Ligustrósido.

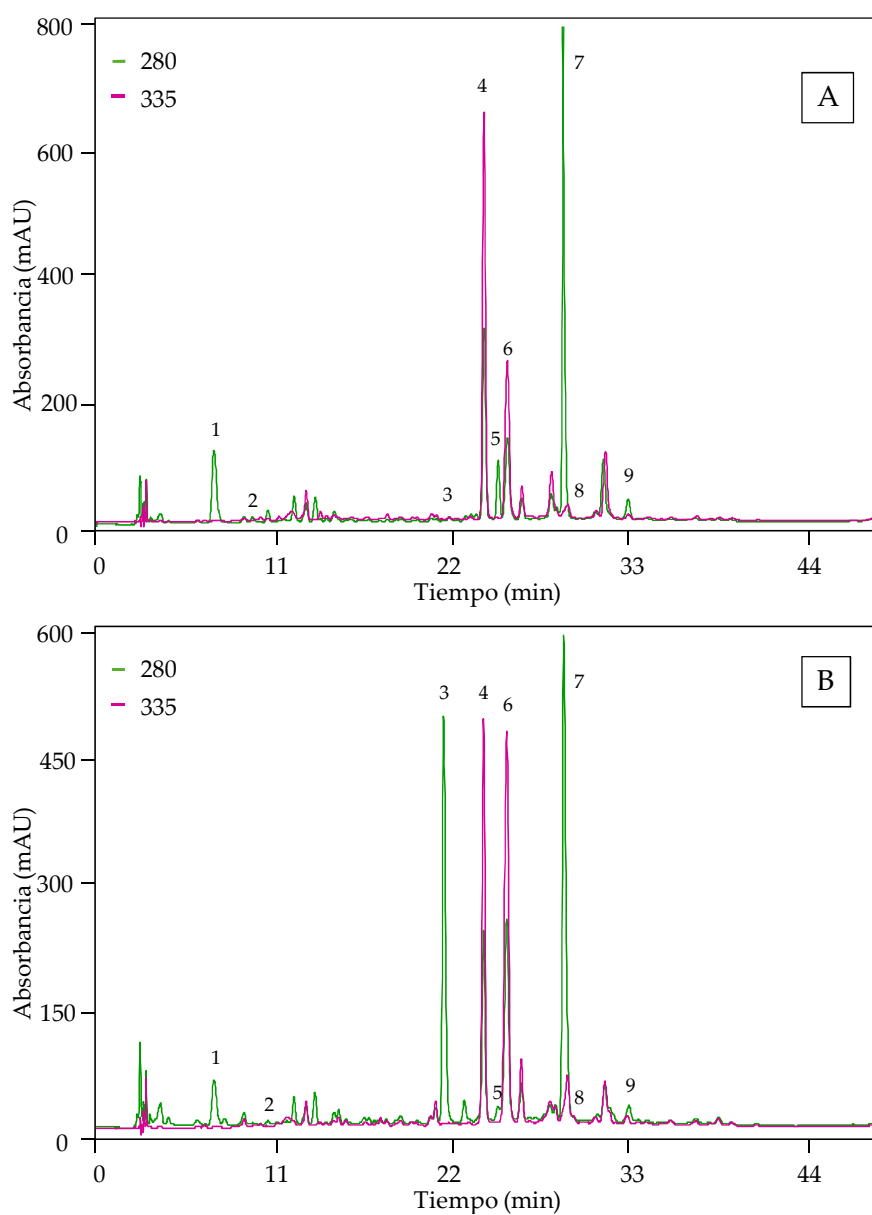


Figura 13. Perfiles fenólicos típicos de mesocarpio de Picual (A) y de Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis A y B corresponden a los compuestos: 1. Glucósido de hidroxitirosol + Hidroxitirosol, 2. Tirosol, 3. Demetiloleuropeína, 4. Verbascósido, 5. Nuzhénido; 6. Luteolin-7-glucósido, 7. Oleuropeína, 8. Apigenin-7-glucósido, 9. Ligustrósido.

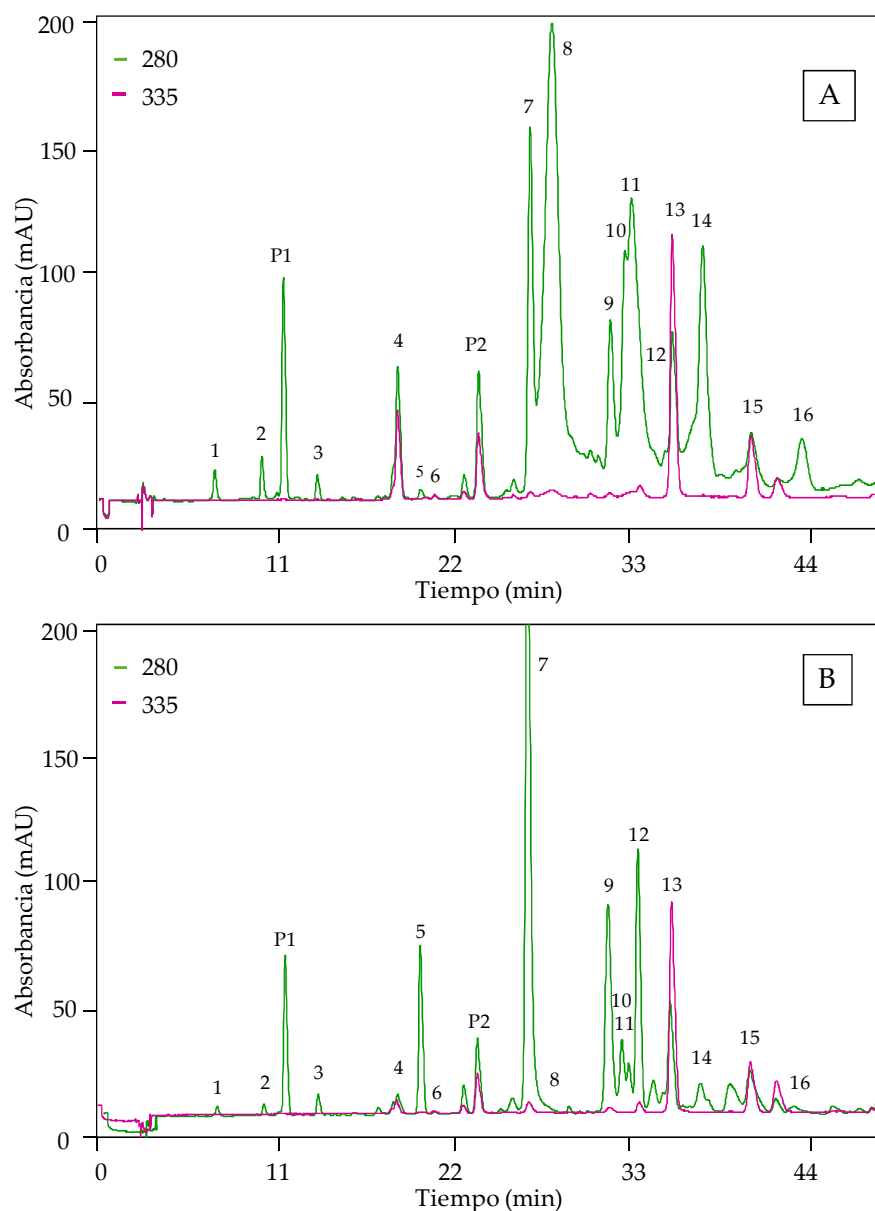


Figura 14. Perfiles fenólicos típicos de aceites de la variedad Picual (A) y Arbequina (B) registrados a 280 y 335 nm. Los picos cromatográficos de los análisis A y B corresponden a los compuestos: 1. Hidroxitirosol, 2. Tiroso, P1 (patrón interno 1). Ácido *p*-hidroxiacético, 3. Ácido vanílico, 4. Ácido *p*-cumárico, 5. Acetato de hidroxitirosol, 6. Ácido ferúlico, P2 (patrón interno 2). Ácido *o*-cumárico, 7. Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada (DAOD), 8. Isómeros de AAO, 9. Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado (DALD), 10. Pinorresinol, 11. Ácido cinámico, 12. 1-Acetoxipinorresinol, 13. Luteolina, 14. Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (AAO), 15. Apigenina, 16. Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido (AAL).

III.6. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

III.6.1. Determinación de proteínas

El contenido de proteína en los distintos extractos enzimáticos se determinó según el método descrito por Bradford (1976). Se tomó una alícuota de la muestra y se llevó hasta un volumen final de 0,25 ml con agua destilada. Se añadieron 0,75 ml de reactivo Bradford de proteínas (Sigma) y, tras agitar vigorosamente, se incubó la muestra durante 20 min. A continuación, se determinó la absorbancia a 595 nm. Se empleó BSA como proteína patrón. El seguimiento de la elución de proteínas en las cromatografías empleadas para la purificación se hizo midiendo la absorbancia a 280 nm. Esta longitud de onda corresponde al máximo de absorción de los aminoácidos triptófano y tirosina presentes en el medio.

III.6.2. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos tecnológicos de esta memoria fueron evaluados empleando Statgraphics Plus 5.1 (Manugistic Inc., Rockville, MD). Se aplicaron los análisis de varianza (ANOVA) y se compararon mediante el test de Student-Newman/Duncan con un nivel de significación del 0,05.

III.7. REACTIVOS Y APARATOS

III.7.1. Reactivos

Todos los tampones orgánicos, sales orgánicas, metabolitos y enzimas usados en bioquímica, detergentes, compuestos orgánicos y el reactivo de Bradford, fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

Los glucósidos fenólicos oleuropeína, verbascósido, hidroxitirosol, tirosol, luteolin-7-glucósido, apigenin-7-glucósido y rutina fueron suministrados por Extrasynthese (Francia). La demetiloleuropeína, al no estar disponible comercialmente, se aisló a partir de extractos fenólicos de mesocarpo de aceituna; el ligustrósido y el nuzhénido fueron obtenidos a partir de extractos fenólicos de semilla.

Los disolventes orgánicos, ácidos y bases utilizados en bioquímica fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España).

Las columnas de Sephadex G-25 PD-10 y las columnas de intercambio aniónico y catiónico fueron suministradas por GE Healthcare, y las columnas de extracción en fase sólida Superclean LC-18 y fase diol fueron adquiridas a Supelco.

El agua utilizada en los experimentos de bioquímica estaba purificada mediante ósmosis inversa y posteriormente desionizada mediante un desionizador "Sation", modelo 8000P.

III.7.2. Aparatos

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en diferentes tipos de centrífugas dependiendo del volumen y la velocidad requerida. Para centrifugaciones a baja velocidad se usaron las centrífugas de mesa Eppendorf J.P. Selecta y Heraeus refrigerada modelo Megafuge 1.0 R. Para las centrifugaciones a alta velocidad se usó una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5C, equipada con los rotores SS-34 y GSA.

Las cubetas para la electroforesis vertical de proteínas pertenecían al equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad (Estados Unidos).

La visualización de las bandas separadas en geles de poliacrilamida se realizaron con una cámara FIREWIRE CCD de alta resolución acoplada a un ordenador con el programa GeneSnap para determinar las condiciones de captura de la fotografía del gel.

La cuantificación de proteínas y las medidas de actividad POX, PPO y β -glucosidasa se llevaron cabo en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-640, equipado con lámparas de tungsteno (visible) y deuterio (ultravioleta).

Para el análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC se utilizó un cromatógrafo líquido Beckman Coulter (Beckman Inc., Estados Unidos) equipado con un módulo de bomba 126 y detector diodo array 168 y una columna de fase inversa (C18) Mediterranea Sea 18 (4,0 mm d.i. x 250 mm, micropartícula de relleno 5 μm) (Teknokroma, Barcelona, España). La identificación de los compuestos fenólicos analizados fue confirmada mediante HPLC-MS usando el equipo antes mencionado acoplado a un detector de masas MAT 95S (Finnigan, Alemania) equipado con una interfase de electroevaporación ESI-II.

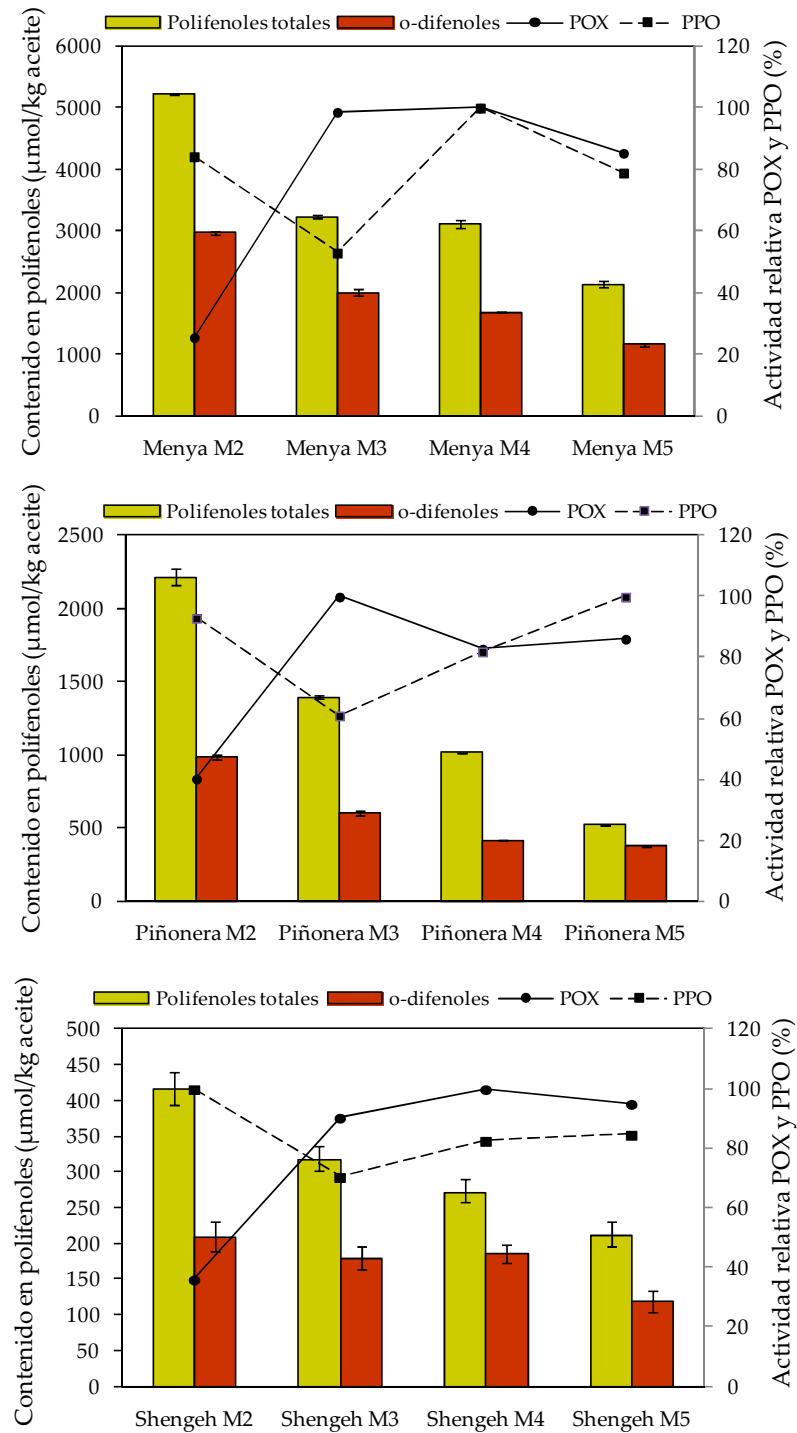
El proceso de purificación enzimática mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido AKTA Basic 10/100 (Amersham Pharmacia Biotech Freiburg, Alemania).

IV.1. ACTIVIDADES OXIDOREDUCTASAS Y METABOLISMO DE COMPUESTOS FENOLICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA Y EL PROCESO DE EXTRACCION DEL ACEITE

Como se ha comentado en la Introducción, existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que las actividades óxido-reductasas presentes en la aceituna catalizan la oxidación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV y afectan, por tanto, de manera decisiva al contenido final de compuestos fenólicos de los aceites. Sin embargo, no existen datos concluyentes acerca de actividad real de dichas óxido-reductasas frente a los compuestos fenólicos naturales del olivo. Como se recoge en la bibliografía, las tres actividades enzimáticas que podrían contribuir a este proceso de oxidación fenólica serían la LOX, la POX y la PPO. La enzima LOX juega un papel clave en la biosíntesis de los compuestos volátiles que caracterizan al AOV (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2012) y además mediante reacciones secundarias de oxidación puede degradar otros compuestos presentes en las pastas de aceituna como carotenos y clorofilas. Sin embargo, los ensayos realizados tanto con LOX comercial de soja como con extractos de LOX de aceituna utilizando fenoles de olivo como sustrato o cosustrato fueron negativos, sugiriendo que esta actividad enzimática no interviene de manera directa en la oxidación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV.

Con el fin de estudiar la implicación de las enzimas POX y PPO de aceituna al perfil fenólico del AOV, se realizó un seguimiento de ambas actividades enzimáticas a lo largo de la maduración de cinco variedades de aceituna analizándose en paralelo el contenido fenólico de los correspondientes aceites. Las variedades de aceituna seleccionadas fueron Arbequina y Picual, por ser las variedades más importantes en nuestro país desde el punto de vista productivo, y Menya, Piñonera y Shengeh como variedades representativas de alto, medio y bajo contenido de compuestos fenólicos dentro de la colección nuclear del Banco Mundial de Olivo. El estudio se realizó en cuatro estadios seleccionados de maduración del fruto, IM = 2 a

IM = 5 que se corresponden con frutos recolectados las semanas 30, 34, 38 y 42 después de la floración. Los resultados quedan reflejados en la Figura 15.



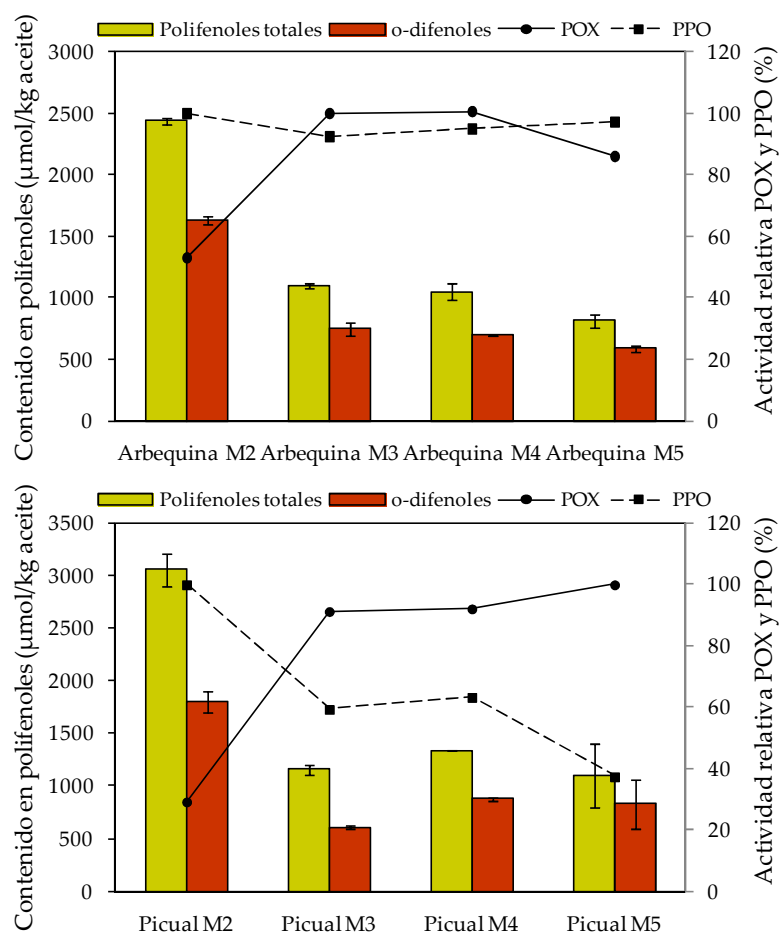


Figura 15. Evolución del contenido de polifenoles totales y *o*-difenoles, POX y PPO a lo largo de la maduración en Menya (A), Piñonera (B), Shengeh (C), Arbequina (D) y Picual (E).

La evolución del contenido fenólico de los aceites a lo largo de la maduración sigue la misma tendencia en las cinco variedades analizadas: los niveles más altos se localizan en el estadio IM = 2, que se corresponde con los aceite más verdes y van descendiendo paulatinamente conforme va transcurriendo el período de maduración, siendo dicho descenso algo más brusco en Arbequina y Picual, que en las otras tres variedades analizadas.

En cada uno de los casos se puede afirmar que, en mayor o menor medida, el descenso, tanto de los compuestos fenólicos totales como de los *o*-difenoles en los aceites a lo largo de la maduración, está íntimamente ligado con el progresivo aumento de la actividad

POX de semilla, mientras que la correlación con los niveles de actividad PPO no es tan evidente.

El contenido fenólico total en Piñonera es similar al cuantificado en Arbequina y Picual. Por el contrario, tal y como se observa en la Figura 15, el contenido de compuestos fenólicos en Menya es muy superior respecto a Piñonera, mientras que los niveles más bajos detectados se encontraron en Shengeh. Por tanto, cabría esperar que los niveles de POX más elevados fueran los correspondientes a la variedad Shengeh. Sin embargo, tal y como se comprueba en los datos recogidos en la Tabla 4, no es así. Las tres actividades enzimáticas que contribuyen de manera decisiva a la formación y degradación de compuestos fenólicos son: la actividad β -glucosidasa (β -GLU), que hidroliza los principales glucósidos fenólicos para dar lugar a los derivados secoiridoideos, y las actividades óxido-reductasas POX y PPO que pueden oxidar tanto a los glucósidos fenólicos como a sus derivados secoiridoideos. Por ello, en la Tabla 4 se han incorporados las actividades enzimáticas β -GLU, POX y PPO para las tres variedades seleccionadas como alto, medio y bajo contenido en compuestos fenólicos en los cuatro estadios de maduración estudiados. Además, se ha confeccionado la Tabla 5, que recoge el contenido de los fenoles de fruto de cada una de las variedades a lo largo de la maduración.

Tabla 4. Actividades enzimáticas expresadas como U/g fruto relacionadas con el metabolismo de los compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen de las variedades Menya, Piñonera y Shengeh.

	Actividad (U/g fruto)	M2	M3	M4	M5
Menya	β -GLU	295,84	439,41	242,34	342,33
	POX	0,22	0,85	0,86	0,73
	PPO	327,62	206,34	388,94	307,15
Piñonera	β -GLU	794,75	308,38	190,05	0,00
	POX	0,34	0,84	0,70	0,73
	PPO	201,61	132,29	177,78	216,84
Shengeh	β -GLU	86,72	109,81	50,94	65,56
	POX	0,26	0,65	0,72	0,68
	PPO	117,56	82,87	97,18	99,51

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos en el fruto durante la maduración de las variedades Menya, Piñonera y Shengeh.

Compuesto fenólico	Menya ($\mu\text{mol/g}$ fruto)				Piñonera ($\mu\text{mol/g}$ fruto)				Shengeh ($\mu\text{mol/g}$ fruto)			
	M2	M3	M4	M5	M2	M3	M4	M5	M2	M3	M4	M5
Hidroxitirosol	0,16	1,16	1,40	2,20	0,22	6,02	5,46	6,16	4,41	4,56	5,86	4,59
Tirosol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dem.Oleurop.	1,69	25,33	38,83	74,10	0,00	21,01	24,30	23,98	0,00	0,00	0,00	0,00
Verbascósido	0,11	0,00	0,16	0,90	0,73	0,41	0,44	0,43	0,10	0,00	0,00	0,00
Lut-7-glu.	0,71	0,50	0,23	0,53	1,15	0,60	0,52	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
Oleuropeína	60,89	10,81	1,31	0,00	42,29	0,00	0,17	0,00	12,10	8,07	6,88	7,28
Apig-7-glu.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ligustrósido	5,93	0,70	0,00	0,00	3,73	6,96	0,00	0,00	1,13	0,00	0,00	0,00
Totales	69,48	38,50	41,94	77,74	48,12	35,00	30,89	30,61	17,74	12,63	12,74	11,87

Como se ha comentado al inicio de este apartado, la actividad *in vivo* de las óxido-reductasas a lo largo del proceso de obtención del AOV queda patente al estudiar la alteración del perfil fenólico de aceites obtenidos a distintos tiempos de batido. La Figura 16 muestra el perfil fenólico de aceites de las variedades Arbequina y Picual obtenidos inmediatamente después de la molturación o tras 30 minutos de batido. Los cromatogramas mostrados en esta figura, indican en ambos casos que al inicio de la molturación el contenido de fenoles en los aceites es alto y a medida que transcurre el tiempo de batido dicho contenido fenólico decae significativamente. Los descensos observados en el contenido total de polifenoles del aceite de Arbequina fueron del 60%, disminuyendo los *o*-difenoles un 80,5%, mientras que en el caso de Picual el contenido total de polifenoles descendió un 41,4% y el de *o*-difenoles un 53,7%. Los compuestos más afectados en ambos casos fueron el acetato de hidroxitirosol (1) y la FDAO (2).

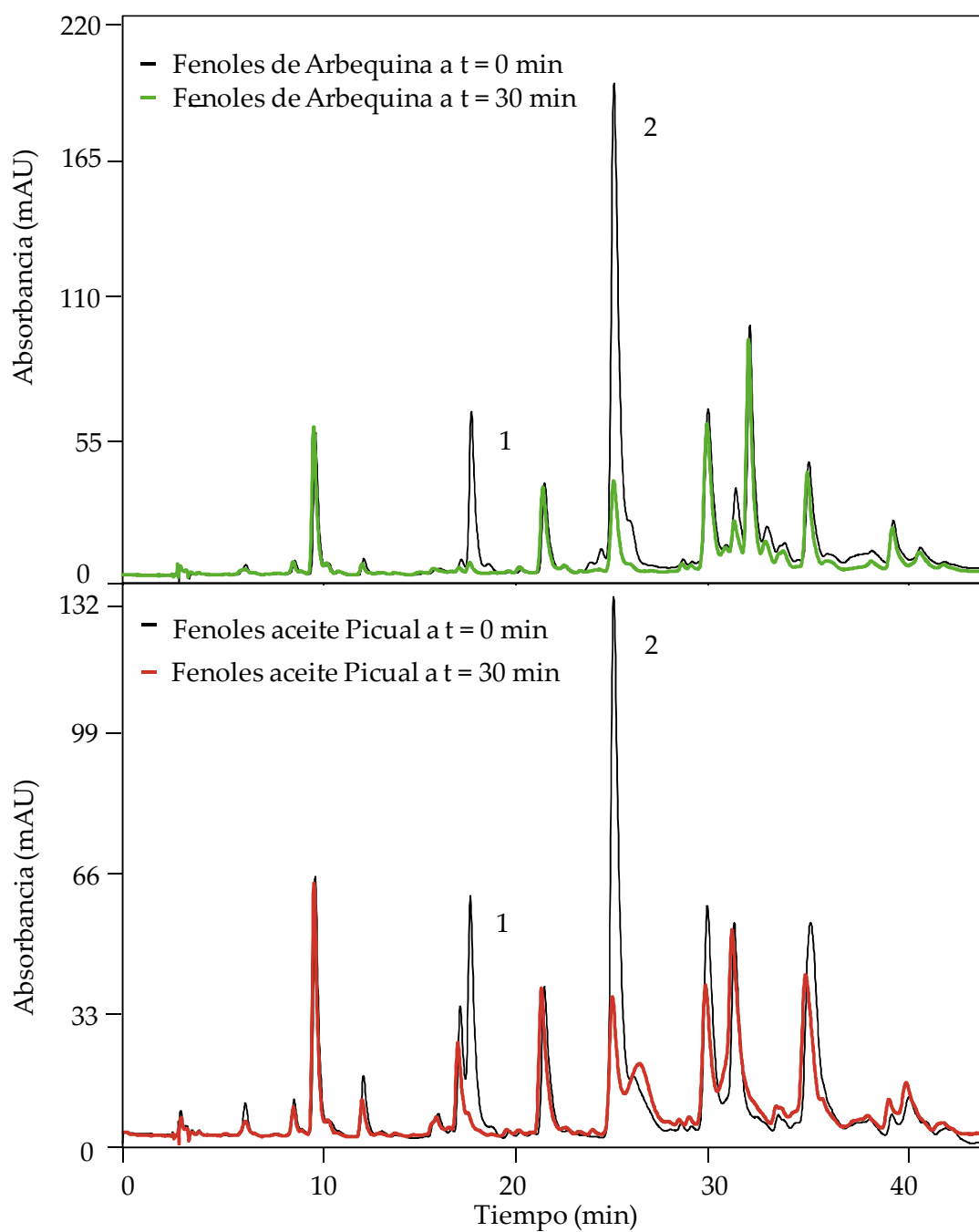


Figura 16. Perfiles fenólicos de aceites de Arbequina (verde) y Picual (rojo) a tiempos 0 y 30 min de batido.

Haciendo uso del sistema Abencor se hizo un seguimiento de las actividades β -GLU, POX y PPO en pastas de aceituna a distintos tiempos de batido. Utilizando los protocolos de

extracción y los métodos de medida espectrofotométricos descritos se cuantificaron los niveles de las tres actividades enzimáticas durante el proceso de obtención del AOV. El nivel de actividad β -GLU en el tiempo de batido $t = 0$ se redujo al 40 % respecto de la actividad inicial en el fruto, inactivándose inmediatamente una vez comenzada la etapa de batido. La actividad PPO remanente en el tiempo $t = 15$ resultó ser del 15% y no se encontró actividad más allá de este punto, mientras que la actividad POX se mantuvo alrededor de un 20% durante todo el proceso. La actividad LOX, que no se incluye en la Figura 17 al no estar aparentemente relacionada con la oxidación de fenoles, fue nula al inicio del batido.

	t = 0	t = 15	t = 30
β -GLU	40%	0%	0%
PPO	15%	15%	0%
POX	20%	20%	20%

Figura 17. Actividades remanentes de las enzimas relacionadas con el metabolismo de los compuestos fenólicos durante el tiempo de batido en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos acerca del comportamiento de POX y PPO a lo largo de la maduración de la aceituna y durante el proceso de obtención del AOV, y una vez descartada la implicación de la LOX, como primera aproximación al estudio del proceso de oxidación de fenoles durante el proceso de obtención del AOV, parece necesario extraer las proteínas con actividad POX y PPO en aceituna y estudiar su comportamiento frente a los que serían sus principales sustratos naturales en la pasta de aceituna, los compuestos fenólicos del fruto y los derivados secoiridoideos del AOV.

IV.2. CONTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA A LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

IV.2.1. Extracción y medida de la actividad peroxidasa

IV.2.1.1. *Extracción de proteínas con actividad peroxidasa en aceituna*

Se realizaron algunos ensayos preliminares tanto con tejido fresco de pulpa y semilla de aceituna como con polvos acetónicos obtenidos de estos tejidos. Teniendo en cuenta la necesidad de disponer de un material homogéneo y estable para el desarrollo de todo el trabajo, finalmente se decidió preparar todos los extractos enzimáticos a partir de polvos acetónicos tanto de mesocarpo como de semilla. La preparación de dicho polvo acetónico se realizó según se indica en el apartado III.2.1. de Materiales y Métodos. Para facilitar el aislamiento de proteínas con actividad POX se añadieron al tampón de extracción ácido etilendiamintetracético (AEDT) para eliminar interferencias de posibles inhibidores metálicos, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), benzamidina y ácido α -aminocaproico como inhibidores de proteasas. Para la extracción de la enzima POX de aceituna se empleó finalmente el tampón A descrito en Materiales y Métodos, tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,7, Tritón X-100 0,1 % (p/v), AEDT 1 mM, PMSF 0,1 mM, benzamidina 0,1 mM, ácido α -aminocaproico 5 mM.

El tampón de extracción empleado para la extracción de POX de semilla fue el que se indica en Materiales y Métodos, aunque se hicieron distintas pruebas modificando el pH de la extracción entre 5 y 9 y las concentraciones de algunos de los coadyuvantes como el PMSF y el tritón. Tanto la elección de pH 6,7 como la presencia de tritón en el tampón de extracción beneficiaron la extracción de proteínas con actividad POX.

IV.2.1.2. Optimización de la medida espectrofotométrica de la actividad peroxidasa

Tal y como se describe en Materiales y Métodos se utilizaron dos métodos para determinar actividad POX, el método espectrofotométrico que utiliza guayacol como sustrato y un segundo método, más específico, que mediante análisis por HPLC permite cuantificar la actividad POX frente a los sustratos fenólicos naturales presentes en la aceituna. El método espectrofotométrico fue el utilizado para optimizar el proceso de extracción y medida de actividad así como para cuantificar la actividad POX en distintos tejidos, variedades de aceituna o estadios de maduración.

Las condiciones óptimas de medida de actividad POX frente a guayacol se establecieron utilizando POX comercial de rábano. El medio de reacción consistió en 1,25 mL de tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 100 μ L H₂O₂ 30 mM, 5,5 mM guayacol y la cantidad apropiada de extracto enzimático (5-20 μ L) realizándose la incubación directamente en cubeta y monitorizándose la oxidación del guayacol mediante cuantificación a 420 nm del producto de oxidación formado, el tetraguayacol.

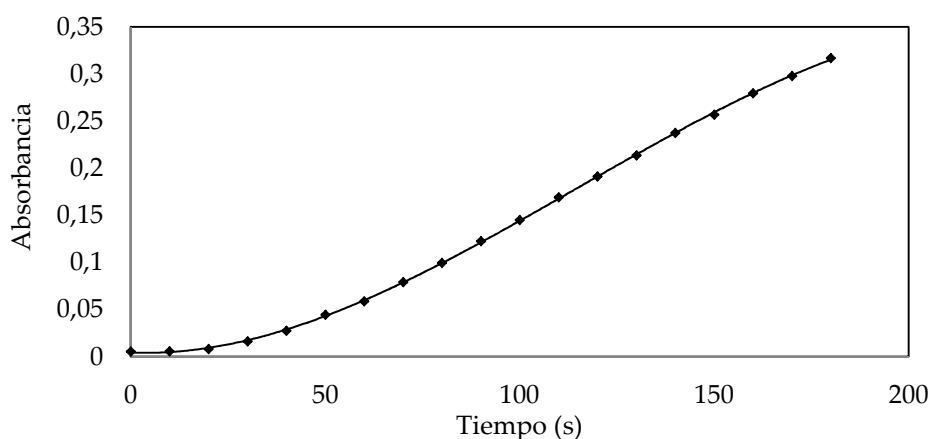


Figura 18. Absorbancia a 420 nm en función del tiempo de medida de la reacción espectrofotométrica de POX de aceituna frente a guayacol.

En la cinética de oxidación del guayacol por la POX de aceituna se observa un claro período de inducción durante el primer minuto de reacción así como un aparente agotamiento de la reacción a partir de los 3 minutos (Figura 18). A la vista de estos resultados se decidió cuantificar la actividad POX de aceituna registrando el incremento de absorbancia correspondiente a la zona con mejor linealidad de la cinética enzimática, en el rango de 60-120 segundos.

Una vez establecido el tiempo óptimo de reacción se optimizaron las concentraciones de guayacol y H_2O_2 . Los datos experimentales obtenidos, mostrados en las Figuras 19 y 20, permitieron establecer unas concentraciones óptimas de 5,5 mM para el guayacol y 2 mM para el H_2O_2 . El mismo estudio se realizó con el sustrato colorimétrico ABTS, obteniéndose máxima actividad con la concentración 1 mM de dicho sustrato y con 2 mM de H_2O_2 .

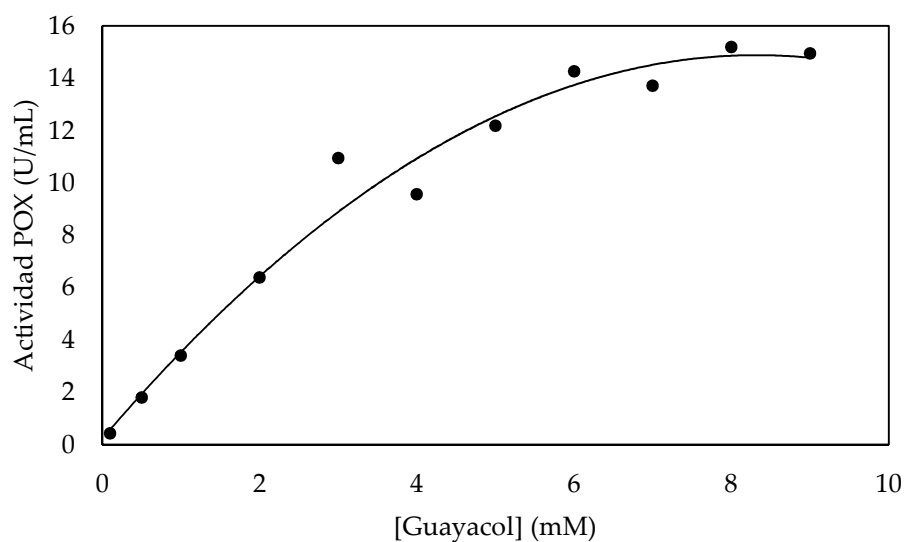


Figura 19. Actividad POX del EC de aceituna en función de la concentración de guayacol. Los resultados de actividad están expresados como U/ml de enzima y son el valor medio de tres extracciones enzimáticas independientes. El coeficiente de variación fue inferior al 6%.

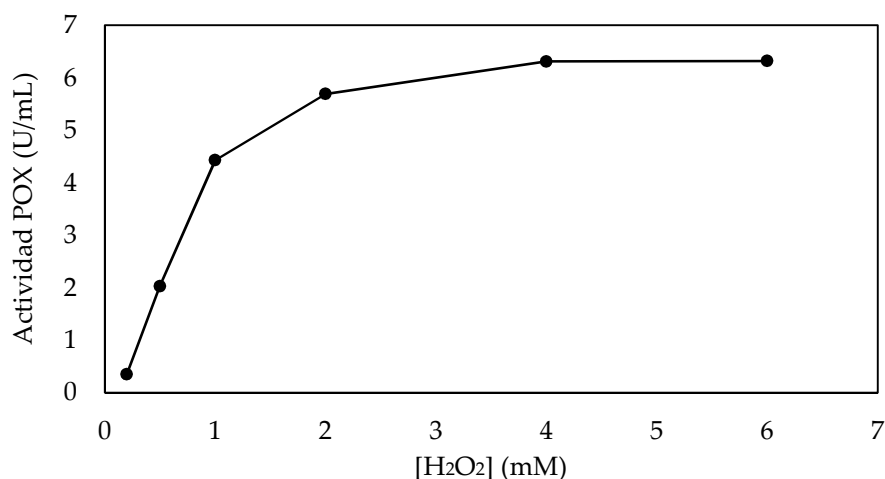


Figura 20. Actividad POX del EC de semilla de aceituna en función de la concentración de H₂O₂. Los resultados de actividad están expresados como U/ml de enzima y son el valor medio de tres extracciones enzimáticas independientes. El coeficiente de variación fue inferior al 6%.

De igual modo, para determinar el pH óptimo de la actividad POX de aceituna se llevaron a cabo medidas de la actividad enzimática empleando diferentes soluciones tamponadas en un intervalo de pH entre 3 y 9. El pH óptimo de actuación de la actividad POX de aceituna en las condiciones descritas frente al sustrato colorimétrico guayacol fue 6,5 (Figura 21) mientras que el pH óptimo cuando se empleó ABTS fue 4,25.

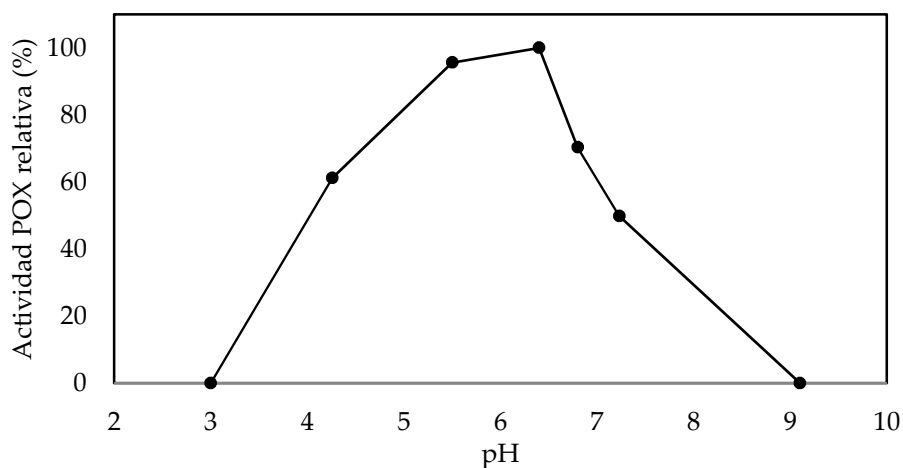


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima peroxidasa de semilla de aceituna frente al sustrato colorimétrico guayacol.

La temperatura óptima encontrada para la actividad POX resultó ser 10 °C y fue descendiendo de manera lineal hasta los 70 °C, pero debido a que la actividad no difería significativamente entre 10 y 30 °C, la temperatura empleada para los ensayos con el EC fue de 25 °C por aproximación con las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de obtención del AOV.

IV.2.2. Distribución de la actividad peroxidasa en los distintos tejidos de la aceituna

Una vez establecidas las condiciones óptimas de medida, se evaluó la contribución de semilla y mesocarpo de aceituna a la carga total de POX del fruto, comparándose así mismo los niveles de actividad de frutos de las variedades Picual y Arbequina recolectados en su momento óptimo de maduración, estadio IM = 3.

Tabla 6. Actividad POX medida frente a guayacol en semilla y mesocarpo de aceitunas de las variedades Picual y Arbequina en el estadio óptimo de maduración en la campaña 2012-2013. Los extractos crudos se prepararon a partir de polvos acetónicos de mesocarpo y semilla y las determinaciones de actividades enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.2.).

Material biológico	Actividad POX (U/g pf)
Semilla Arbequina	23,38 ± 1,30
Semilla Picual	17,45 ± 0,61
Mesocarpo Arbequina	0,0088 ± 0,00027
Mesocarpo Picual	0,0063 ± 0,00086

En base a los niveles de actividad POX cuantificados en mesocarpo de aceituna puede concluirse que efectivamente, tal y como indicaban estudios preliminares (Luaces *et al.*, 2007), la actividad POX de aceituna se localiza prácticamente en su totalidad en la semilla del fruto, aportando el mesocarpo únicamente un 2,2% en la variedad Picual y un 1,0% en la variedad Arbequina respecto a la actividad total en el fruto.

IV.2.3. Evolución de la actividad peroxidasa durante el proceso de maduración de la aceituna

Dado que la actividad POX se localiza mayoritariamente en la semilla de la aceituna, se eligió el polvo acetónico de semilla para realizar un seguimiento de la actividad POX en cinco estadios de maduración (IM = 1-5) de aceitunas de las variedades Arbequina y Picual durante los meses de septiembre a enero. Este período, que se corresponde con las semanas después de la floración (SDF) 22-38, coincide con la campaña de la recolección de la aceituna destinada a la producción de aceite de oliva.

En la Figura 22 se muestra la evolución de la actividad POX a lo largo de la maduración. Se observó, para ambas variedades, una misma tendencia de aumento de la actividad POX a lo largo de la maduración. El máximo de actividad se encontró en el intervalo de 38-42 SDF.

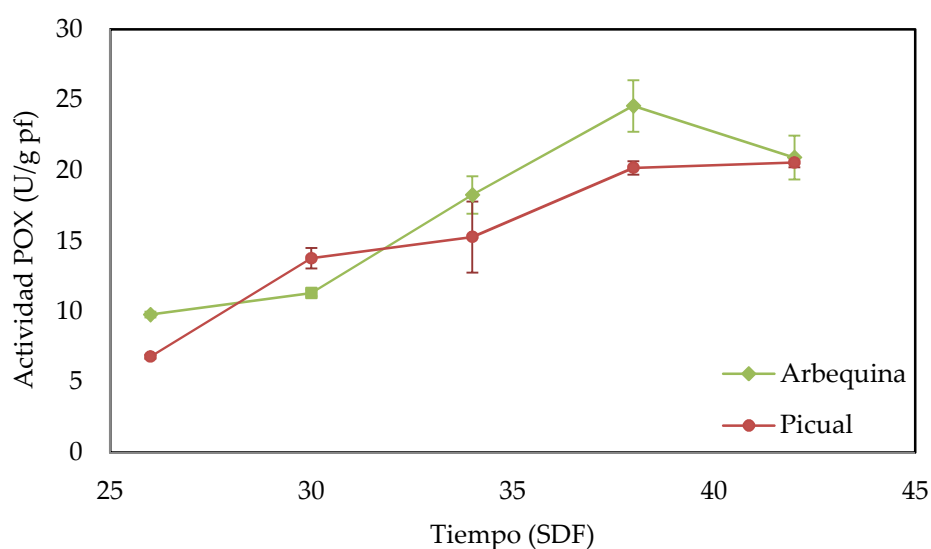


Figura 22. Evolución de la actividad peroxidasa de semilla de Arbequina y Picual en la campaña 2010-2011 durante la maduración del fruto. Las determinaciones de actividades enzimáticas expresadas como U/g peso fresco de semilla se llevaron a cabo por triplicado tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.2.).

IV.2.4. Actividad peroxidasa y oxidación de fenoles naturales del olivo

Los primeros estudios realizados para evaluar la posible actividad de la POX de aceituna frente a los fenoles del olivo se centraron en determinar si dichos fenoles inhibían la reacción de oxidación del guayacol previamente caracterizada. Concretamente, se evaluó el efecto de la oleuropeína, como fenol más representativo de la aceituna, y el de un extracto fenólico de AOV obtenido como se detalla en el apartado III.2.1. de Materiales y Métodos. En la Tabla 7 se puede ver como una concentración 1 mM de oleuropeína es suficiente para inhibir casi en un 90% la oxidación del guayacol catalizada por la POX de aceituna.

Tabla 7. Efecto de la oleuropeína sobre la actividad POX de aceituna medida frente a guayacol. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado II.2.2.).

[Oleuropeína] (mM)	Actividad POX vs guayacol (U/mL)	Actividad %
0,0	6,60	100
1,0	1,04	11,0
2,5	1,16	12,3
5,6	1,08	11,4

De forma similar la Tabla 8 muestra el efecto de los compuesto fenólicos característicos del AOV sobre la actividad POX. Las concentraciones finales de estos fenoles de AOV en el medio de reacción fueron de 1 y 2,5 mM. Encontrándose también en este caso una fuerte inhibición a partir de concentraciones 1 mM.

Tabla 8. Efecto de compuestos fenólicos del AOV sobre la actividad POX de aceituna medida frente a guayacol. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos.

[Fenoles AOV] (mM)	Actividad POX vs guayacol (U/mL)	Actividad %
0,0	6,60	100
1,0	0,88	9,3
2,5	0,72	7,6

Una vez completados estos estudios preliminares se plantearon una serie de ensayos en los que se utilizaron como sustratos de la POX de aceituna los compuestos más característicos del fruto, y los compuestos más característicos del AOV, los derivados secoiridoideos.

IV.2.4.1. POX y oxidación de compuestos fenólicos de la aceituna

Igual que en el apartado anterior, el medio de reacción y las condiciones de incubación para estudiar la oxidación de compuestos fenólicos de la aceituna se diseñaron a partir de estudios preliminares realizados con POX de rábano disponible comercialmente. Posteriormente, y utilizando ya extractos enzimáticos de POX de aceituna y oleuropeína como glucósido fenólico más representativo, se optimizaron los distintos parámetros de la reacción. Así, se estudió el efecto de la concentración de oleuropeína sobre la actividad POX de aceituna, determinándose que la concentración de glucósido con la que se obtenían valores máximos de actividad era de 8 mM (Figura 23) y observándose una aparente inhibición de la actividad a partir de concentraciones 12 mM.

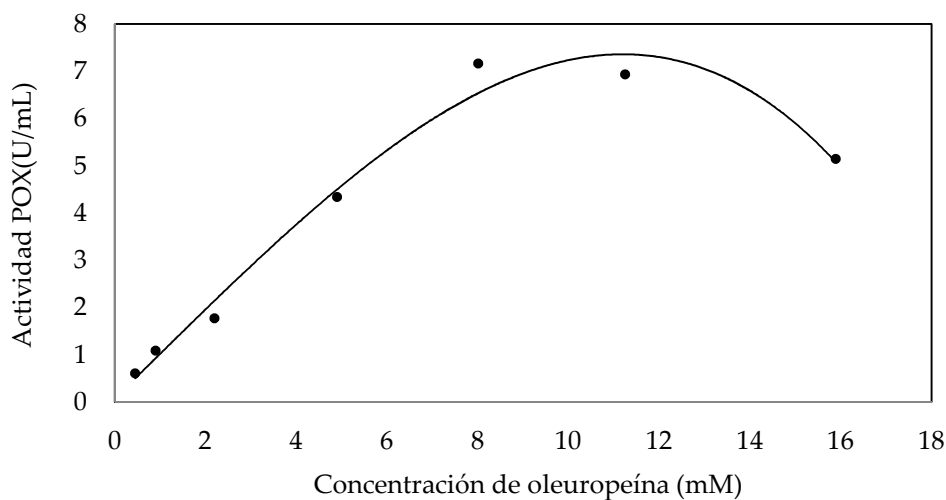


Figura 23. Actividad POX de aceituna en función de la concentración de oleuropeína.

De igual modo, tras hacer un seguimiento de la oxidación de la oleuropeína con POX de aceituna (Figura 24) se determinó un tiempo óptimo de la reacción de 2 minutos.

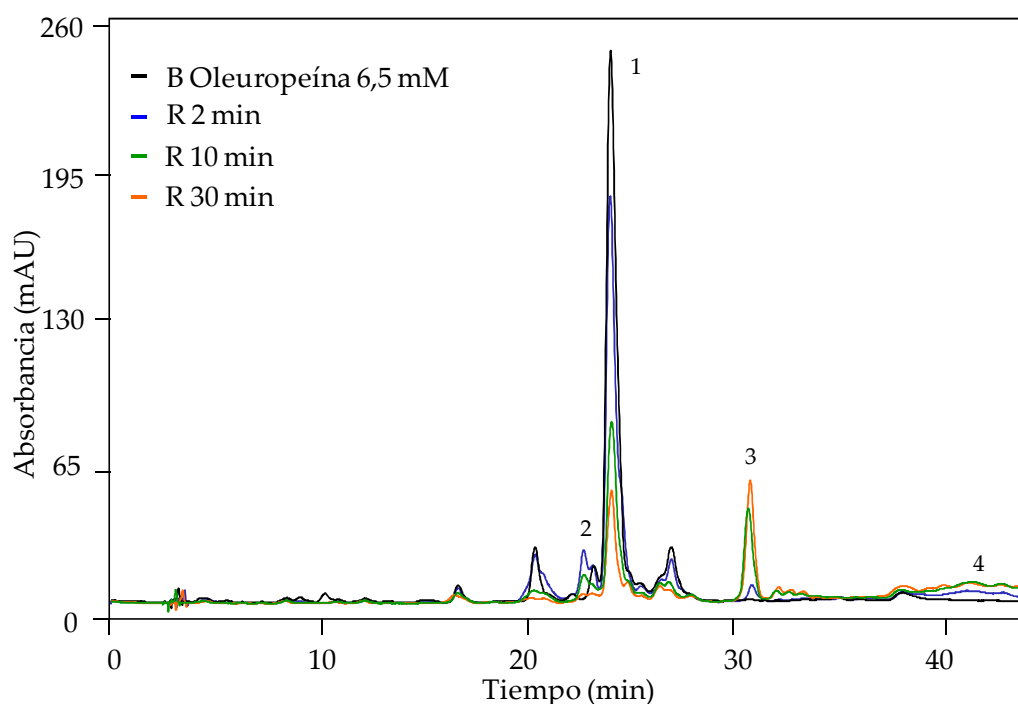


Figura 24. Evolución de la reacción de oxidación de la oleuropeína por POX de aceituna durante 30 min. Los picos 2, 3 y 4 corresponden a productos de reacción no identificados.

Tal y como se ha descrito en la introducción, la oleuropeína es el glucósido fenólico más abundante, pero no el único presente en el fruto de aceituna. En este sentido era de especial interés evaluar la capacidad oxidativa de la enzima POX con cuantos glucósidos naturales fuera posible. En este caso la aproximación experimental fue ligeramente distinta ya que la enzima POX de aceituna se incubó con una mezcla de oleuropeína, verbascósido y demetiloleuropeína en cantidades variables (Tabla 9). Es importante señalar que mientras que la oleuropeína y el verbascósido están disponibles comercialmente la demetiloleuropeína fue aislada y purificada a partir de un extracto fenólico de frutos de la variedad Arbequina (apartado III.5.4. de Materiales y Métodos).

Tabla 9. Actividad de la enzima peroxidasa de aceituna frente a una mezcla de glucósidos naturales del fruto. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Sustrato	POX Actividad relativa (%)
Demetiloleuropeína 1,78 mM	32,5
Verbascósido 0,08 mM	100
Oleuropeína 2,35 mM	25,2

Los resultados obtenidos son especialmente interesantes ya que no sólo confirman niveles muy altos de oxidación del verbascósido por enzimas con actividad POX de aceituna sino que además al encontrarse los tres glucósidos fenólicos en el mismo medio de reacción podrían indicar una cierta preferencia de la POX de aceituna por este sustrato que es, sin embargo, el menos abundante en el medio de reacción. Las tasas de oxidación obtenidas con oleuropeína y demetiloleuropeína, muy parecidas a su vez a las obtenidas al incubar ambos glucósidos con POX de rábano, parecen indicar que las enzimas con actividad POX tienen una afinidad muy similar por ambos sustratos.

IV.2.4.2. POX y oxidación de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen

Parece claro que las proteínas con actividad POX de la aceituna, podrían oxidar no sólo a los glucósidos fenólicos del fruto, sino también aquellos compuestos fenólicos producidos por la hidrólisis de dichos glucósidos mediada por enzimas β -GLU. Como en apartados anteriores y como paso previo al estudio de la contribución de la POX de aceituna a la oxidación de fenoles del AOV, se comprobó la capacidad de la POX comercial de rábano para oxidar dichos compuestos fenólicos. Los ensayos se realizaron con extractos fenólicos procedentes de aceites de Picual y Arbequina obtenidos según la metodología descrita en el apartado III.5.1. de Materiales y Métodos. En el cromatograma de la Figura 25 se muestra la alteración del extracto fenólico de Arbequina tras dos minutos de incubación con POX de rábano en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (III.2.2.3.). Tal y como se observa en la Figura 5 los cuatro derivados secoiridoideos mayoritarios del aceite, FDAO (8), FAAO

(15), FDAL (10) y FAAL (17), son los compuestos más afectados por la oxidación de POX aunque también se afectan otros compuestos como la luteolina (pico 14 del cromatograma), que prácticamente desaparece.

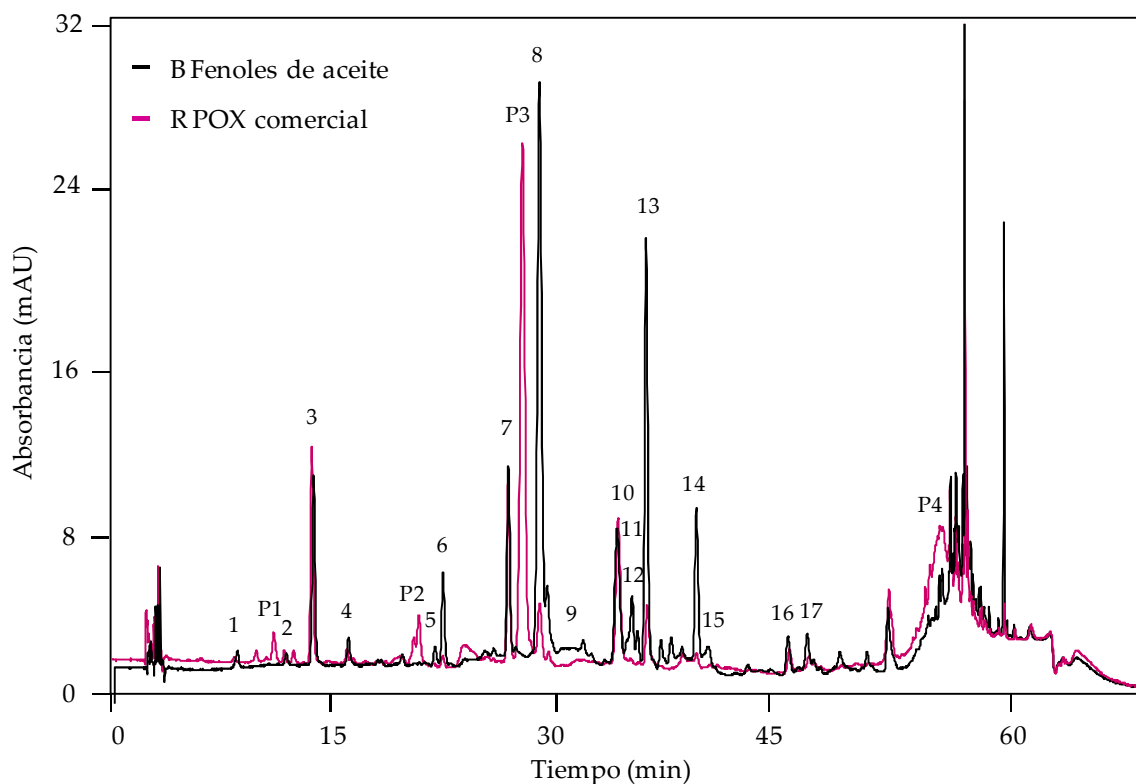


Figura 25. Alteración del perfil fenólico de un AOV de la variedad Arbequina tras dos minutos de incubación con POX de rábano. 1. Hidroxitirosol; 2. Tirosol; 3. *p*-HFA; 4. Ácido vanílico; 5. Ácido *p*-cumárico; 6. Acetato de hidroxitirosol; 7. Ácido *o*-cumárico; 8. FDAO; 9. Isómeros FAO; 10. FDAL; 11. Pinorresinol; 12. Ácido cinámico; 13. 1-acetoxipinorresinol; 14. Luteolina; 15. FAAO; 16. Apigenina; 17. FAAL; P1-4 productos de oxidación por POX.

La Figura 25 deja constancia de la desaparición de los compuestos presentes en el AOV y de la formación de algunos productos de reacción que son fácilmente detectables, ya que eluyen en zonas del cromatograma donde no eluye ningún componente fenólico del aceite, pero cuya estructura se desconoce. Entre estos productos de oxidación cabe destacar el producto de reacción que eluye justo delante de la FDAO y que por su espectro parece ser un producto de oxidación de FDAO.

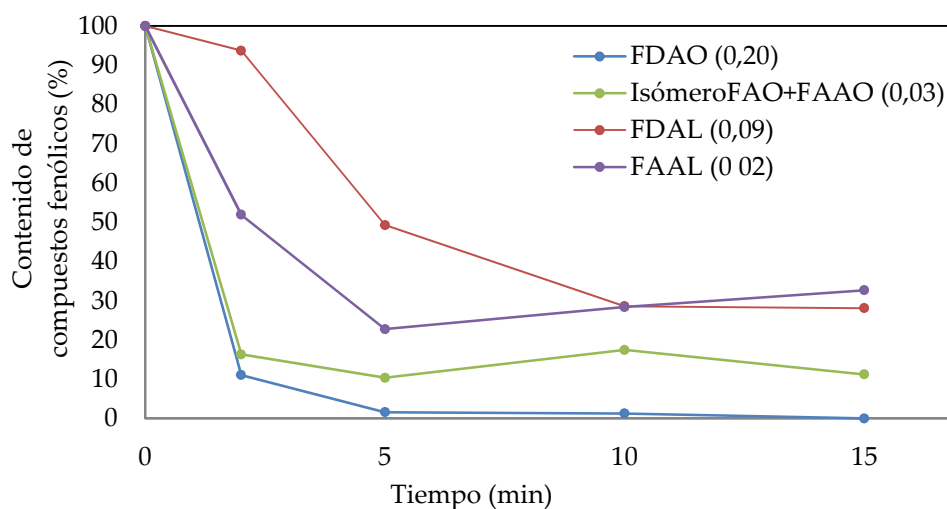


Figura 26. Cinética de la oxidación de los fenoles mayoritarios de un AOV de la variedad Arbequina por POX de rábano. Las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos se indican en la leyenda de la representación gráfica expresadas en mM.

A pesar de las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas existentes entre los extractos fenólicos de Arbequina y Picual (apartado III.5.2. de Materiales y Métodos) en ambos casos los compuestos derivados de la oleuropeína, los *o*-difenoles FDAO y FAAO, fueron los sustrato más rápidamente oxidados, mientras que para los derivados del ligustrósido se obtuvieron cinéticas de degradación más suaves, tal y como se observa en la Figura 26. En la degradación de los flavonoides, luteolina y apigenina, también se observaron cinéticas de oxidación muy diferentes entre ambas que parecen apoyar que la POX oxida más activamente a los *o*-difenoles que a los monofenoles (datos no mostrados).

Para evaluar la actividad de la enzima POX de aceituna frente a los fenoles del AOV se utilizó como sustrato una mezcla de extractos fenólicos de aceites de las variedades Picual y Arbequina. El medio de reacción y las condiciones de incubación fueron las mismas que las empleadas con la POX de rábano comercial. La cinética de la reacción fue, sin embargo, ligeramente distinta. El análisis HPLC de la mezcla de incubación indica que la enzima POX de aceituna es muy poco activa en los dos primeros minutos de reacción, en los que no se

observa prácticamente alteración del perfil fenólico original, y no es hasta el minuto 5 cuando se observa una degradación importante de los principales compuestos secoiridoideos del AOV. A este tiempo de reacción la degradación de los derivados FDAO (8) y FAAO (15) es ya claramente visible en el cromatograma de HPLC (Figura 27).

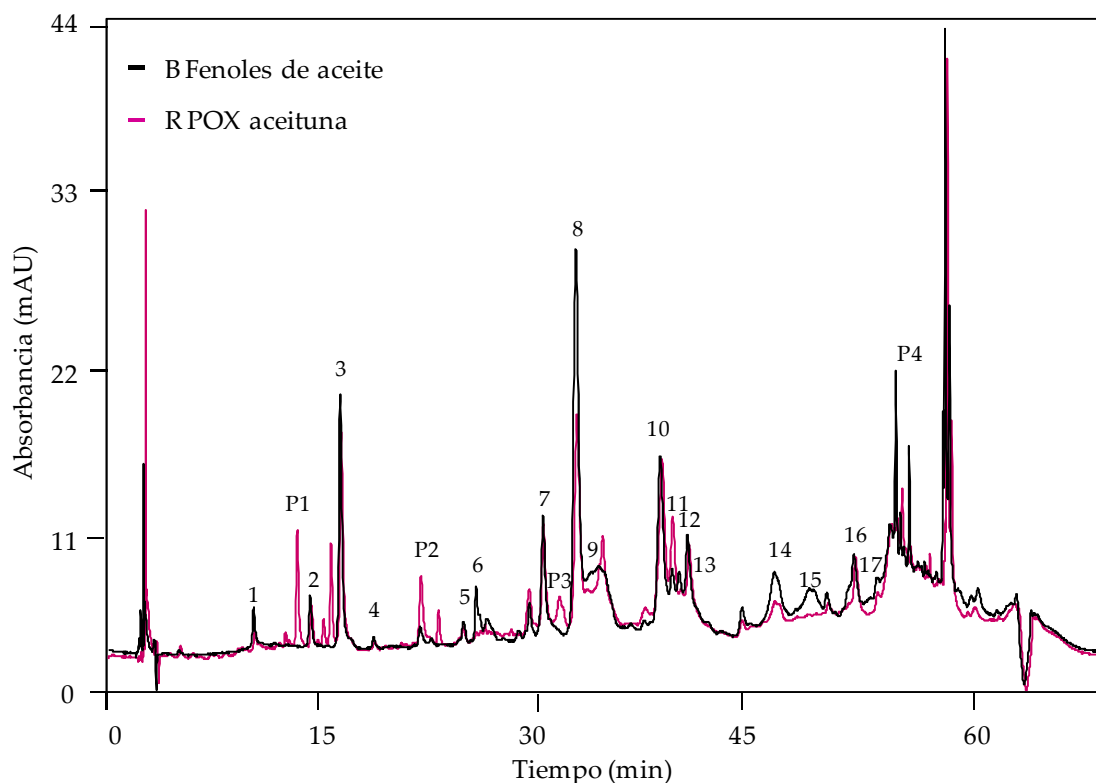


Figura 27. Oxidación del perfil fenólico de la mezcla de aceites de Arbequina y Picual mediante la reacción con la POX de aceituna a tiempo 5 min. 1. Hidroxitiroso; 2. Tiroso; 3. *p*-HFA; 4. Ácido vanílico; 5. Ácido *p*-cumárico; 6. Acetato de hidroxitiroso; 7. Ácido *o*-cumárico; 8. FDAO; 9. Isómeros FAO; 10. FDAL; 11. Pinorresinol; 12. Ácido cinámico; 13. 1-acetoxipinorresinol; 14. Luteolina; 15. FAAO; 16. Apigenina; 17. FAAL; P1-4 productos de oxidación por POX.

La cinética de la degradación oxidativa de los principales derivados secoiridoideos por la POX de aceituna se muestra en la Figura 28 y la correspondiente a los flavonoides, luteolina (14) y apigenina (16), en la Figura 29. Ambas cinéticas se asemejan en cierto modo a la obtenida para la oxidación del guayacol (Figura 18) ya que presentan un cierto periodo de inducción en los dos minutos iniciales, máxima actividad en el minuto 5 y luego un aparente período de agotamiento de la reacción, probablemente atribuible también al hecho de que las

incubaciones se realizaron con un extracto crudo y no con proteína purificada. No obstante, es importante señalar que la incubación con el extracto de POX de aceituna reduce el contenido de los fenoles totales prácticamente un 20% (un 30% el contenido de los *o*-difenoles) en 5 minutos de reacción. No se observa una disminución significativa para los *o*-difenoles a tiempos incubación más largos. Por el contrario, los derivados del ligustrósido se mantienen inalterados a cualquier tiempo de reacción.

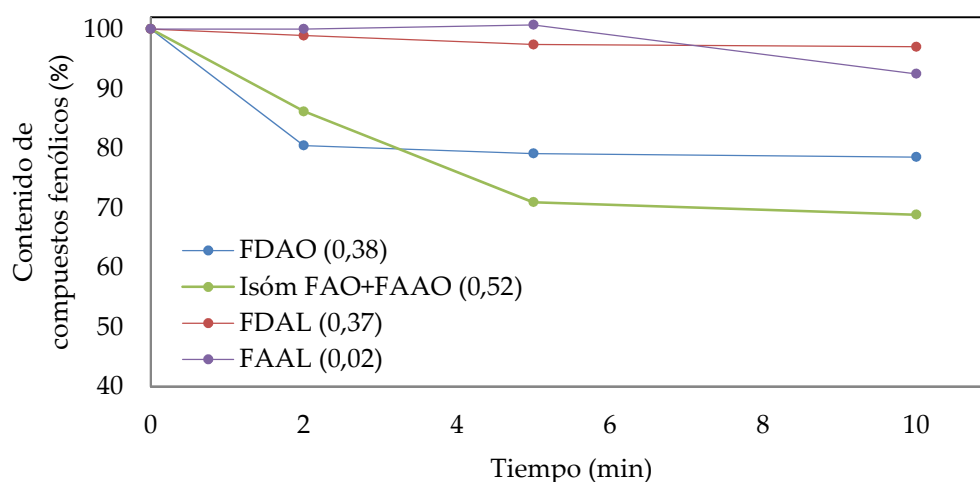


Figura 28. Cinética de la oxidación de los fenoles mayoritarios del AOV por POX de aceituna. Las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos se indican en la leyenda de la representación gráfica expresadas en mM.

Igual que se observa con los derivados secoiridoideos, la POX de aceituna muestra una mayor selectividad por el *o*-difenol, luteolina (tasa de oxidación del 52%), que por el monofenol, apigenina (tasa de oxidación del 23%).

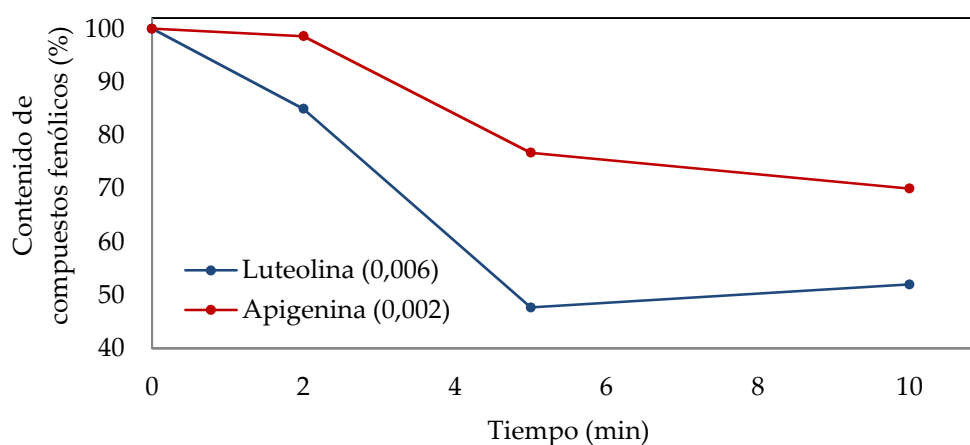


Figura 29. Cinética de la oxidación de los flavonoides del AOV por POX de aceituna. Las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos se indican en la leyenda de la representación gráfica expresadas en mM.

IV.3. ACTIVIDAD POLIFENOL OXIDASA EN EL FRUTO DE ACEITUNA

IV.3.1. Extracción y medida de la actividad polifenol oxidasa

IV.3.1.1 Extracción de proteínas con actividad polifenol oxidasa en aceituna

Los ensayos para cuantificar la actividad PPO en mesocarpo y semilla de aceituna se hicieron empleando como material de partida polvos acetónicos de ambos tejidos que se prepararon según se indica en el apartado de Materiales y Métodos. La cuantificación de la actividad enzimática PPO a partir de mesocarpo fresco o congelado no fue posible, probablemente debido a la abundancia de fenoles en dicho tejido, que dificultan la precisión y repetitividad de las medidas de actividad. El tampón empleado para el aislamiento de proteínas con actividad PPO fue el tampón B descrito en Materiales y Métodos que además de los coadyuvantes ya utilizados para la extracción de proteínas con actividad POX contenía SDS 1 mM, que favorece la activación de la PPO latente y al mismo tiempo inhibe otras actividades enzimáticas también presentes en el mesocarpo de aceituna, como la

β -glucosidasa, que pudieran interferir con la medida de PPO. Para minimizar el riesgo de interferencias por efecto de la β -glucosidasa, especialmente cuando se utilicen sustratos comunes para ambas enzimas como los glucósidos fenólicos, los extractos crudos de PPO obtenidos según se indica en el párrafo anterior fueron parcialmente purificados. Dicha purificación parcial se consiguió mediante una precipitación fraccionada con sulfato amónico entre el 35 y el 60% de saturación de esta sal que permitió eliminar prácticamente todas las proteínas con actividad β -GLU y mantuvo una cantidad significativa de la actividad PPO inicial del extracto (Tabla 10).

Tabla 10. Purificación parcial de la PPO en mesocarpio de aceituna mediante precipitación con sulfato amónico. Los valores de actividad están expresados como U/g peso fresco y se han obtenido mediante el método descrito en el apartado III.2.3.2. de Materiales y Métodos.

	PPO (U/g pf) vs. TBC	β -GLU (U/g pf) vs. p-NPG
EC	166,4	16,5
Sobren 35% sulf amónico	82,4	1
Pellet 35% sulf amónico	75,6	8,8
Pellet 35-60% sulf amónico	60,4	0,052

IV.3.1.2 . Optimización de la medida espectrofotométrica de la actividad polifenol oxidasa

Tal y como se menciona en la Introducción, las proteínas con actividad PPO poseen en realidad dos actividades distintas, monofenolasa y difenolasa, siendo ésta última la que se ha detectado en aceituna y se estudia en este apartado. De este modo, lo más correcto sería hablar de actividad difenolasa en aceituna aunque se utilice el término PPO.

Tal y como se describe en Materiales y Métodos se optimizaron dos métodos para determinar actividad PPO. En la medida espectrofotométrica se determinó la actividad difenolasa de la PPO mediante la cuantificación a 400 nm de la quinona formada a partir del *tert*-butilcatecol (TBC). Entre los sustratos ensayados para la medida de la actividad PPO, se eligió el TBC porque su quinona es más estable y, por tanto, permite una medida más fiable de la actividad. El coeficiente de extinción molar utilizado para cuantificar este producto de reacción fue $1.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Igual que en el caso de la POX, para evaluar la actividad de la PPO de aceituna frente a los compuestos fenólicos más representativos de la aceituna y el AOV fue necesario utilizar un método de identificación y análisis por HPLC.

La optimización de las condiciones de ensayo de actividad PPO se llevaron a cabo utilizando PPO comercial de champiñón. El medio de reacción consistió, tal y como se indica en Materiales y Métodos, en tampón fosfato sódico 25 mM pH 6,5, 1mM SDS y 7 mM TBC y 5-25 μL de extracto enzimático en un volumen final de 1,5 mL y la incubación se realizó directamente en cubeta. El SDS incluido en el tampón de extracción se añadió también al medio de reacción por su capacidad para promover un cambio conformacional en la PPO latente que hace que se incremente la actividad difenolasa (Espín y Wichers, 1999). Para optimizar la medida de actividad PPO de aceituna, se estudió el efecto del pH sobre la reacción de oxidación del TBC. La curva de pH obtenida (Figura 30) indica un valor de pH óptimo de 6,5; aunque la actividad prácticamente no varía en un amplio intervalo de pH entre 5,5 y 7,2. La curva de pH en la que se empleó oleuropeína como sustrato fue muy similar a la obtenida para el TBC, ligeramente desplazada hacia valores de pH ácidos con el máximo de actividad a pH igual a 5.

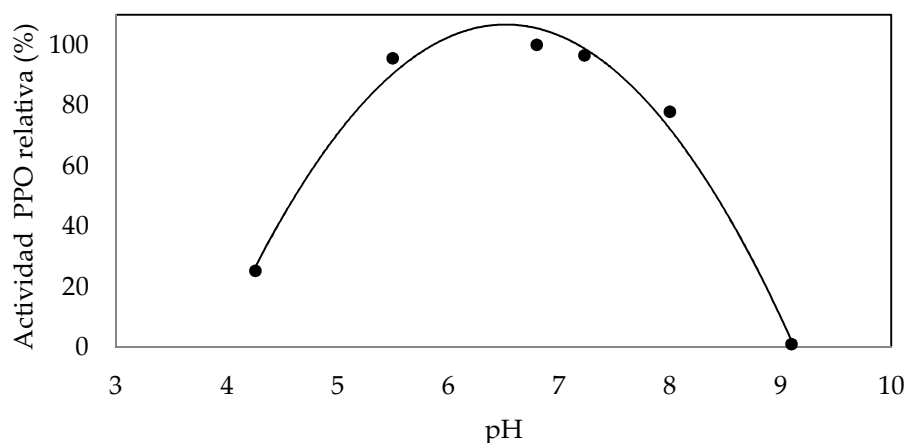


Figura 30. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima PPO de aceituna. Las medidas de actividad PPO se realizaron según el método descrito en el apartado III.2.3.2. de Materiales y Métodos.

La curva de temperatura sobre la PPO muestra el efecto que ésta ejerce sobre la enzima e indica que la actividad se mantiene en torno al 100% en el intervalo 10-50 °C. Por ello, la temperatura que se eligió para cuantificar dicha actividad fue 25 °C, que coincide con la empleada con POX y que está más próxima a la temperatura de batido a la que se acondicionan las pastas de aceituna durante el proceso de obtención del AOV.

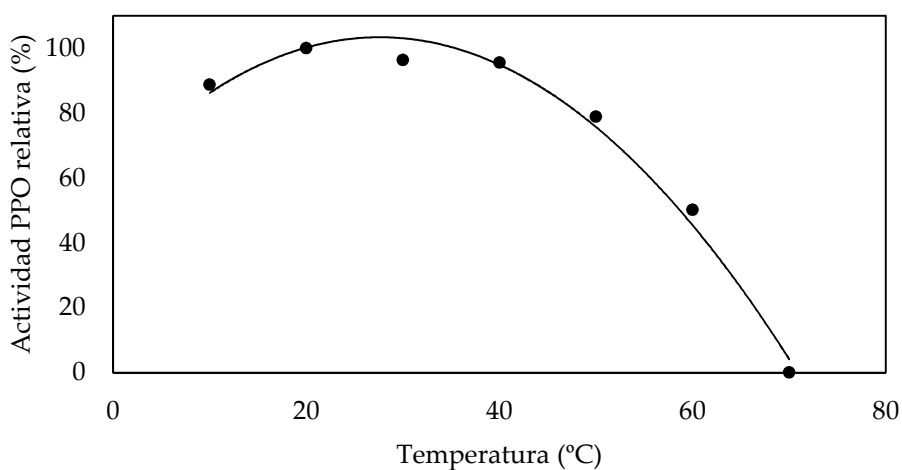


Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PPO de aceituna. Las medidas de actividad PPO se realizaron según el método descrito en el apartado III.2.3.2. de Materiales y Métodos.

IV.3.2. Distribución de la actividad polifenol oxidasa en los distintos tejidos de la aceituna.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de medida se evaluó la contribución de semilla y mesocarpo de aceituna a la carga total de PPO del fruto, comparándose así mismo los niveles de actividad de frutos de Picual y Arbequina (Tabla 11).

Tabla 11. Actividad PPO medida frente a TBC en semilla y mesocarpo de aceituna de las variedades Picual y Arbequina en el punto óptimo de maduración IM = 3. Los extractos crudos se prepararon a partir de polvos acetónicos de mesocarpo y semilla y las determinaciones de actividad enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Material biológico	Actividad PPO (U/g pf)
Semilla Arbequina	3,05 ± 0,07
Semilla Picual	2,34 ± 0,09
Mesocarpo Arbequina	181,69 ± 0,84
Mesocarpo Picual	220,00 ± 8,48

Al contrario de lo que ocurría con la actividad POX, los datos obtenidos permiten concluir que la actividad PPO se localiza prácticamente en su totalidad en el mesocarpo del fruto. Como se observa en la Tabla 11, en ambas variedades el 99,9% de la actividad PPO se localiza en el mesocarpo mientras que en la semilla es casi indetectable. Al no existir diferencias significativas entre los valores de actividad encontrados en el mesocarpo de frutos de ambas variedades, todos los estudios posteriores se llevaron a cabo con extractos procedentes de la variedad Picual.

IV.3.3. Evolución de la actividad polifenol oxidasa durante la maduración de la aceituna.

Teniendo en cuenta que prácticamente toda la carga enzimática de PPO de la aceituna, que presumiblemente participa durante el proceso de extracción del AOV, se

encuentra localizada en el mesocarpo, el polvo acetónico de este material fue elegido para seguir la evolución de dicha actividad a lo largo de la maduración del fruto. La Figura 32 muestra la actividad PPO de los extractos crudos de mesocarpo cuantificada frente a TBC en las variedades Arbequina y Picual en cinco estadios de maduración del fruto (IM = 1-5) durante los meses de septiembre a enero. Tal y como se observa en la Figura 32, y al contrario de lo que sucedía con la POX, en ambas variedades los niveles de PPO van disminuyendo a lo largo de la maduración. El máximo de actividad en la variedad Picual se corresponde con el estadio con IM = 1 (22 SDF) y va disminuyendo hasta reducirse un 63% respecto del valor inicial a las 42 SDF. En Arbequina este descenso es mucho más suave, con una disminución neta del 22% desde el estadio con IM = 1 hasta el estadio con IM = 5.

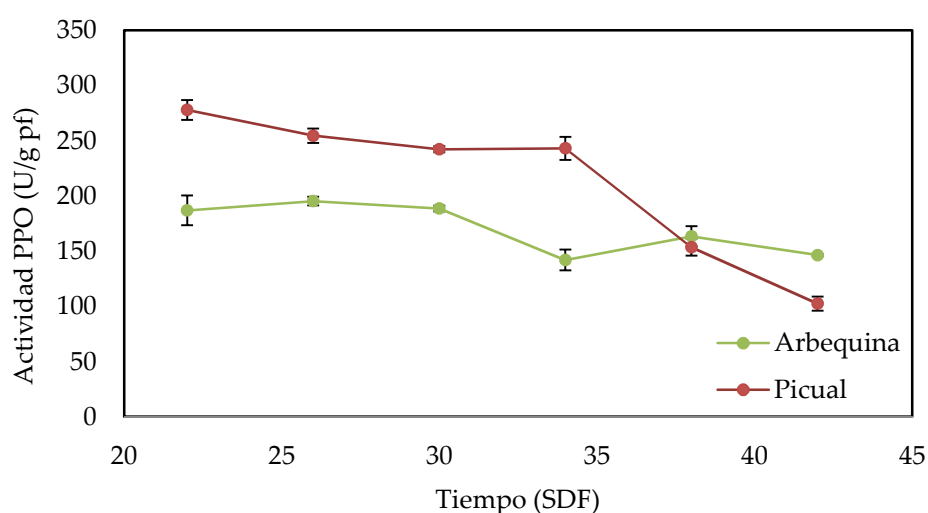


Figura 32. Evolución de la actividad PPO en extractos de polvos acetónicos de mesocarpo de Arbequina y Picual en la campaña 2010-2011 durante la maduración del fruto. Las determinaciones de actividades enzimáticas expresadas como U/g peso fresco de mesocarpo se llevaron a cabo por triplicado tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.3.2.).

Del mismo modo que se procedió con la actividad POX, una vez cuantificada la actividad frente a TBC, y como paso previo a la medida de actividad PPO frente a fenoles del olivo, se estudió el efecto de la adición de fenoles del olivo a la reacción de PPO con TBC. La Tabla 12 muestra el efecto de concentraciones crecientes de oleuropeína sobre la actividad PPO de aceituna medida frente a TBC. Aunque el efecto inhibitor de la oleuropeína es menor

que el observado en la reacción con POX, se comprueba que la oleuropeína inhibe la oxidación de TBC por PPO de aceituna y que este efecto inhibitor aumenta con la concentración de este glucósido fenólico.

Tabla 12. Efecto de la oleuropeína sobre la actividad PPO de aceituna medida frente a TBC. La reacción enzimática se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Concentración oleuropeína (mM)	Actividad PPO vs TBC (U/mL)	Actividad %
0,0	10,8	100
1,0	10,7	99,1
2,5	9,8	90,7
7,0	7,3	68,0

IV.3.4. Actividad polifenol oxidasa y oxidación de fenoles del olivo

Para evaluar la contribución de la PPO a la degradación de compuestos fenólicos que tiene lugar durante el proceso de extracción del AOV, y que afecta tanto a los glucósidos fenólicos inicialmente presentes en la aceituna como a los compuestos secoiridoideos hidrolizados a partir de ellos, se cuantificó directamente la degradación oxidativa de los fenoles mediante análisis por HPLC, tal y como se hizo con la POX.

IV.3.4.1. PPO y oxidación de compuestos fenólicos de la aceituna

Al igual que se hizo en apartados anteriores, los estudios preliminares se llevaron a cabo con la enzima PPO comercial de champiñón con la que se probaron distintas concentraciones de sustrato y diferentes condiciones de incubación hasta llegar a las condiciones definitivas detalladas en Materiales y Métodos. El medio de reacción establecido con la enzima comercial consistió en 1 mL de tampón fosfato sódico, pH 6,5, 25 mM con una concentración 3 mM de oleuropeína al que se añadió 1 μ L de la una solución de enzima comercial de 2,5 mg/mL. La disminución de dicho *o*-difenoel en el medio se cuantificó

analizando por HPLC los medios de reacción frente a los correspondientes blancos (Materiales y Métodos III.5.5.).

Una vez optimizado el método se procedió a estudiar la reacción de oxidación de glucósidos fenólicos con la PPO de aceituna, para ello tal y como se indica en el apartado III.2.3.1. se utilizó un extracto parcialmente purificado de PPO libre de actividad β -GLU.

En primer lugar se estudió la actividad de la PPO de aceituna frente a la oleuropeína, realizándose un estudio cinético a diferentes tiempos de reacción (Figura 33). En paralelo a las reacciones mostradas en la figura y para cada tiempo de incubación se realizaron dos tipos de blancos: uno con enzima inactivada y otro con enzima activa en presencia de un inhibidor específico de PPO, la tropolona, con el fin de confirmar que toda desaparición de oleuropeína correspondía a la degradación oxidativa catalizada por la PPO.

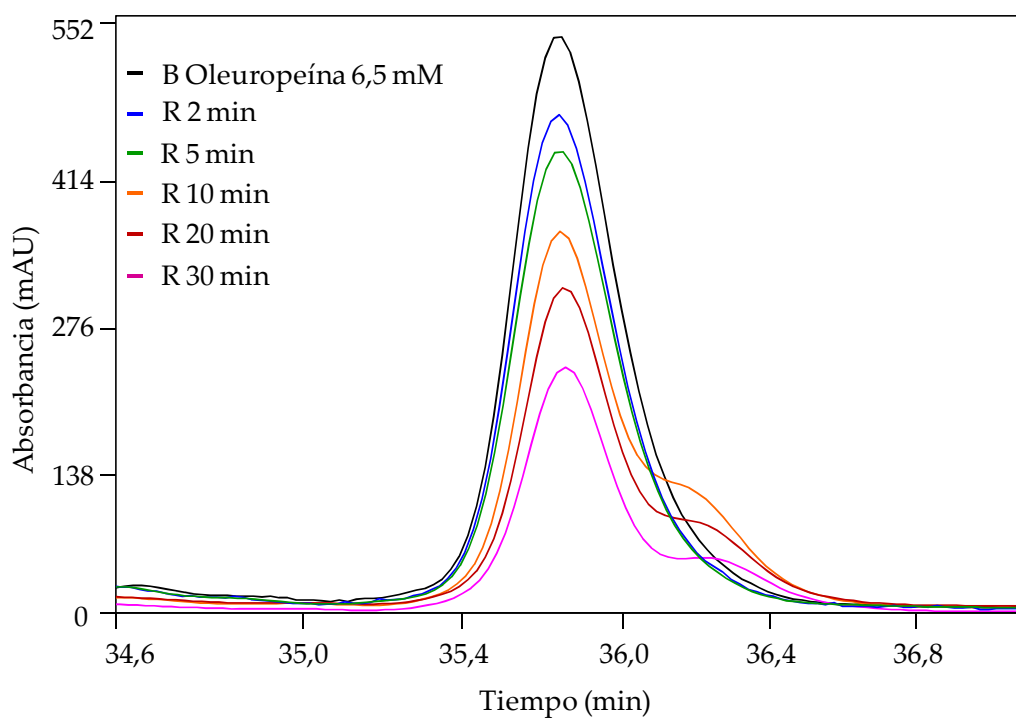


Figura 33. Evolución de la reacción de oxidación de oleuropeína por PPO de aceituna a diferentes tiempos de reacción. La reacción enzimática y el análisis de los datos de las reacciones se llevaron a cabo según los apartados III.2.3.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos.

Las cinéticas obtenidas indican una oxidación lineal a lo largo de 30 minutos y permiten establecer un tiempo óptimo de reacción de 2 min, ya que a este tiempo se obtiene un descenso apreciable de oleuropeína que permite cuantificar máximos niveles de actividad (29,6 U/mL de extracto). Del mismo modo, se estudió el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad PPO. Como se puede observar en la Figura 34, la concentración de oleuropeína a la que se alcanza la saturación estaba en torno a 12 mM.

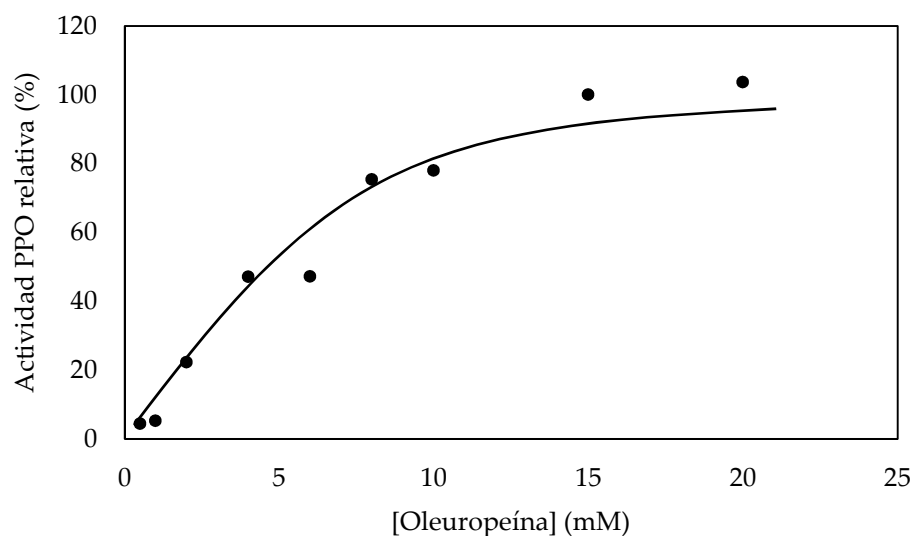


Figura 34. Actividad PPO de aceituna en función de la concentración de oleuropeína.

Se llevaron a cabo ensayos adicionales en los que se utilizaron otros componentes fenólicos característicos del fruto como sustratos de la PPO de aceituna. Los valores de actividad obtenidos, expresados como actividad relativa, están recogidos en la Tabla 13 y pueden considerarse indicativos de la especificidad de la enzima.

Tabla 13. Actividad PPO frente a los compuestos fenólicos del fruto aislados como sustrato.

Sustrato	PPO Actividad relativa (%)
Hidroxitirosol 6,5 mM	100
Tirosol 6,5 mM	1,0
Demetiloleuropeína 6,5 mM	9,7
Verbascósido 6,5 mM	25,6
Oleuropeína 6,5 mM	37,4

Resulta especialmente interesante que pese a obtenerse muy baja actividad relativa con el tirosol (1%) se detecte actividad frente a este sustrato, un monofenol, lo que indicaría una cierta actividad monofenolasa de la PPO de aceituna. Con el fin de corroborar esta observación, se realizaron nuevas incubaciones de PPO con tirosol a tiempos de incubación más largos. La Figura 35, muestra el cromatograma de la reacción con tirosol (pico 2) a tiempo 30 min y en él se observa la formación de hidroxitirosol (1) como producto de la oxidación del tirosol demostrándose, por tanto, la existencia de actividad tirosinasa o monofenolasa.

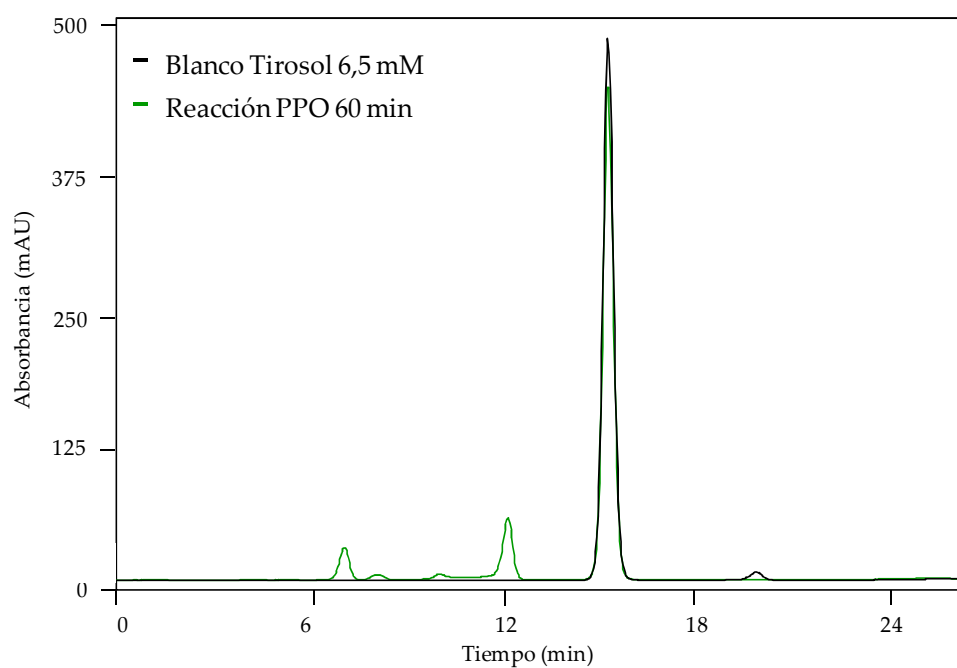


Figura 35. Reacción de oxidación de tirosol por PPO de aceituna a 60 min. La reacción enzimática y el análisis de los datos de las reacciones se llevaron a cabo según los apartados III.2.3.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos.

Por otra parte, la evolución de la reacción de PPO con hidroxitirosol que se muestra en el cromatograma de la Figura 36 permite comprobar que la PPO oxida los productos de oxidación inicialmente formados (2) al mismo tiempo que continúa la degradación oxidativa del hidroxitirosol (1).

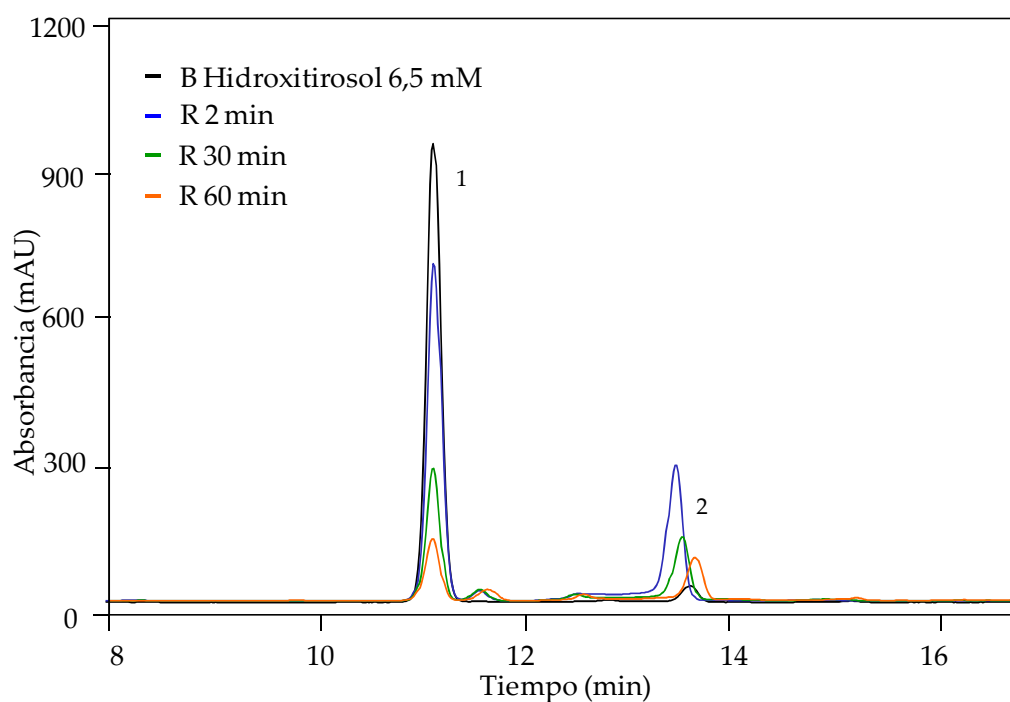


Figura 36. Evolución de la reacción de oxidación de hidroxitirosol por PPO de aceituna durante 60 min. La reacción enzimática y el análisis de los datos de las reacciones se llevaron a cabo según los apartados III.2.3.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos.

Para avanzar en la caracterización del papel desempeñado por la PPO en la degradación de compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV se realizaron varias incubaciones de la enzima PPO con mezclas de sustratos obtenidos a partir de extractos fenólicos de aceituna. Las incubaciones se llevaron a cabo según lo dispuesto en el apartado X de Materiales y Métodos. Como se observa en las Tablas 14 y 15 la actividad relativa frente a los distintos sustratos varía en función de los compuestos fenólicos presentes y de sus concentraciones. En cualquier caso a partir de estos ensayos de competencia de sustratos puede concluirse que la PPO de aceituna muestra mayor selectividad por el acetato de hidroxitirosol y el verbascósido y no es activa frente a tirosol, nuzhénido y ligustrósido en presencia de *o*-difenoles.

Tabla 14. Actividad PPO frente a una mezcla (mezcla x) de compuestos fenólicos de la aceituna

Sustrato	PPO Actividad relativa (%)
Hidroxitirosol 0,40 mM	38,9
Acetato de hidroxitirosol 6,44 mM	81,1
Demetiloleuropeína 3,63 mM	38,7
Verbascósido 0,09 mM	100

Tabla 15. Actividad PPO frente a una mezcla (Mezcla X) de compuestos fenólicos de la aceituna

Sustrato	PPO Actividad relativa (%)
Hidroxitirosol 0,50 mM	0
Tirosol 1,71 mM	7,63
Acetato de hidroxitirosol 0,85 mM	100
Demetiloleuropeína 3,32 mM	0,80
Verbascósido 0,50 mM	68,40
Oleuropeína 4,58 mM	32,10
Ligustrósido 4,14 mM	0

IV.3.4.2. PPO y oxidación de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen

Como en apartados anteriores tanto el medio de reacción como las condiciones experimentales de incubación y el análisis de la degradación de sustratos y formación de productos fueron establecidos en ensayos preliminares realizados con la PPO de champiñón disponible comercialmente. El medio de reacción consistió en 1,81 mL de tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,5, 1 mM SDS, 240 μ L de extracto fenólico de AOV y 2-50 μ L de extracto enzimático. La evolución de la reacción se siguió a lo largo de 60 minutos de incubación.

La Figura 37 muestra el análisis por HPLC de la cinética de oxidación de un extracto fenólico de AOV catalizada por un extracto parcialmente purificado de PPO de aceituna. Tal y como se observó en las reacciones previas con PPO de champiñón los compuestos secoiridoideos derivados de la oleuropeína son los sustratos más rápidamente oxidados, observándose ya en los primeros 5 minutos una degradación importante del acetato de hidroxitirosol (6), FDAO (8), FAAO (15) y sus isómeros (9). De los datos obtenidos se deduce que la oxidación no progresa de forma lineal y la velocidad de la reacción desciende notablemente a partir de los 20 minutos. A partir de este tiempo la reacción sigue avanzando aunque más lentamente debido a la escasa disponibilidad de sustratos presentes en el medio de reacción. En el cromatograma además del descenso de los compuestos fenólicos mencionados se identifican una serie de productos de oxidación, que también se obtuvieron en las reacciones modelo realizadas con PPO de champiñón.

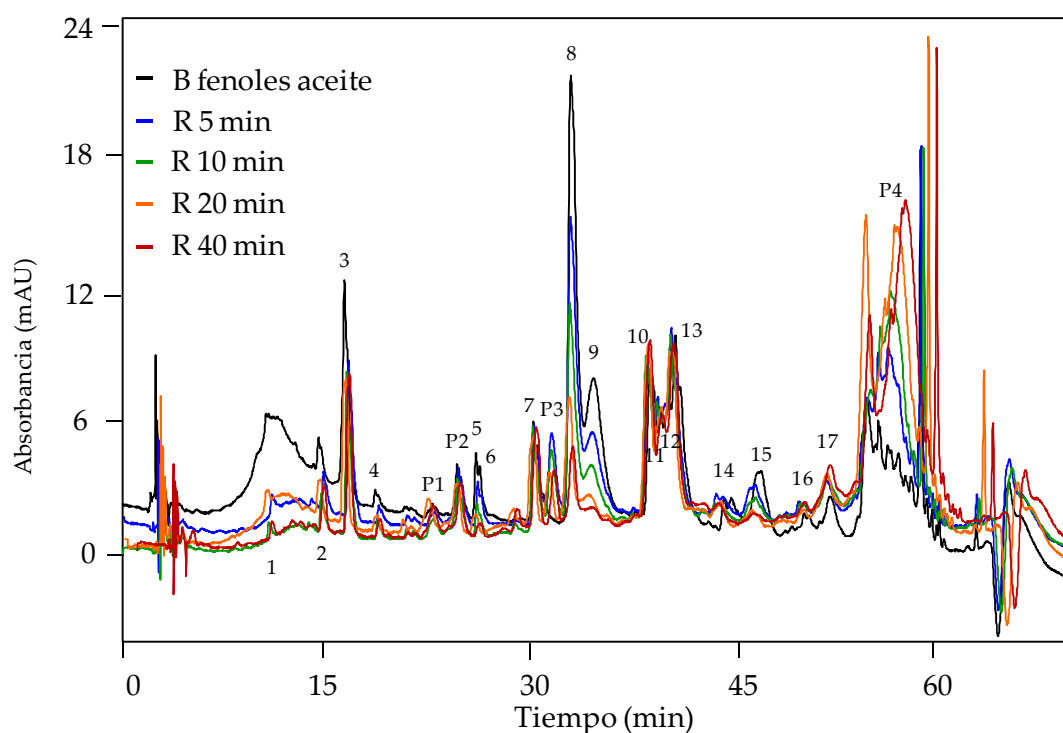


Figura 37. Alteración del perfil fenólico de un AOV a distintos tiempos de incubación con PPO de aceituna. 1. Hidroxitirosol; 2. Tirosol; 3. *p*-HFA(patrón interno 1); 4. Ácido vanílico; 5. Ácido *p*-cumárico; 6. Acetato de hidroxitirosol; 7. Ácido *o*-cumárico (patrón interno 2); 8. FDAO; 9. Isómeros FAAO; 10. FDAL; 11. Pinorresinol; 12. Ácido cinámico; 13. 1-acetoxipinorresinol; 14. Luteolina; 15. FAAO; 16. Apigenina; 17. FAAL; P1-4 productos de oxidación por PPO.

La Figura 38 muestra la degradación oxidativa de los cuatro compuestos secoiridoideos mayoritarios en el AOV a lo largo de 40 minutos de reacción. De nuevo se observa que los derivados de la oleuropeína (FDAO y FAAO) son los sustratos más susceptibles a la oxidación degradándose casi en un 50% en sólo 10 minutos de reacción, mientras que los niveles de los derivados secoiridoideos del ligustrósido (FDAL y FAAL) no se vieron afectados.

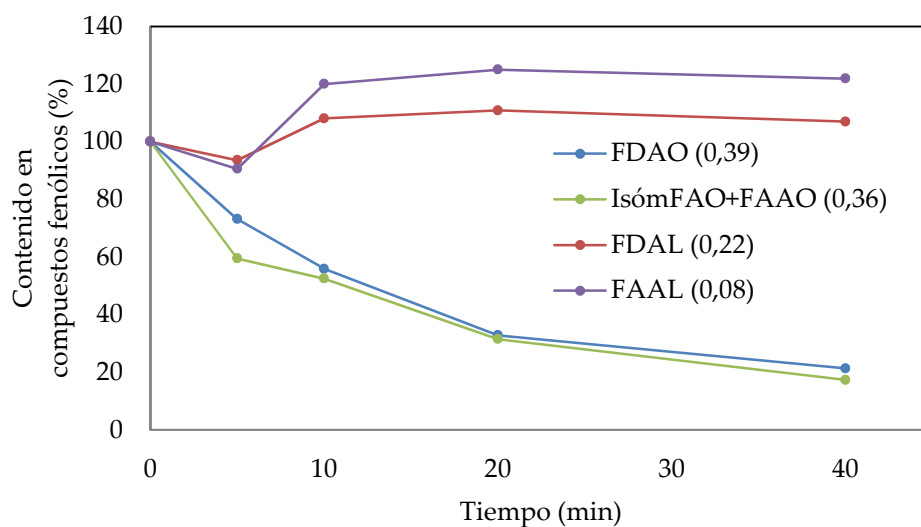


Figura 38. Cinética de la oxidación de los compuestos fenólicos mayoritarios del AOV por la PPO de aceituna. Las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos se indican en la leyenda de la representación gráfica expresadas en mM.

IV.4. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD POX EN SEMILLA DE ACEITUNA

IV.4.1. Purificación de proteínas con actividad peroxidasa en semilla de aceituna

El protocolo empleado para purificar proteínas con actividad POX de semilla de aceituna se basó en cuatro etapas básicas: obtención del extracto crudo, precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. En cada uno de los puntos de la purificación se midió la actividad POX frente al sustrato colorimétrico guayacol, a la oleuropeína (principal glucósido fenólico de la aceituna) y a los compuestos secoiridoideos (fenoles mayoritarios en el AOV).



Figura 47. Semilla de aceituna madura (marrón) e inmadura (verde).

IV.4.1.1. Obtención del extracto crudo

A pesar de haber realizado extractos enzimáticos a partir de semillas de aceituna y de polvos acetónicos de semillas y obtener el mismo valor de actividad POX en ambos casos, expresada como U/g de peso fresco, se decidió elegir como material de partida el polvo acetónico de semilla, ya que un seguimiento de la actividad POX en semillas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ permitió observar un ligero descenso de ésta cuando las semillas no eran congeladas previamente con N_2 líquido. Una perfecta congelación de las semillas con N_2 líquido permitió conservar la actividad POX incluso durante cuatro años. La cuantificación total de proteínas sí se vio afectada en parte a causa del proceso de congelación, sin embargo, debido a la total

conservación de la actividad peroxidasa podemos concluir que las proteínas con dicha actividad permanecieron bien conservadas después de cuatro años.

Tabla 16. Conservación de la actividad POX en congelación con N₂ líquido en el tiempo.

	Arbequina diciembre 2008			Picual diciembre 2008		
	U/g	mg	U/mg	U/g	mg	U/mg
Semilla fresca	12,76	23,20	0,27	15,82	29,00	0,27
Semilla congelada 2 años	15,10	20,69	0,36	12,35	19,57	0,32
Semilla congelada 4 años	11,72	16,25	0,35	13,69	15,06	0,32

El hecho de trabajar con polvos acetónicos permite disponer de un material más homogéneo y estable para poder llevar a cabo experimentos durante largos períodos de tiempo como es el caso de la purificación de la POX de semilla.

La variedad Arbequina fue escogida por ser una de las más representativas de nuestro país. El estadio seleccionado para dicha purificación fue el correspondiente a las 38 SDF, que coincide con el momento óptimo de maduración comercial de esta variedad, aunque también se realizó la purificación con otros estadios como se mostrará en las tablas incluidas en los anexos.

IV.4.1.2. Precipitación con sulfato amónico

Debido a la elevada cantidad de proteínas de reserva localizadas en la semilla de la aceituna fue necesario llevar a cabo un proceso de precipitación fraccionada con sulfato amónico para poder retirar todas las proteínas sin actividad POX. Utilizando la metodología descrita en Materiales y Métodos se probaron distintos grados de saturación de esta sal hasta conseguir las concentraciones óptimas para purificar las proteínas con actividad POX. De tal

manera que se realizó un primer “corte” con un 30% de sulfato amónico que permitió eliminar una gran cantidad de proteínas que no presentaban actividad POX. Posteriormente, una segunda precipitación con 80% de sulfato amónico, permitió precipitar todas las proteínas con actividad POX. Con el fin de cuantificar con mayor precisión las proteínas presentes en este extracto y medir la actividad POX sin interferencias debidas al elevado contenido de sales del precipitado se retiró el exceso de sales utilizando una columna PD-10 (Sephadex G-25), que además permitiera acondicionar la muestra para las posteriores cromatografías de intercambio iónico. Esta primera etapa del proceso de purificación de la POX de semilla de aceituna permitió conservar un 90% de la actividad POX medida tanto frente a guayacol como frente a la oleuropeína y al mismo tiempo reducir en un 95% el contenido proteico inicial del extracto de modo que con este sencillo paso se aumentó muy significativamente la actividad específica de la enzima alcanzándose un factor de purificación de 12,8. Cabe destacar que este factor de purificación tan elevado podría deberse a la presencia de posibles inhibidores presentes en el EC que desaparecen una vez que se produce la precipitación con sulfato amónico. Por tanto, el valor de actividad real en el EC cabría esperar que fuere mayor que el obtenido, de manera que el factor de purificación en este primer paso fuese algo menor.

IV.4.1.3. Cromatografía de intercambio aniónico

El extracto obtenido a la salida de la columna PD-10 se sometió una primera cromatografía de intercambio, en este caso, aniónico. Se empleó para ello una columna HiTrap Q HP equilibrada con tampón HEPES 50 mM, pH 7,2. La figura muestra el perfil cromatográfico obtenido, en el que aparece un primer pico que eluye antes de dar comienzo el gradiente, que corresponde a proteína no retenida, y varios picos de proteína inicialmente retenida en la columna que van siendo eluidos a medida que va aumentando el gradiente de fuerza iónica (HEPES 50 mM, pH 7,2 NaCl 1,5 M). De las fracciones retenidas, únicamente el pico de proteína eluido cuando se alcanza una concentración en el intervalo 0,24-0,48 M de NaCl, mostró actividad POX, tal y como se observa en la Figura 48. Este pico,

constituido por cinco fracciones de 1 mL representó entre un 1-5% de la actividad POX cargada en la columna. Con el fin de obtener la fracción de máxima pureza posible se seleccionó y concentró únicamente la fracción de máxima actividad, que se designó como POXan. La fracción que contenía la POXan se concentró con un filtro de membrana de 30 kDa. El pico de proteína no retenida en la columna y, por tanto, de naturaleza no aniónica, también mostró actividad POX, representando en torno al 70-80% de la actividad total cargada en la columna. En este segundo paso de la purificación se recupera un 80-90% de la actividad total de entrada y se consigue aislar POXan con una elevada actividad específica que parece compatible con la purificación a homogeneidad de dicha isoforma.

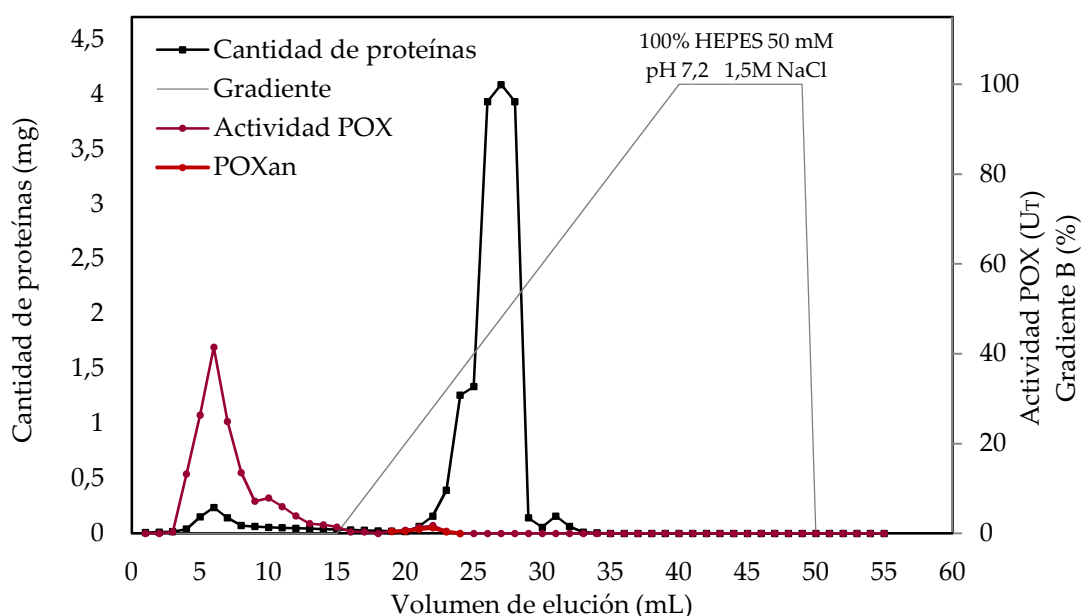


Figura 48. Cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap Q HP por FPLC. La actividad enzimática, expresada como U_T, se cuantificó según el método espectrofotométrico descrito en el apartado III.2.2.2. Los valores de proteínas se cuantificaron según el método Bradford descrito en el apartado III.6.1.

IV.4.1.4. Cromatografía de intercambio catiónico

La fracción no retenida en la cromatografía aniónica se consideró neutra o catiónica y se sometió a una segunda cromatografía de intercambio, en este caso, catiónico. Se empleó para

ello una columna HiTrap CM FF equilibrada con tampón HEPES 50 mM, pH 7,2. La Figura 49 muestra el perfil cromatográfico obtenido, en el que aparece un pico que eluye antes de dar comienzo el gradiente y un pequeño y único pico de proteína retenido en la columna que eluye al comienzo del gradiente de fuerza iónica desarrollado con HEPES 50 mM, pH 7,2 NaCl 1,5 M. Concretamente el pico de proteína con actividad POX comienza a eluir cuando se alcanza una concentración 0,38 M de NaCl y finaliza a 0,68 M de NaCl. Este pico se encontró repartido entre cinco fracciones y mostró una actividad POX que representó entre un 4-12% de la actividad total que se cargó en la columna. De nuevo, y con el objetivo de alcanzar el máximo grado de pureza, se seleccionó y concentró únicamente la fracción cromatográfica de máxima actividad que se designó como POXcat. Se concentró con un filtro de membrana de 30 kDa. El pico no retenido en la columna también poseía actividad POX, en torno al 40-50% de la actividad inicial que se introdujo en la columna. En esta cromatografía se recuperó en torno a un 55% de la actividad cargada inicialmente en la columna.

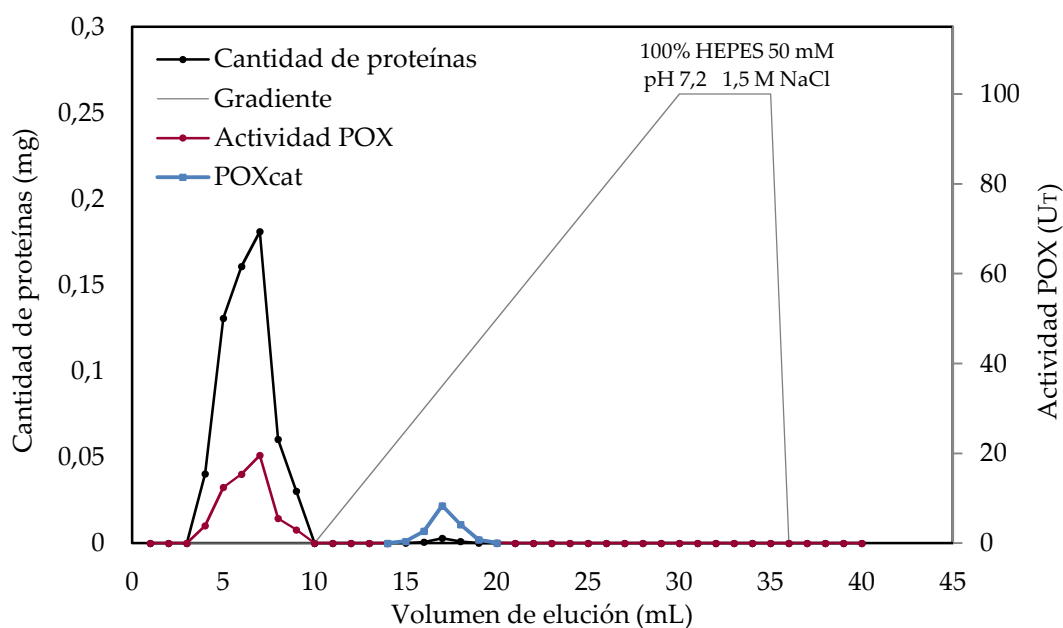


Figura 49. Cromatografía de intercambio catiónico en una columna CM FF por FPLC. La actividad enzimática, expresada como U_T, se cuantificó según el método espectrofotométrico descrito en el apartado III.2.2.2. Los valores de proteínas se cuantificaron según el método Bradford descrito en el apartado III.6.1..

Antes de proceder a la caracterización de las dos fracciones purificadas, POXan y POXcat, ambas fueron acondicionadas en columnas PD-10 para eliminar el exceso de NaCl procedente de los gradientes de fuerza iónica empleados en ambas cromatografías. En la tabla 17 se resume todo el proceso de purificación de proteínas con actividad POX presentes en semilla de aceituna de la variedad Arbequina.

Tabla 17. Purificación de la peroxidasa de semilla de aceituna de la variedad Arbequina a partir de polvo acetónico de 38 SDF.

Etapas de purificación	Proteína (mg)	Act. total (U_T)	Act. específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
EC	376,38	180,66	0,48	1	100
Pellet 30-80%	26,63	163,79	6,14	12,8	90,66
POXan	5,80	1,63	281,03	585,48	0,90
POXcat	1,05	3,49	3323,81	6924,60	1,93

IV.4.1.5. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La pureza de las fracciones aisladas, POXan y POXcat, fue evaluada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, tal y como se detalla en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. En la Figura 50 se observa cómo a medida que se avanza en el proceso de purificación ambas isoformas quedan prácticamente libres de otras proteínas contaminantes. A partir de la recta de calibrado construida con los patrones de proteínas utilizados en la electroforesis, se determinó la masa molecular de los monómeros de ambas enzimas. Podemos afirmar que el monómero correspondiente a la isoforma catiónica se consigue purificar a homogeneidad electroforética y presenta un peso molecular de 44 kDa, mientras que el correspondiente a la isoforma aniónica, también

aparentemente purificado a homogeneidad electroforética, muestra un peso molecular menor en torno a los 18 kDa.

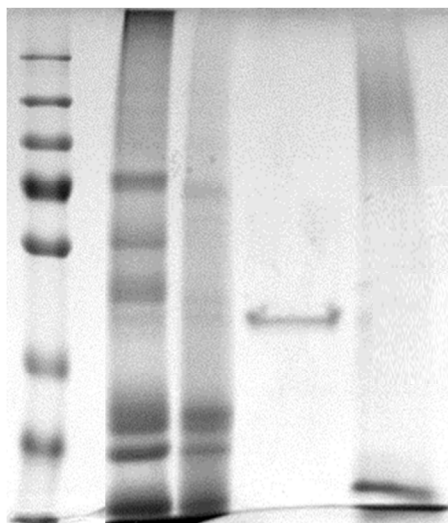


Figura 50. Gel de electroforesis SDS-PAGE de extractos enzimáticos en las distintas etapas de purificación. (1) patrones de proteínas de pesos moleculares, (2) extracto crudo del polvo acetónico de semilla, (3) extracto resultante de la precipitación con sulfato amónico, (4) POXcat, (5) POXan.

IV.4.2. Caracterización de las peroxidasa purificadas de semilla de aceituna

Con el objeto de caracterizar las dos isoformas de POX de aceituna purificadas, POXan y POXcat, se determinaron los parámetros cinéticos básicos de ambas enzimas.

IV.4.2.1 Especificidad de sustrato y selectividad de las isoformas de peroxidasa de aceituna

La actividad de POXan y POXcat se ensayó tanto con sustratos colorimétricos sintéticos como con los compuestos fenólicos mayoritarios de la aceituna y el AOV, que serían los sustratos naturales de la POX de aceituna, y en el proceso de extracción del aceite.

IV.4.2.1.1. *Especificidad y selectividad de POXan y POXcat frente a los compuestos fenólicos de la aceituna*

En la Tabla 18 se muestran los datos de actividad relativa de ambas isoformas de POX de aceituna frente a los principales compuestos fenólicos presentes en la pulpa de aceituna. Este primer estudio de especificidad se realizó llevando a cabo incubaciones independientes con cada compuesto a concentraciones 6,5 mM, tal y como se indica en el apartado III.4.1. de Materiales y Métodos. La demetiloleuropeína utilizada fue fraccionada y purificada a partir de un extracto de fenoles de frutos de la variedad Arbequina. La POXan muestra mayor afinidad por el verbascósido, mientras la POXcat tiene máxima actividad con la demetiloleuropeína. El sustrato menos afín para ambas isoformas fue el tirosol, el único monofenol de los cinco sustratos naturales ensayados.

Tabla 18. Actividad de las isoformas purificadas de peroxidasa frente a los principales compuestos fenólicos de la aceituna. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado X de Materiales y Métodos.

Sustrato (6,5 mM)	POX an Actividad relativa (%)	POX cat Actividad relativa (%)
Hidroxitirosol	79,31	88,12
Tirosol	41,50	54,21
Demetiloleuropeína	29,90	100
Verbascósido	100	83,39
Oleuropeína	93,93	98,96

Una vez que se comprobó que las isoformas tenían actividad frente a todos los sustratos empleados, se realizaron ensayos de competencia con mezclas complejas que contenían todos los fenoles de la pulpa anteriormente mencionados y además incorporaban ligustrósido y nucénido (Figura 12). Estos dos últimos compuestos, no disponibles comercialmente, fueron extraídos de la semilla de aceituna ya que, como se indica en el apartado III.5.3. de Materiales y Métodos. El nucénido es el compuesto fenólico mayoritario

en el cotiledón, y el tegumento de la semilla resultó ser el tejido con mayores niveles de ligustrósido del fruto.

Una vez obtenida una mezcla con concentraciones adecuadas de los principales compuestos fenólicos extraídos de pulpa y semilla (Mezcla 1) se realizaron las correspondientes incubaciones en las condiciones descritas en el apartado III.2.2.3. de Materiales y Métodos. Los cromatogramas correspondientes a las reacciones de 2 min se muestran en la figuras 51 y 52 y los resultados obtenidos se emplearon para confeccionar la Tabla 19.

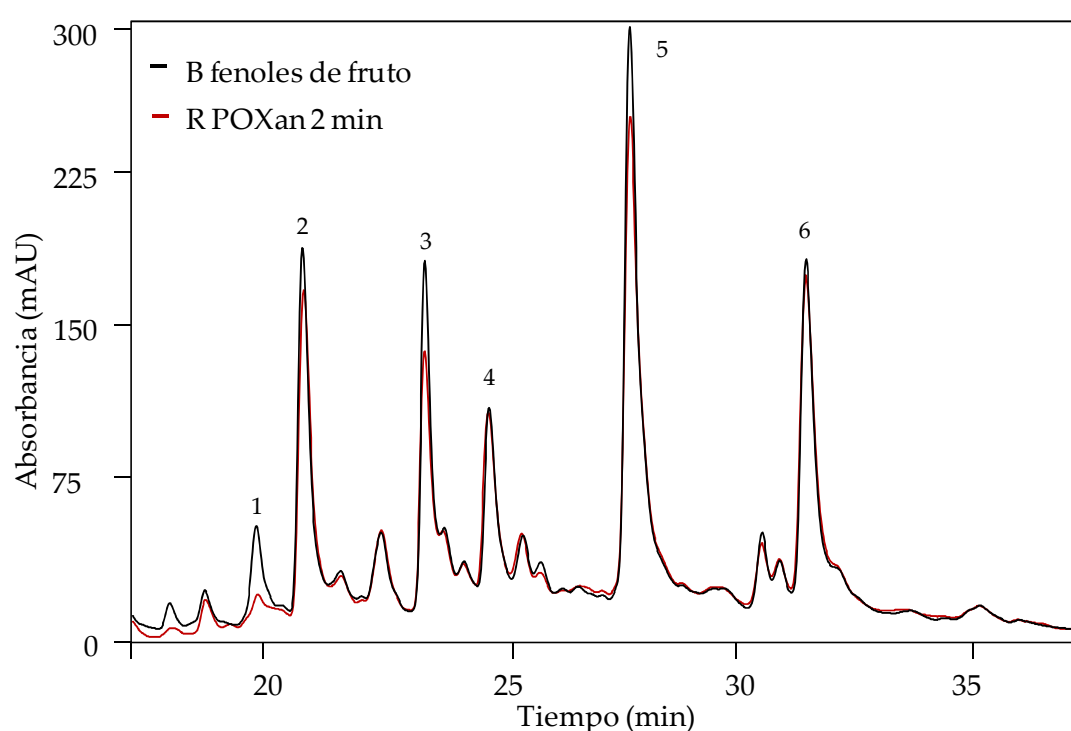


Figura 51. Actividad oxidativa de POXan frente a un extracto fenólico de aceituna que contiene cantidades variables de los principales compuestos fenólicos del fruto (Mezcla 1). La reacción enzimática y el análisis de dicha reacción se llevaron a cabo según se describe en los apartados III.2.2.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos. 1.Acetato de hidroxitirosol; 2.Demetiloleuropeína; 3.Verbascósido; 4.Nucénido; 5.Oleuropeína; 6.Ligustrósido.

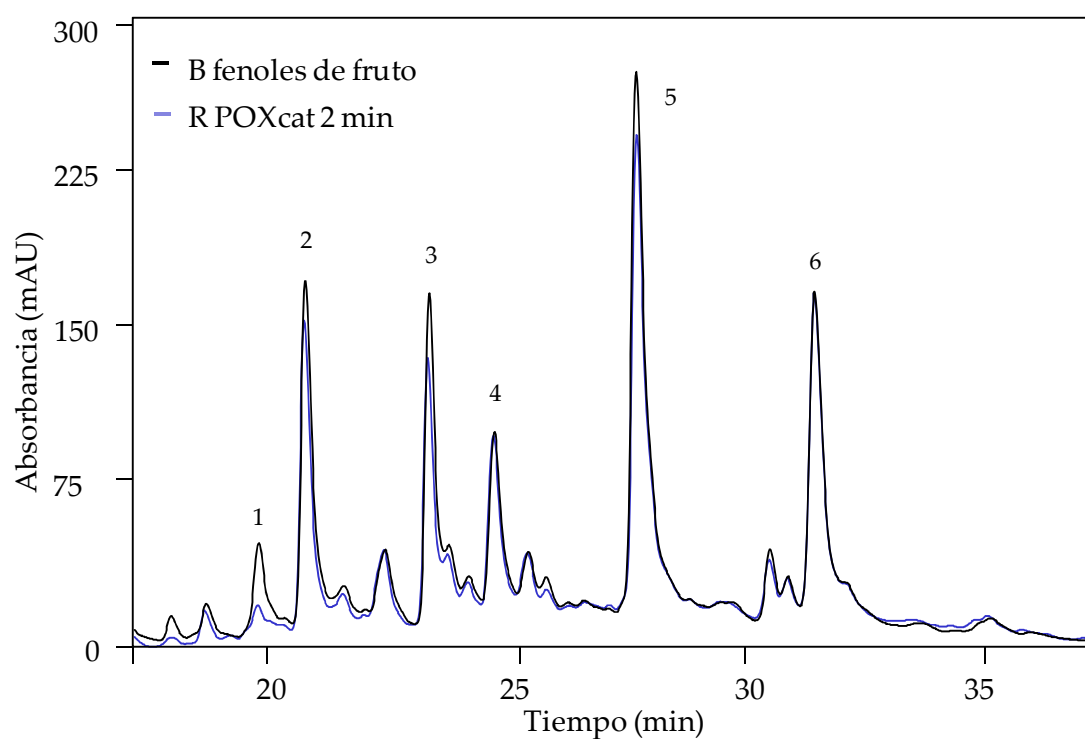


Figura 52. Actividad oxidativa de POXcat frente a un extracto fenólico de aceituna que contiene cantidades variables de los principales compuestos fenólicos de la aceituna (Mezcla 1). La reacción enzimática y el análisis de dicha reacción se llevaron a cabo según se describe en los apartados III.2.2.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos. 1.Acetato de hidroxitirosol; 2.Demetiloleuropeína; 3.Verbasósido; 4.Nucénido; 5.Oleuropeína; 6.Ligustrósido.

Tabla 19. Actividad de las isoformas POXan y POXcat frente a un extracto fenólico de aceituna que contiene cantidades variables de los principales compuestos fenólicos de la aceituna (Mezcla 1).

Sustrato (Mezcla 1)	POX an Act relativa (%)	POX cat Act relativa (%)
Hidroxitirosol 0,49 mM	5,50	5,01
Tirosol 1,71 mM	0	0
Acetato de hidroxitirosol 0,76 mM	100	100
Demetiloleuropeína 2,19 mM	10,22	25,78
Verbascósido 0,49 mM	35,73	42,38
Nucénido 1,97 mM	0	0
Oleuropeína 4,58 mM	11,72	16,76
Ligustrósido 4,14 mM	0	0

A la vista de los datos recogidos en la Tabla 19 se puede afirmar que en presencia de una mezcla compleja con concentraciones variables de hidroxitirosol, tirosol, acetato de hidroxitirosol, demetiloleuropeína, verbascósido, nucénido, oleuropeína y ligustrósido las dos isoformas de POX purificadas muestran mayor selectividad (100%) por el acetato de hidroxitirosol a pesar de este compuesto estuviera presente a una concentración relativamente baja (0,76 mM). El verbascósido, también a muy baja concentración (0,49 mM), fue el segundo compuesto en orden de preferencia (35,73% para POXan y 42,38% para POXcat). Ambas isoformas presentaron una selectividad similar por demetiloleuropeína y oleuropeína y nula actividad frente a tirosol, nucénido y ligustrósido, todos ellos monofenoles. Estos datos son concordantes con los obtenidos las reacciones del EC de semilla con fenoles de fruto en los que, sin embargo, la máxima actividad oxidativa se encontró frente al verbascósido, al no existir acetato de hidroxitirosol en las mezclas empleadas.

Dada la complejidad de las interacciones entre compuestos antioxidantes en mezclas complejas, y con el fin de conseguir información adicional sobre la selectividad de POXan y POXcat, se realizaron nuevas incubaciones con extractos fenólicos de distinta concentración.

La Tabla 20 muestra la actividad de ambas proteínas frente a un nuevo extracto fenólico (Mezcla 2) en el que no existe acetato de hidroxitirosol y los tres glucósidos mayoritarios del fruto se encuentran en concentraciones equimolares (5 mM). En este caso, se observó una actividad relativa del 100% con el verbascósido, como ocurría en la reacción del EC de POX de semilla, y se comprobó que en presencia de concentraciones idénticas de oleuropeína y demetiloleuropeína la enzima muestra mayor selectividad por esta última. A pesar de que la concentración de ligustrósido en esta incubación también fue 5 mM no se observó reacción con este sustrato ni con ninguno de los otros dos monofenoles presentes (tirosol y nucénido).

Tabla 20. Actividad de las isoformas POX_{an} y POX_{cat} frente a un extracto fenólico de aceituna que contiene cantidades variables de los principales compuestos fenólicos de la aceituna (Mezcla 2).

Sustrato (Mezcla 2)	POX _{an} Act relativa (%)	POX _{cat} Act relativa (%)
Hidroxitirosol 0,79 mM	0	0
Tirosol 3,9 mM	0	0
Acetato de hidroxitirosol 0 mM	0	0
Demetiloleuropeína 5,05 mM	51,60	66,29
Verbascósido 1,03 mM	100	100
Nucénido 5,06 mM	0	0
Oleuropeína 5,36 mM	4,00	3,80
Ligustrósido 5,00 mM	0	0

Las mezclas 1 y 2 de compuestos fenólicos de fruto mostradas anteriormente se corresponden con mezclas de extractos fenólicos concentrados obtenidos a partir de pulpa de aceituna y tegumento de semilla, diseñadas de tal manera que permitiera conseguir unas concentraciones concretas de cada uno de los sustratos para poder evaluar la selectividad de cada isoforma en presencia o ausencia de ciertos compuestos y en mayor o menos proporción.

A continuación, en la Tabla 21, se presentan los resultados obtenidos con una muestra real, y no una mezcla elaborada a conciencia, en la que se encuentran los fenoles típicos de un extracto de pulpa en las proporciones normales.

Tabla 21. Actividad de las isoformas POXan y POXcat frente a un extracto fenólico de pulpa de la variedad piñonera (Extracto 1).

Sustrato (Extracto 1)	POX an	POX cat
	Act relativa (%)	Act relativa (%)
Hidroxitirosol 1,00 mM	6,42	4,95
Tirosol 0,27 mM	0	0
Acetato de hidroxitirosol 0,35 mM	100	100
Demetiloleuropeína 3,84 mM	4,25	13,54
Verbascósido 0,09 mM	24,46	27,39
Nucénido 0,00 mM	0	0
Oleuropeína 1,21 mM	17,13	12,22
Ligustrósido 0,16 mM	0	0

Como se puede observar en la tabla anterior, en este extracto de pulpa no es posible encontrar nucénido ni cantidades significativas de ligustrósido.

IV.4.2.1.2. Especificidad y selectividad de POXan y POXcat frente a los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen

Las Figuras 53 y 54 muestran los cromatogramas correspondientes a las reacciones de POXan y POXcat con un extracto fenólico de AOV que contiene cantidades significativas de los compuestos fenólicos más representativos. Ambas isoformas mostraron actividad fundamentalmente frente a los dos compuestos mayoritarios, FDAO e isómeros de FAO, siendo ligeramente superior (aproximadamente un 20%) la oxidación de este último compuesto. Al comparar estos datos con los resultados obtenidos en la reacción del EC de

POX de semilla con los fenoles de AOV se observa que ambas isoformas producen dos productos de oxidación anteriormente detectados en los ensayos con EC (*1 y *2).

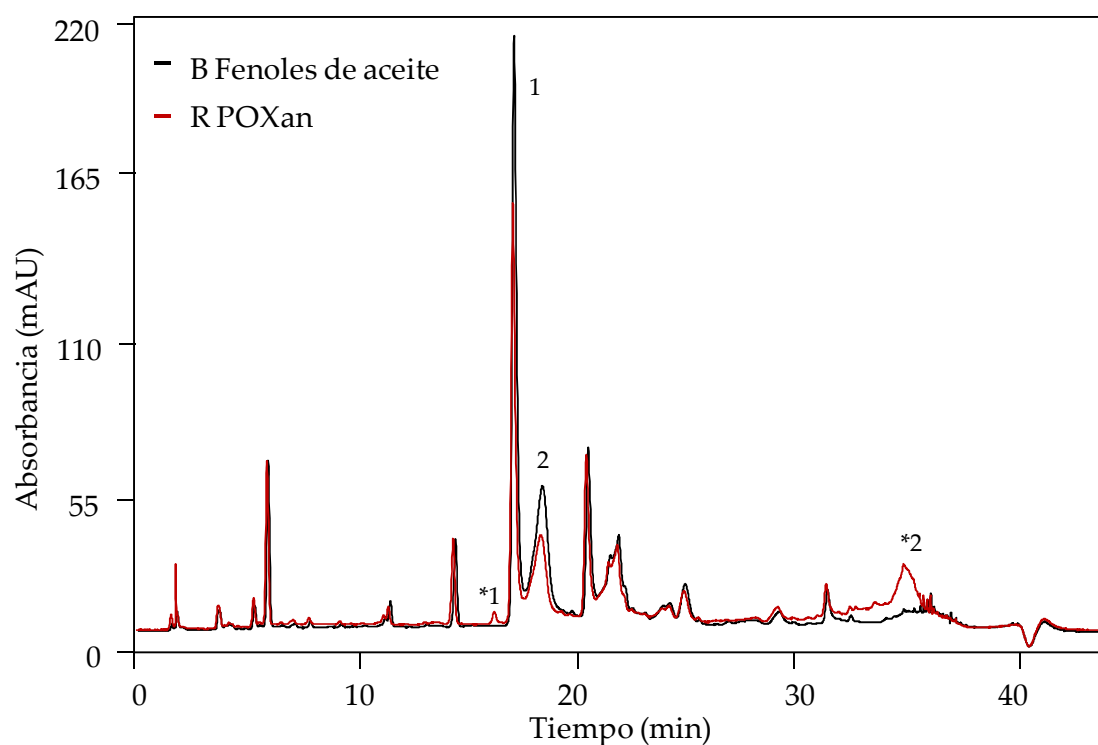


Figura 53. Degradación oxidativa de los compuestos fenólicos presentes en el AOV por acción de la isoforma POXan. La reacción enzimática y el análisis de dicha reacción se llevaron a cabo según se describe en los apartados III.2.2.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos.

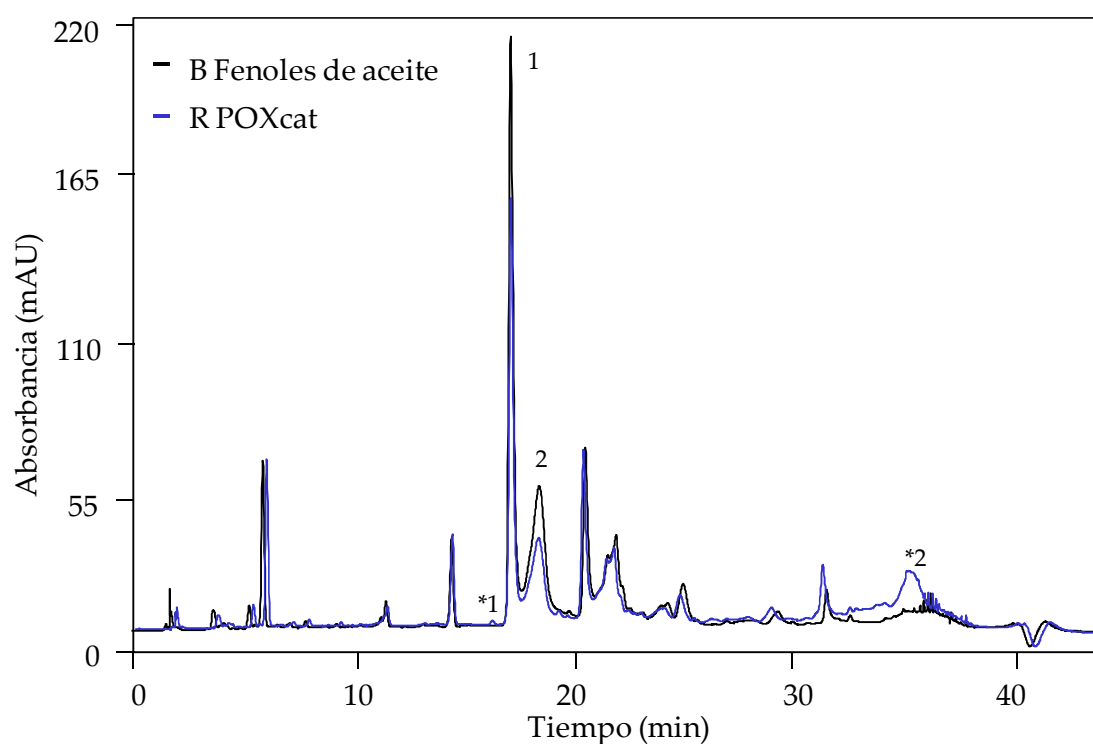


Figura 54. Degradación oxidativa de los compuestos fenólicos presentes en el AOV por acción de la isoforma POXcat. La reacción enzimática y el análisis de dicha reacción se llevaron a cabo según se describe en los apartados III.2.2.3. y III.5.5. de Materiales y Métodos.

Una vez caracterizada la actividad de ambas isoformas frente a los principales fenoles de la aceituna y del AOV se llevó a cabo una incubación conjunta con oleuropeína, como glucósido más representativo del fruto, y los fenoles mayoritarios del AOV, FDAO y los isómeros FAO, a la misma concentración, 1,25 mM. Los valores de actividad relativa se muestran en la Tabla 22. Con ambas isoformas, POXan y POXcat, se obtuvo un resultado similar. La máxima actividad se encontró para los isómeros FAO (100%), seguida de FDAO con un 75-80% de actividad relativa, mientras que la oleuropeína resultó ser el sustrato menos oxidado por ambas isoenzimas (38-32%).

Tabla 22. Actividad de las isoformas POXan y POXcat frente a un extracto fenólico que contiene concentraciones equimoleculares de oleuropeína, FDAO e isómeros FAO

Sustrato (1,25 mM)	POX an	POX cat
	Actividad relativa (%)	Actividad relativa (%)
Oleuropeína	37,98	32,31
FDAO	74,68	80,22
Isómeros FAO	100	100

IV.4.2.2. Determinación de parámetros cinéticos

Los sustratos seleccionados para determinar los parámetros cinéticos de las isoformas POXan y POXcat fueron el sustrato sintético guayacol y la oleuropeína como principal glucósido natural de la aceituna y el H₂O₂ como co-sustrato. Se realizaron reacciones enzimáticas empleando concentraciones crecientes de cada uno de los sustratos obteniéndose las representaciones gráficas de Michaelis-Menten, en las que se enfrentaron las actividades enzimáticas frente a las concentraciones de guayacol, oleuropeína o H₂O₂, tal y como se observan en las Figuras 55-60. La representación de los dobles inversos, conocida como representación de Lineweaver-Burk, permitió la obtención de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) y de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), de las isoformas purificadas para cada uno de los sustratos ensayados.

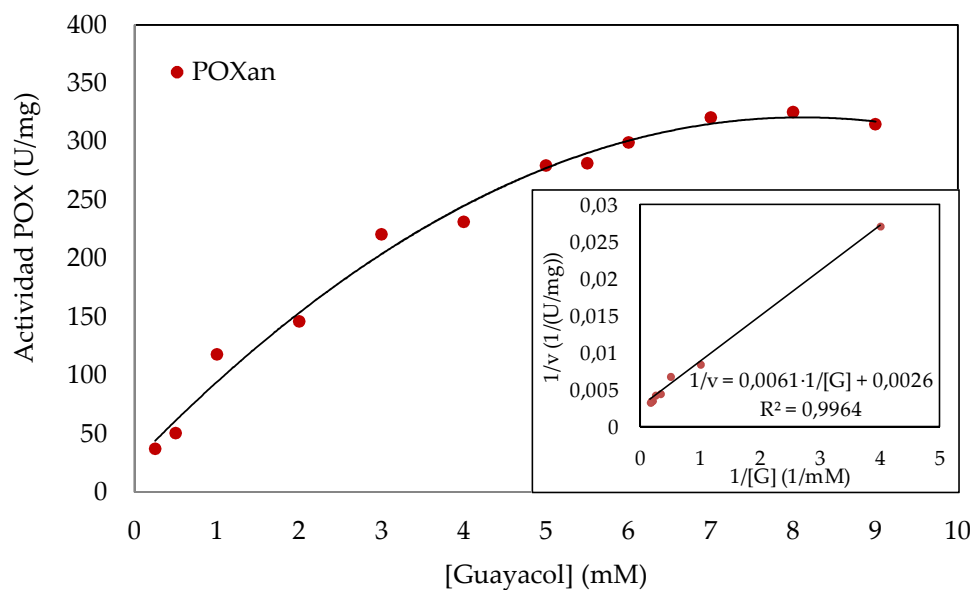


Figura 55. Actividad de la isoforma purificada POXan de semilla de aceituna en función de la concentración del sustrato guayacol y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

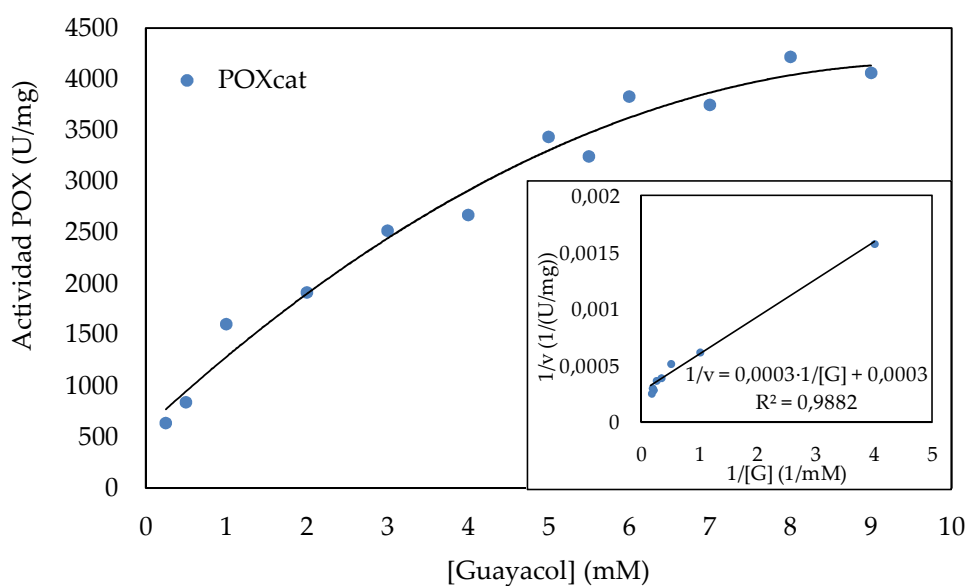


Figura 56. Actividad de la isoforma purificada POXcat de semilla de aceituna en función de la concentración del sustrato guayacol y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

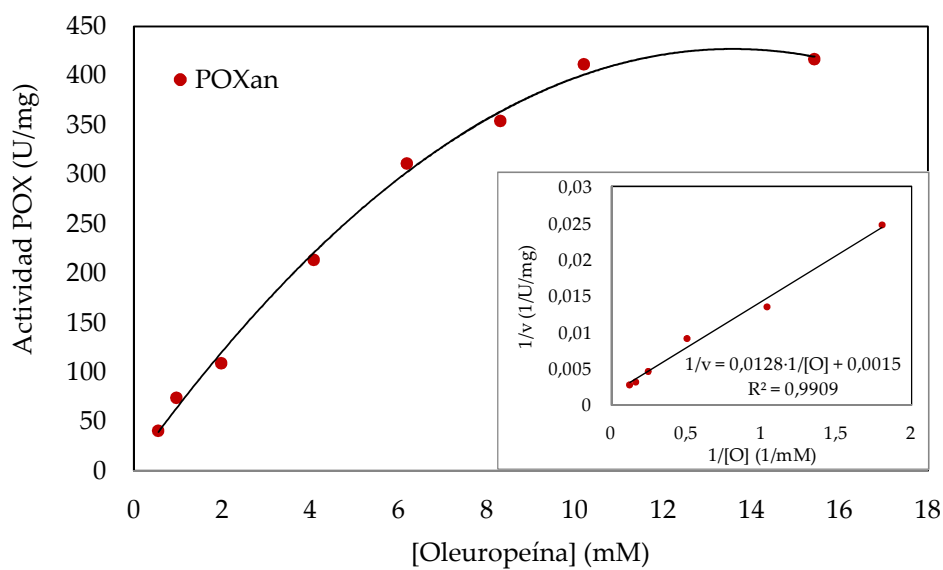


Figura 57. Actividad de la isoforma purificada POXan de semilla de aceituna en función de la concentración del sustrato oleuropeína y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

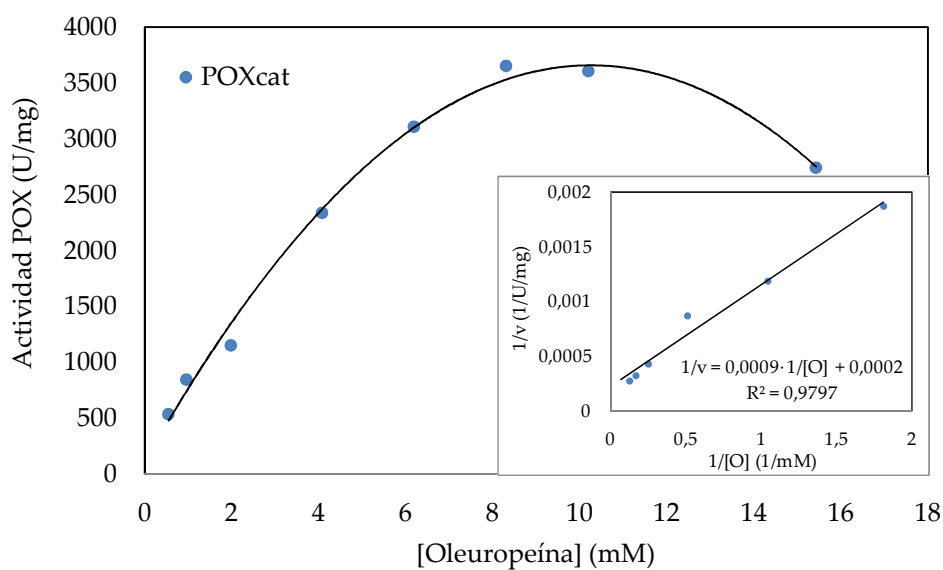


Figura 58. Actividad de la isoforma purificada POXcat de semilla de aceituna en función de la concentración del sustrato oleuropeína y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

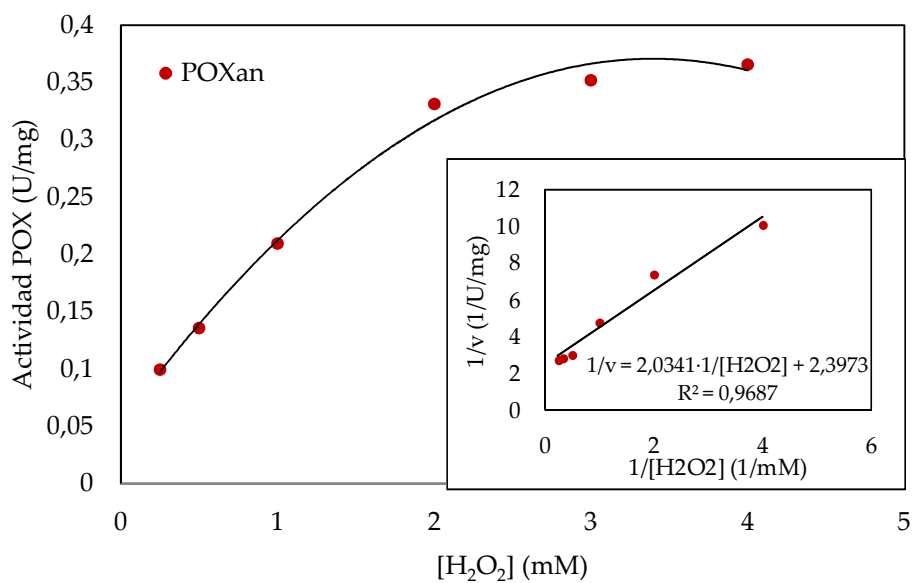


Figura 59. Actividad de la isoforma purificada POXan de semilla de aceituna en función de la concentración del co-sustrato H₂O₂ y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

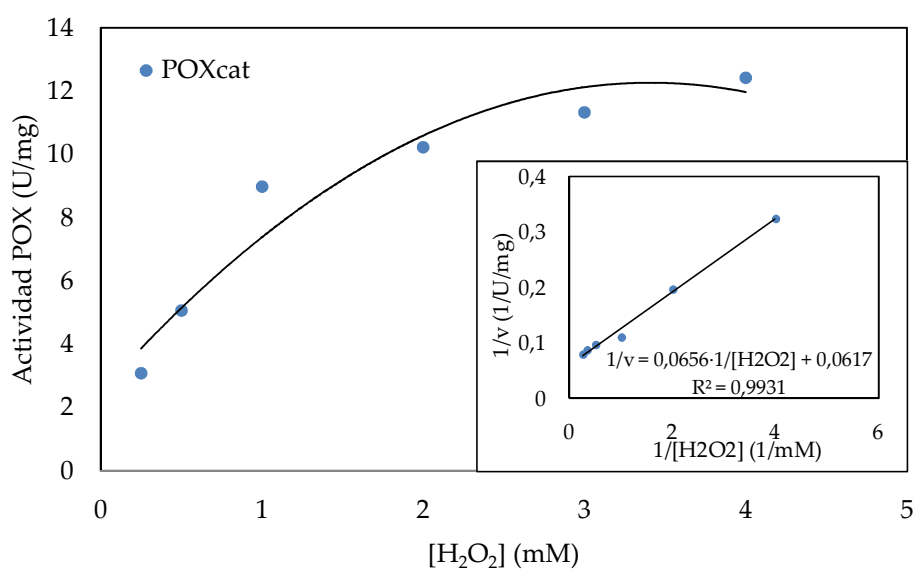


Figura 60. Actividad de la isoforma purificada POXcat de semilla de aceituna en función de la concentración del co-sustrato H₂O₂ y la correspondiente representación de Lineweaver-Burk.

Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ han sido recogidos en la Tabla 23. De acuerdo con los datos, se puede concluir que tanto POXan como POXcat son más afines por el guayacol que por la oleuropeína. De igual modo y, a juzgar por los valores de K_m obtenidos frente a la oleuropeína, parece que la POXcat sería más afín por este fenol que la forma aniónica. Además se calcularon estos parámetro cinéticos para el co-sustrato H_2O_2 obteniéndose los mismo valores cuando se ensayaba la reacción con guayacol y con oleuropeína (datos con oleuropeína no mostrados) encontrándose un valor de k_m muy similar para ambas isoformas en torno a 1 mM^{-1} .

Tabla 23. Parámetros cinéticos calculados a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk para POXan y POXcat con los sustratos guayacol y oleuropeína.

		$V_{m\acute{a}x}(\text{U/mg})$	$k_m(\text{mM}^{-1})$
POXan	Guayacol	384,62	2,35
	Oleuropeína	666,67	8,53
	H_2O_2 (guayacol)	0,41	0,85
POXcat	Guayacol	3333,30	1,00
	Oleuropeína	5000,00	4,50
	H_2O_2 (guayacol)	16,21	1,06

A partir de los datos de $V_{m\acute{a}x}$ y k_m podemos calcular el valor de la constante catalítica, k_{cat} ($k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/k_m$). Los valores de k_{cat} para cada una de las isoformas fueron del mismo orden de magnitud para los dos sustratos, aunque el valor frente al guayacol fue entre 2 y 3 veces mayor que frente a la oleuropeína, como se observa en la Tabla 24. Este valor de la k_{cat} resultó ser alrededor de 17 veces más alta para la POXcat que para la POXan.

Tabla 24. Valores de la constante catalítica *k_{cat}* para los sustratos guayacol, oleuropeína y H₂O₂.

		<i>k_{cat}</i>
POXan	Guayacol	163,67
	Oleuropeína	78,15
	H ₂ O ₂ (guayacol)	0,49
POXcat	Guayacol	3333,30
	Oleuropeína	1111,11
	H ₂ O ₂ (guayacol)	15,24

IV.4.2.3. Efecto del pH

Las curvas de pH que se representan en la Figura 61 muestran un perfil muy similar para ambas enzimas purificadas. La curva de la POXcat se encuentra ligeramente desplazada hacia pH más ácidos respecto a la obtenida para la POXan. Ambas curvas, realizadas utilizando guayacol como sustrato, indican máxima actividad para las dos isoenzimas en torno a un valor de pH igual 6, más concretamente se estima un pH óptimo de 6 para la POXan y de 5,5 para la POXcat. Ambas isoformas tienen comportamientos similares tanto a pH ácidos como a pH básicos, produciéndose en ambos casos un descenso de actividad más acusado a pH básico. Cuando se empleó oleuropeína como sustrato se obtuvieron unas curvas de pH similares para las dos isoenzimas observándose un aumento de actividad a pH ácido, en torno a 4, que se aproxima bastante al pH de las pastas de aceituna durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen.

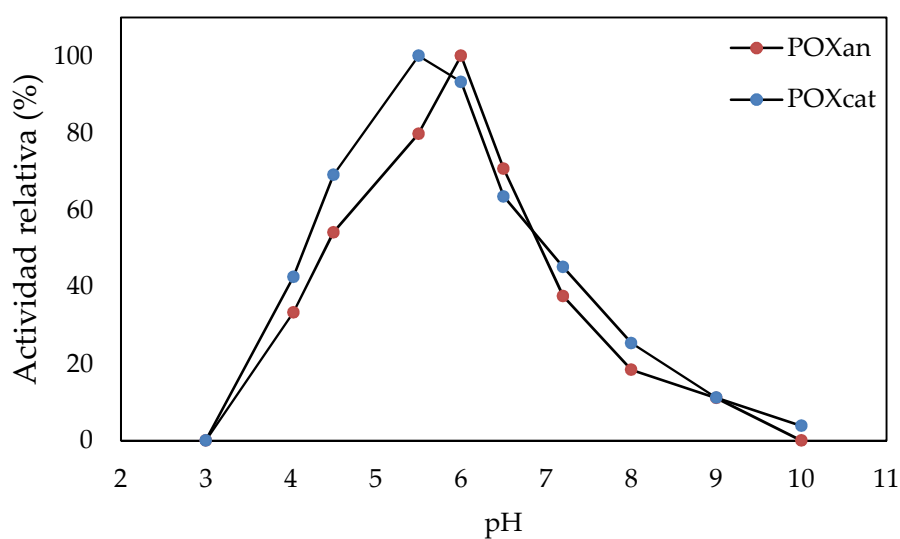


Figura 61. Efecto del pH sobre la actividad de POXan y POXcat frente a guayacol

IV.4.2.4. Efecto de la temperatura

Se realizaron dos curvas de temperatura, una para cada enzima purificada, en un amplio intervalo de temperatura desde 10-70 °C. La determinación de la temperatura óptima de la dos isoenzimas se hizo utilizando el sustrato colorimétrico guayacol en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los ensayos realizados con POXcat y POXan mostraron que en ambos casos la temperatura óptima era 10 °C. Tal y como se observa en la Figura 62, en ambos casos se produce un descenso lineal de la actividad conforme se va aumentando la temperatura, de tal manera que a 40 °C ambas exhiben un 50% de actividad respecto a la temperatura considerada como óptima, mientras que a 70 °C se desnaturalizan casi por completo. A temperaturas comprendidas entre 10 y 40 °C la POXcat muestra una actividad algo superior a la que presenta la POXan. Por encima de 40 °C el comportamiento es prácticamente idéntico.

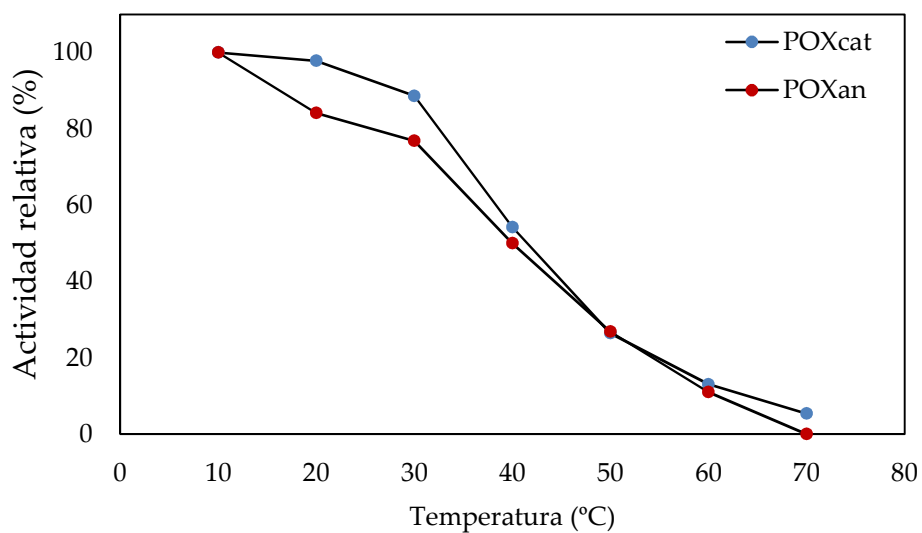


Figura 62. Efecto de la temperatura sobre la actividad de POXan y POXcat.

Las peroxidases descritas en la bibliografía son enzimas capaces de soportar altas temperaturas. Para evaluar la estabilidad térmica de POXan y POXcat se realizaron incubaciones de 1 hora con ambas isoenzimas en un amplio intervalo de temperaturas (30 - 75 °C) midiéndose posteriormente la actividad frente a guayacol según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos, mostrados en las Figuras 63 y 64, indican en ambos casos una gran estabilidad térmica, manteniendo ambas isoformas altos niveles de actividad a temperaturas de 45-50 °C.

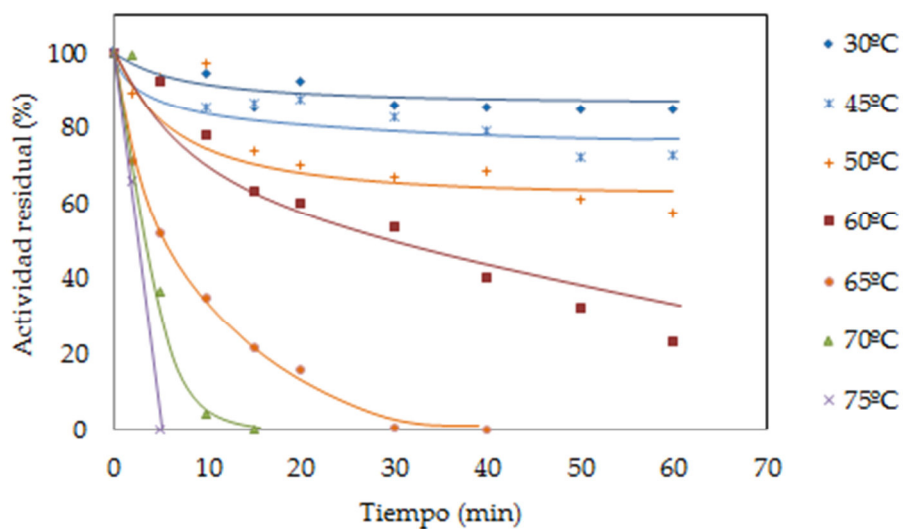


Figura 63. Estabilidad térmica de POXan . Los extractos se incubaron a distintas temperaturas. Tras el tiempo indicado, se determinó la actividad enzimática según se describe en Materiales y Métodos.

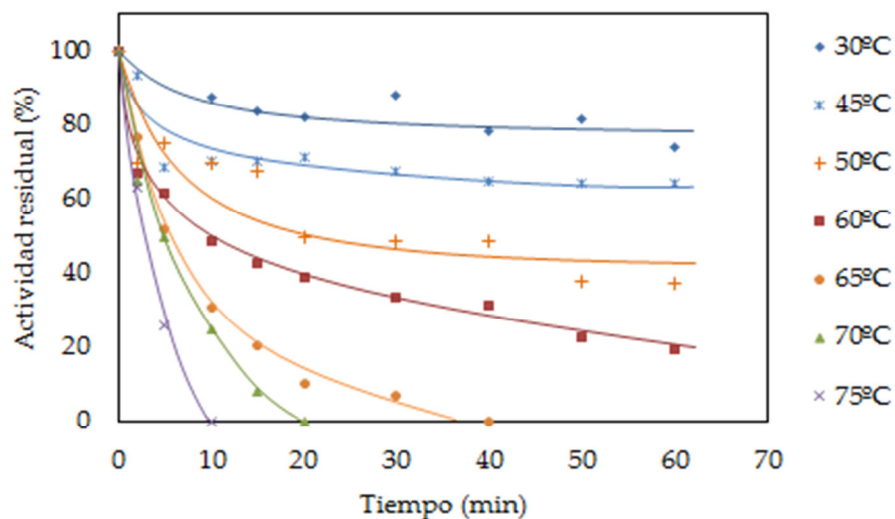


Figura 64. Estabilidad térmica de POXcat. Los extractos se incubaron a distintas temperaturas. Tras el tiempo indicado, se determinó la actividad enzimática según se describe en Materiales y Métodos.

IV.4.2.5. Efecto de la fuerza iónica

Otra característica común a muchas proteínas con actividad POX es el notable efecto que la fuerza iónica del medio tiene sobre la actividad enzimática. Para evaluar el efecto de la fuerza iónica sobre las isoformas de POX de aceituna purificadas se emplearon disoluciones de tampón fosfato sódico, pH 6,5 con concentraciones crecientes (25-100 mM). El efecto de la fuerza iónica de dichos tampones sobre la actividad de POXan y POXcat frente a los sustratos guayacol y ABTS se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de POXan y POXcat.

POX purificadas	Actividad relativa (%)			
	25 mM	50 mM	75 mM	100 mM
POXan vs. guayacol	100	90,63	95,61	83,83
POXcat vs. guayacol	100	89,40	89,72	79,53
POXan vs. ABTS	100	96,41	99,11	84,37
POXcat vs. ABTS	100	87,81	90,96	78,86

Se observa para ambas isoformas y para ambos sustratos que el máximo de actividad se obtiene con el tampón de menor fuerza iónica, 25 mM. Así mismo, se aprecia una mayor pérdida de actividad en el caso de la POXcat respecto a la POXan al aumentar la fuerza iónica.

IV.4.2.6. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad peroxidasa

Las isoenzimas purificadas se incubaron durante 1 y 24 h a 4 °C en presencia de diversos iones metálicos, determinándose tras dicha incubación su actividad enzimática frente al guayacol. Tal y como muestra la Tabla 26, muchos de los iones ensayados se comportaron como inhibidores inespecíficos de la actividad enzimática POX, mientras que Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} y Zn^{2+} tiene un marcado efecto positivo sobre la actividad de ambas proteínas.

Tabla 26. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de POXan y POXcat.

Ion metálico (1 mM)	POXan		POXcat	
	Actividad relativa (%)		Actividad relativa (%)	
	1h	24h	1h	24h
Ca ²⁺	296,19	300,96	244,93	207,87
Mg ²⁺	182,04	188,44	171,39	128,14
Na ⁺	152,37	162,01	177,65	139,66
K ⁺	130,84	118,16	171,82	160,20
Zn ²⁺	155,40	135,13	174,10	135,12
Sin ión metálico	100	100	100	100
Fe ³⁺	92,43	80,66	97,41	100,44
Ag ⁺	117,56	90,17	142,95	43,23
Fe ²⁺	83,49	60,19	90,76	31,25
Hg ²⁺	2,61	0	17,93	0
Cu ²⁺	9,62	13,85	18,29	5,44

IV.4.2.7. Efecto de otros inhibidores de la actividad peroxidasa

Los estudios de inhibición de la actividad de las isoformas de POX de aceituna purificadas, POXan y POXcat, se llevaron a cabo utilizando inhibidores de enzimas oxidativas previamente descritos en la bibliografía. Las isoenzimas purificadas se incubaron durante 1 y 24 h a 4 °C en presencia de los citados inhibidores y tras la incubación se determinó su actividad enzimática según las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, tal y como se observa en la Tabla 27.

Tabla 27. Efecto de inhibidores de la actividad oxidativa sobre POXan y POXcat.

Inhibidor (1 mM)	POXan		POXcat	
	Actividad relativa (%)		Actividad relativa (%)	
	1h	24h	1h	24h
Sin inhibidor	100	100	100	100
Ác. cítrico	9,06	46,50	63,96	52,98
Glucosa	7,75	8,82	73,75	16,94
Metabisulfito	3,34	3,90	0	10,58
Ác. ascórbico	0	0	0	0
2-mercaptoetanol	0	0	0	0

Todos los inhibidores empleados mostraron el efecto esperado en mayor o menor medida. Incluso el SDS y la azida sódica (no mostrados en la Tabla 27), que pese a no mostrar efecto al pH en el que se ha realizado el ensayo (pH 6,5), mostraron su capacidad inhibitoria a pH más ácido; tal es así, que con una concentración 1mM de ambos se produjo una inhibición del 100% de la actividad POX.

IV.5. FACTORES BIOQUIMICOS QUE AFECTAN A LA OXIDACIÓN DE FENOLES CATALIZADA POR POX Y PPO.

En los apartados anteriores se han caracterizado las reacciones de oxidación de los principales compuestos fenólicos, de la aceituna y el aceite de oliva virgen, catalizadas por la POX y PPO de aceituna. Los ensayos *in vitro* ya descritos en esta memoria demuestran que ambas enzimas son capaces de oxidar a los principales compuestos fenólicos del olivo y apoyan el papel clave de ambas en la oxidación de compuestos fenólicos durante el procesado de la aceituna. En este último apartado, se describen los ensayos “in vivo” realizados con ambas enzimas con el fin de determinar cuál es su contribución real a la composición fenólica del AOV, estudiando a su vez cuales son los factores limitantes en el proceso. En este sentido,

utilizando el método Abencor que reproduce a escala de laboratorio el proceso de obtención del AOV, se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que se modificaron las cargas enzimáticas de POX y PPO durante el proceso de molienda de la aceituna y posterior batido de la pasta.

En el conjunto de experimentos realizados se pueden establecer distintos bloques, (IV.5.1.) centrado en estudiar las modificaciones inducidas por la temperatura, (IV.5.2) estudios de modulación de la actividad POX, (IV.5.3) estudios de modulación de actividad PPO y (IV.5.4.) efecto de moduladores inespecíficos de oxidación.

IV.5.1. Modificación de la temperatura y su efecto sobre el perfil fenólico del aceite de oliva virgen

IV.5.1.1. Modificación de las actividades POX y PPO durante la conservación postcosecha de la aceituna: efecto en el perfil fenólico del aceite

Existen datos experimentales que relacionan las modificaciones de las actividades POX y PPO a lo largo de la maduración de la aceituna con los cambios en el contenido fenólico de los aceites obtenidos en esos estadios de maduración (apartado IV.I). En este mismo sentido, se estudió el efecto de la conservación de la aceituna a distintas temperaturas sobre las actividades POX y PPO y sobre el contenido fenólico de los aceites. Se utilizaron aceitunas de la variedad Arbequina (IM 1,5) que fueron almacenadas a dos temperaturas distintas, 4 y 25 °C, durante el mes de octubre, manteniéndose en paralelo un control con frutos que prosiguieron su maduración en el árbol. La Figura 39 muestra imágenes de los tres lotes de frutos a lo largo de un mes.

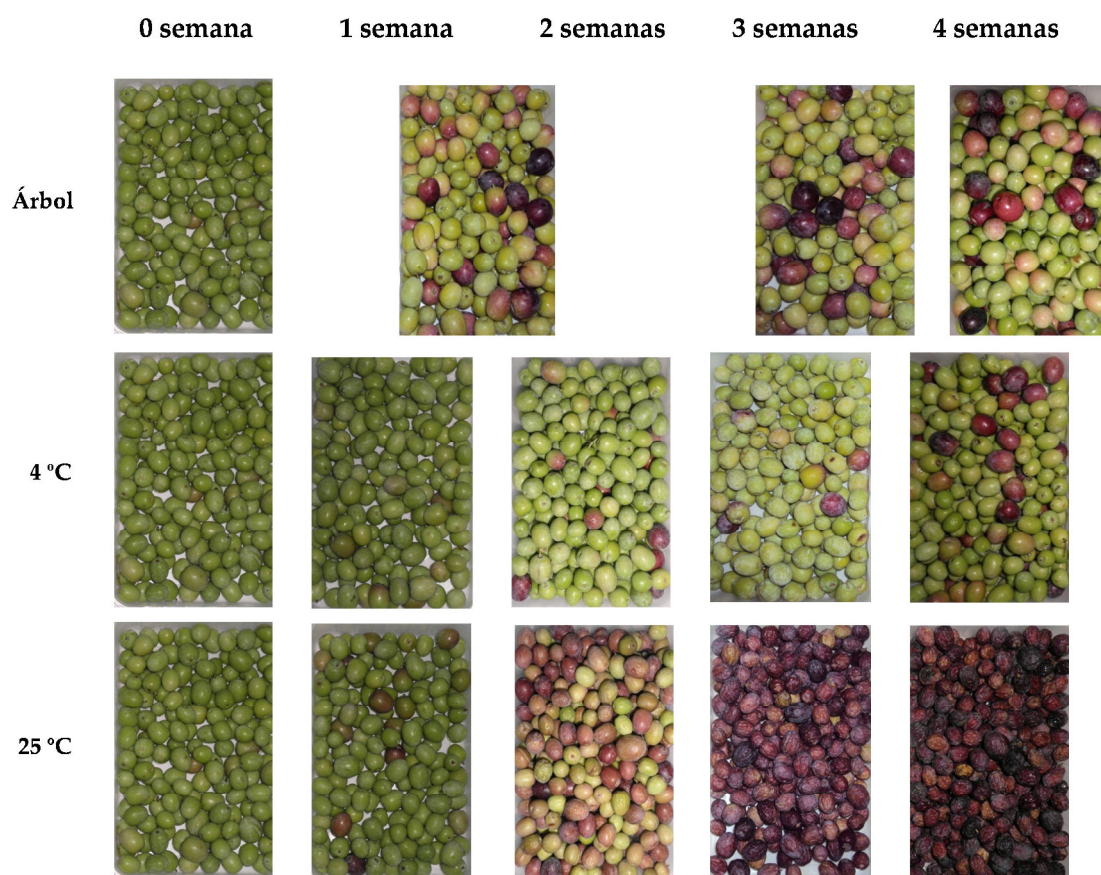


Figura 39. Aspecto de las aceitunas de Arbequina recién recolectadas y almacenadas a las dos temperaturas de ensayo, 4 y 25 °C durante el experimento de conservación a lo largo del mes de octubre de 2012.

Semanalmente los frutos fueron analizados para determinar los niveles de actividad POX y PPO y paralelamente, utilizando el sistema Abencor, se obtuvieron los correspondientes aceites cuyo perfil fenólico fue también analizado. Los niveles de actividad POX y PPO detectados se muestran en la Figura 40, en la que también se han incluido los datos de actividad β -GLU por jugar un papel esencial en la formación de compuestos secoiridoideos del AOV.

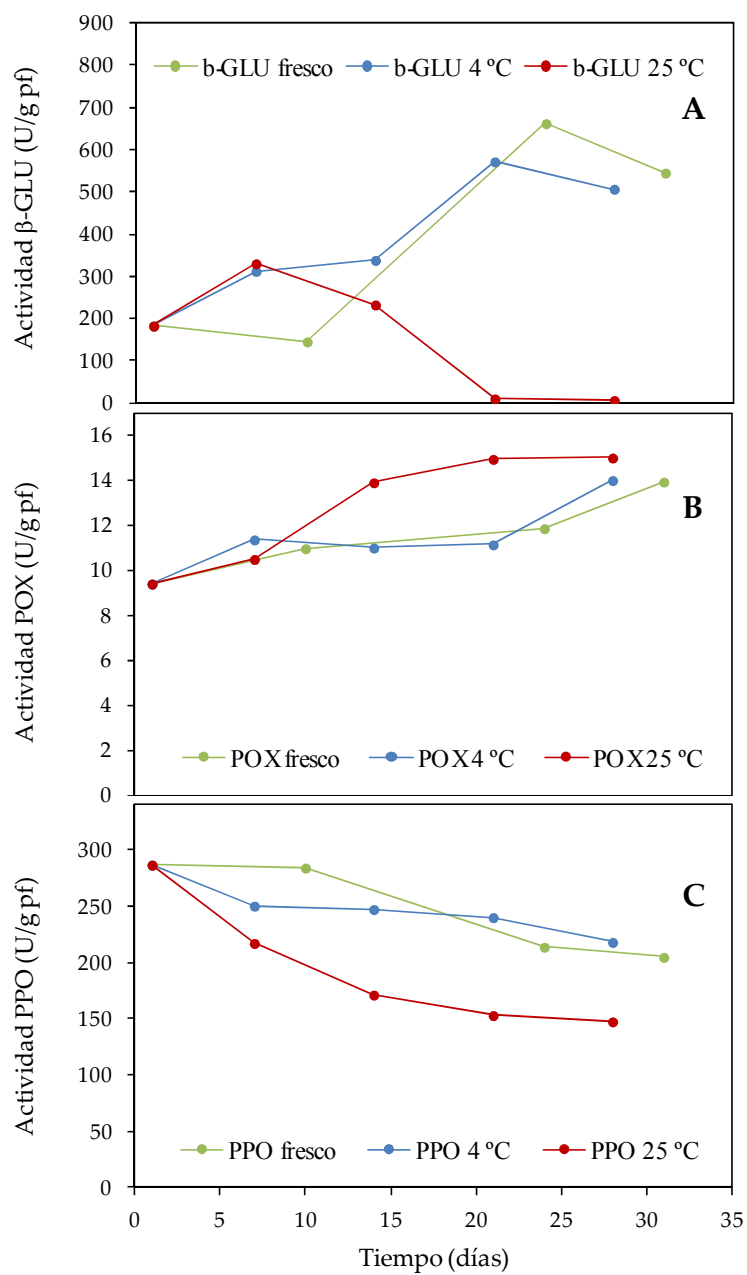


Figura 40. Seguimiento de las actividades enzimáticas β -GLU (A), POX (B) y PPO (C) durante el experimento de conservación de aceitunas de la variedad Arbequina.

La evolución de las tres actividades enzimáticas es muy similar en las aceitunas recién cosechadas y en las conservadas a 4 °C, siguiendo en ambos casos la tendencia ya descrita en la mayoría de las variedades analizadas, con un progresivo incremento de la POX y un suave descenso de los niveles de PPO. Sin embargo, se encontraron grandes diferencias en los frutos conservados a 25 °C. La actividad β -GLU fue, sin duda, la que se vio más afectada a esta temperatura ya que, a partir de la segunda semana almacenada a 25 °C, decae bruscamente haciéndose prácticamente cero a la tercera semana. El descenso de la actividad PPO en los frutos conservados a 25 °C se hace muy pronunciado a partir de la segunda semana, en la que los niveles de PPO son ya significativamente menores (un 30 %) que en los frutos recién cosechados y conservados en frío, diferencias que se mantienen hasta el final del experimento. La actividad POX, también es ligeramente distinta en los frutos conservados a 25 °C, alcanzando valores más altos que en los otros dos casos, aunque probablemente al localizarse en la semilla y estar protegida del entorno mediante el hueso de la aceituna, sus variaciones fueron menores.

Así el contenido de compuestos fenólicos totales de los aceites obtenidos a partir de las aceitunas recogidas del árbol y de las aceitunas almacenadas a las dos temperaturas de ensayo fue el que se muestra en la Figura 41, mostrándose en la Figura 42 el contenido de secoiridoideos y el de *o*-difenoles.

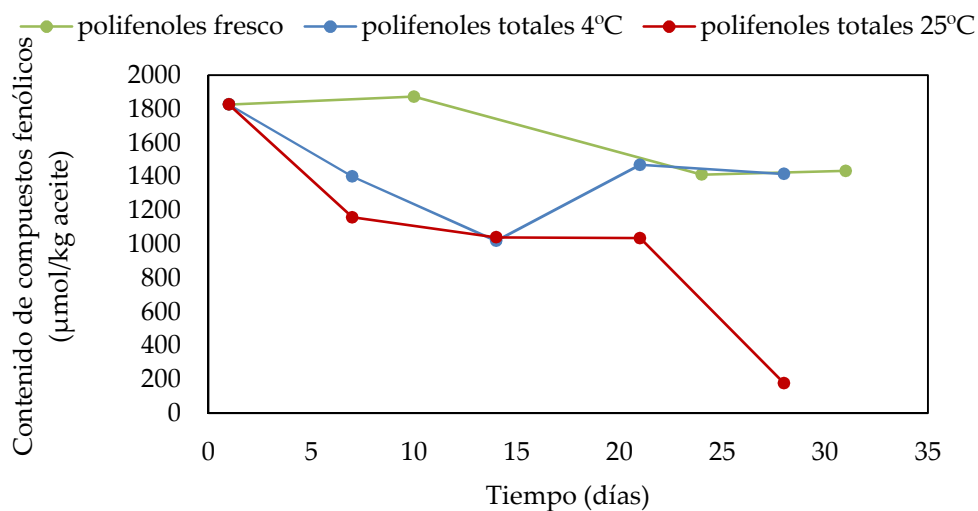


Figura 41. Seguimiento del contenido de compuestos fenólicos durante el experimento de conservación de aceitunas de la variedad Arbequina.

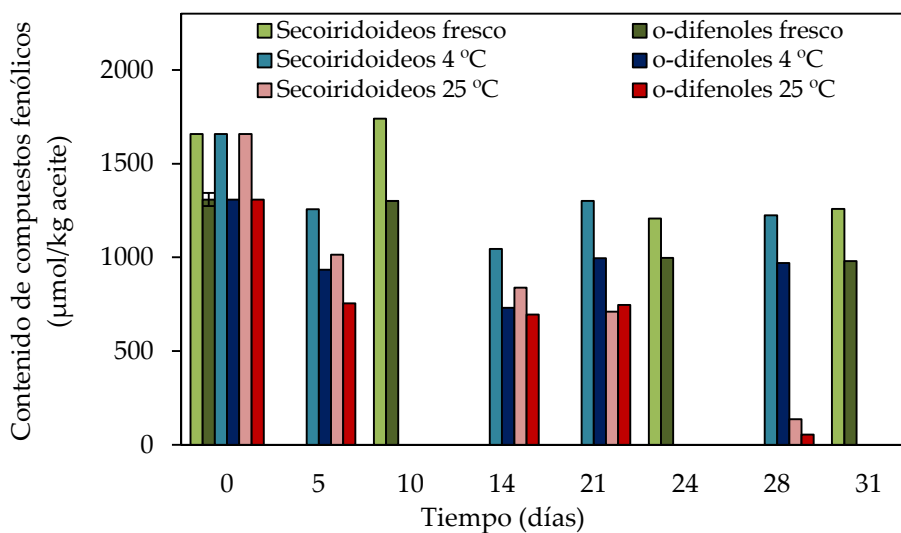


Figura 42. Seguimiento del contenido de derivados secoiridoideos y *o*-difenoles durante el experimento de conservación de aceitunas de la variedad Arbequina.

Como puede deducirse a partir de estas dos figuras, las aceitunas almacenadas a la temperatura de 25 °C no permiten obtener un perfil fenólico equivalente al que se consigue a

partir de aceitunas recién recolectadas, a diferencia de lo que sucede con aquéllas almacenadas a 4 °C.

IV.5.1.2. Modificación de la temperatura durante la etapa de batido en el proceso de obtención del aceite de oliva virgen: efecto en el perfil fenólico del aceite.

Tal y como se ha comprobado experimentalmente, la oxidación de fenoles por acción de las enzimas POX y PPO está influida en mayor o menor medida por la temperatura a la que tiene lugar dicha reacción. Por ello, y en vista de que la actividad PPO no varió en gran medida en el intervalo de temperatura entre 10-45 °C, se realizó una serie de experimentos en el que se controló la temperatura de batido durante el proceso de obtención del AOV. Las temperaturas seleccionadas fueron 15 °C y 45 °C por ser las óptimas para la actuación de POX y β -GLU. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 43. Como puede observarse el contenido final de polifenoles en los aceites fue mucho menor cuando se empleó la temperatura más baja.

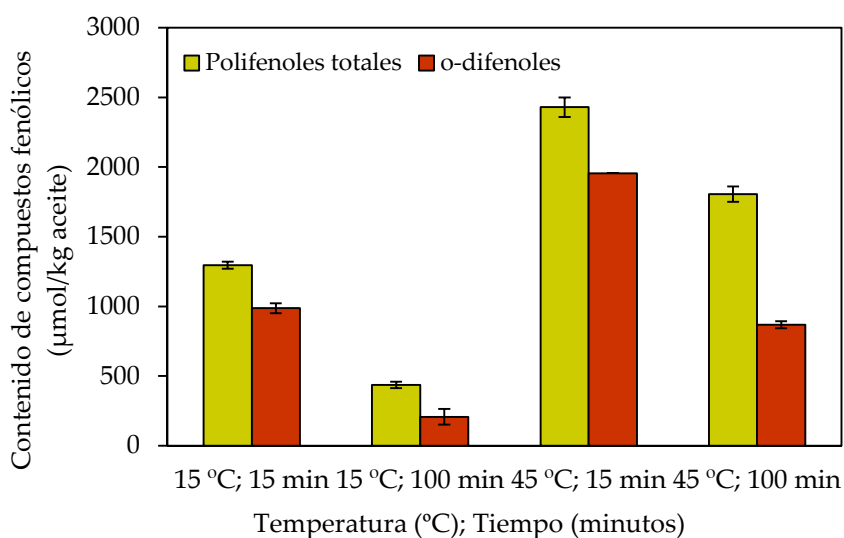


Figura 43. Contenido de polifenoles y o-difenoles en aceites a diferentes temperaturas y tiempos de batido.

IV.5.2. Modulación de la actividad POX durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen y su efecto en el perfil fenólico del aceite

Con el fin de investigar los posibles factores bioquímicos que limitan la oxidación de compuestos fenólicos por la POX de aceituna se diseñaron una serie de experimentos tanto para implementar la carga enzimática POX presente durante las etapas de molturación y batido como para reducirla valorando el efecto de esta modulación de la actividad sobre el perfil fenólico de los aceites.

IV.5.2.1. Efecto de la adición de peroxidas de rábano

La primera aproximación para incrementar la carga de actividad POX fue la adición de enzima exógena durante el proceso de obtención de aceite mediante el sistema Abencor. La metodología empleada en estos experimentos se describe con detalle en el apartado I.2.1. La enzima elegida fue la peroxidasa de rábano ya que está disponible comercialmente y se había comprobado previamente su capacidad para oxidar los compuestos fenólicos del olivo (apartado IV.2.3.1). La dosis de enzima (HRP, Sigma) seleccionada (400mg/Kg de aceituna) fue adicionada en las dos etapas claves del proceso de obtención del AOV la molienda y el batido.

En la Tabla 28 se muestran las modificaciones inducidas por el tratamiento sobre el perfil fenólico del aceite. El descenso más acusado se observó para los *o*-difenoles. Cuando se adicionaba la enzima en el molino el descenso fue de un 12% para los *o*-difenoles, mientras que cuando la adición se realizaba durante el batido el descenso fue del 20%.

Tabla 28. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de POX comercial de rábano (400 mg/ kg aceitunas) durante el procesado de los frutos de la variedad Picual (IM 1)

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de POX comercial		
	Control Picual IM 1	+ POX com (en molino)	+ POX com (en batido)
Hidroxitirosol	10,5b	6,5a	6,7a
Tirosol	11,2b	7,1a	7,1a
Ác. vanílico	5,5b	3,5a	3,4a
Ác. <i>p</i> -cumárico	2,9b	2,2a	2,1a
Acetato hidroxitirosol	17,7b	21,7c	11,4a
FDAO	404,5b	423,1b	334,4a
Isómeros FAO	575,3b	416,6a	405,2a
FDAL	236,9b	237,3b	219,2a
Pinorresinol	0,0	0,0	0,0
Ác. cinámico	23,6	22,8	23,4
1-Acetoxipinorresinol	0,0	0,0	0,0
FAAO	107,5b	92,4a	85,8a
FAAL	23,4b	17,3a	21,3b
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0
Luteolina	15,2b	13,1a	13,4a
Apigenina	7,2	6,5	6,5
Polifenoles totales	1441,7c	1269b	1160,3a
<i>o</i> -difenoles	1130,9c	973,3b	877,1a
Secoiridoideos	1347,7c	1186,6b	1066,1a

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.2.2. Efecto de la adición de peroxidasa de aceituna

Dado que la semilla de aceituna es considerada la máxima fuente natural de actividad POX en la aceituna, se realizó un segundo lote de ensayos en los que se incrementó la carga enzimática POX mediante la adición de semillas de Arbequina y Picual (35-45 g/kg fruto). En cada experimento se añadió la cantidad precisa de semilla para incrementar en un 100% la

actividad POX del lote de frutos control. Los resultados de los ensayos se recogen en la Tabla 29. Tal y como muestran los datos se aprecia un descenso del contenido fenólico de los aceites mucho más elevado que el observado en el ensayo de adición de POX comercial de rábano. En el caso de Arbequina se produjo un descenso del 59% en los *o*-difenoles y en el caso de Picual la reducción fue de un 56%. En ambas variedades el compuesto fenólico que sufrió la disminución más significativa fue FDAO (41% en Arbequina y 52% en Picual).

Tabla 29. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de POX de semillas de aceitunas durante el procesado de frutos de las variedades Arbequina y Picual (IM 1)

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de POX semilla aceituna			
	Picual IM 1		Arbequina IM 1	
	Control	+ 100% POX	Control	+ 100% POX
Hidroxitiroso	10,3b	7,6a	9,5	7,4
Tirosol	10,5	11,6	11,8	13,0
Ác. vanílico	5,4b	3,6a	2,6	1,8
Ác. <i>p</i> -cumárico	2,7b	2,1a	0,0	0,0
Acetato hidroxitiroso	17,5b	13,5a	77,4b	30,8a
FDAO	400,2b	197,5a	498,7b	297,7a
Isómeros FAO	559,1b	313,8a	0,0	0,0
FDAL	233,1b	156,6a	124,7	103,7
Pinorresinol	0,0	0,0	2,1	2,0
Ác. cinámico	15,9	19,6	5,7	4,0
1-Acetoxipinorresinol	0,0	0,0	48,9	39,4
FAAO	97,5b	81,2a	45,0b	34,3a
FAAL	23,1b	17,6a	17,1	14,4
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	14,8b	11,8a	17,8	13,9
Apigenina	7,0b	6,1a	8,8	8,0
Polifenoles totales	1398,5b	825,7a	870,8b	570,4a
<i>o</i> -difenoles	1099,9b	625,5a	649,1b	384,2a
Secoiridoideos	1313,1b	749,7a	686,2b	450,1a

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Adicionalmente, el papel de la semilla como fuente de actividad POX y su repercusión en el perfil fenólico de los aceites fue estudiado en la variedad Gordal. En esta variedad de aceituna, habitualmente dedicada al aderezo y no a la obtención de AOV se producen numerosos frutos partenocárpico, a los que la ausencia de semilla les otorga unas características morfológicas singulares y que se conocen como zofairones. El experimento se realizó utilizando como control frutos partenocárpico de Gordal a los que se adicionaron semillas de frutos sanos de esta variedad.

La idea inicial al plantear este ensayo tenía por objetivo analizar si el aporte de este material, poseedor de actividad POX, añadido a los frutos partenocárpico restauraba el contenido final de los compuestos fenólicos en el aceite asemejándolos a los encontrados en el fruto normal. Para comparar los fenoles de los aceites obtenidos se analizaron previamente los compuestos fenólicos del fruto (Tabla 30) y las actividades enzimáticas β -GLU, POX y PPO (Tabla 31).

Tabla 30. Contenido de los principales glucósidos fenólicos en la pulpa de Gordal y en la de su fruto partenocárpico.

Glucósidos fenólicos ($\mu\text{mol/g}$ fruto)	Gordal	Fruto partenocárpico
Hidroxitirosol	1,95	1,85
Verbascósido	1,05	0,22
Glucósido-7-Luteolina	0,75	0,14
Oleuropeína	12,02	13,19
Ligustrósido	0,87	1,54

Tabla 31. Distribución de las actividades enzimáticas relacionadas con el contenido que fenoles en el aceite en mesocarpio y semilla de Gordal y de su fruto partenocárpico.

Actividades enzimáticas (U/fruto)	Gordal	Fruto partenocárpico
β -GLU en mesocarpio	210,62 \pm 0,40	500,34 \pm 4,10
β -GLU en semilla	0	0
PPO en mesocarpio	274,09 \pm 14,67	160,61 \pm 1,13
PPO en semilla	0	0
POX en mesocarpio	0,10 \pm 0,005	0,46 \pm 0,03
POX en semilla	0,05 \pm 0,001	0

En vista de que los fenoles de partida en el fruto eran similares en Gordal y en el fruto partenocárpico, y de los niveles de β -GLU y PPO, y teniendo en cuenta la ausencia de semilla se esperaría un contenido total de polifenoles en el aceite de los zofairones más elevado que en el aceite de Gordal, el cual se vería disminuido por la adición de semilla para igualarse al contenido de Gordal según nuestra hipótesis de partida. Sin embargo, en el caso concreto del zofairón (que carece de semilla) la POX se distribuye por la pulpa, superando incluso el nivel de POX que hay en el fruto de Gordal. Esto explicaría, como se observa en la Figura 44, que el contenido total de polifenoles y de *o*-difenoles fuera equivalente en los aceites de Gordal y en el de los frutos partenocárpicos. Por ello, la adición de POX de semilla sobre los zofairones redujo el contenido de los polifenoles totales del AOV al igual que ocurrió con la adición de semillas de Arbequina sobre los lotes de Arbequina y Picual mencionados anteriormente.

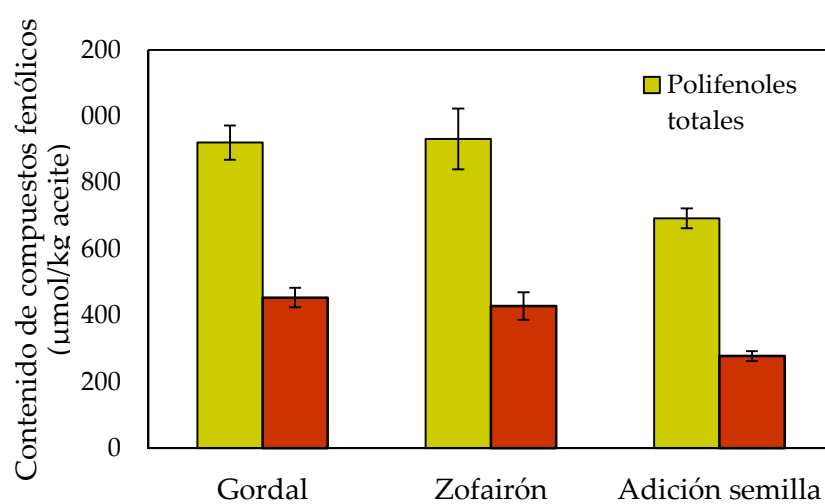


Figura 44. Contenido en polifenoles totales y o-difenoles en aceites de Gordal y del zofairón de Gordal y en el aceite del ensayo de adición de semillas sobre los zofairones de Gordal.

De manera más detallada, la composición fenólica de los aceites procedentes de los zofairones y del ensayo de adición de semilla sobre éstos se recoge en la Tabla 32.

Tabla 32. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de POX de semillas de aceitunas durante el procesado de frutos partenocárpicos de la variedad Gordal (IM 1).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de POX semilla de aceituna	
	Control Zofairones G	+ POX sem (en molino)
Hidroxitirosol	7,18	4,80
Tirosol	11,81	11,17
Ác. vanílico	3,51	2,46
Ác. <i>p</i> -cumárico	29,50	26,26
Acetato hidroxitirosol	0	0
FDAO	302,540	185,24
Isómeros FAO	61,030	50,49
FDAL	363,70	291,74
Pinorresinol	3,04	3,38
Ác. cinámico	7,10	6,40
1-Acetoxipinorresinol	73,33	64,00
FAAO	46,37	27,65
FAAL	0	0
Ác. ferúlico	6,770	5,99
Luteolina	11,08	8,98
Apigenina	4,96	4,23
Polifenoles totales	931,91	692,78
<i>o</i> -difenoles	428,20	277,15
Secoiridoideos	773,64	555,12

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.2.3. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno

Como se ha comentado en la Introducción la mayoría de las POX de plantas oxidan preferentemente los compuestos fenólicos a expensa de reducir especies peróxido, H_2O_2 en la mayoría de los casos. Para explorar la posible limitación de este co-sustrato en las pastas de aceituna, se realizó un ensayo de adición de H_2O_2 en un rango de 100-500 $\mu\text{L/kg}$ aceituna

durante la molienda. Se observó una clara relación dosis/efecto de manera que, la mayor disponibilidad de H₂O₂ se correlacionó con un menor contenido en compuestos fenólicos en los aceites. Se encontró un descenso del 10% de los fenoles totales cuando se añadió la dosis correspondiente a 100 µL H₂O₂/kg de aceituna, una disminución del 13% al añadir 200 µL H₂O₂/kg de aceituna y del 24% al adicionar la dosis más elevada, 500 µL H₂O₂/kg de aceituna (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que, según los experimentos realizados *in vitro* el H₂O₂ no es capaz de inducir por sí misma la oxidación de los compuestos fenólicos del AOV, los datos experimentales obtenidos sugieren que la oxidación mediada por POX está íntimamente ligada a la mayor o menor disponibilidad de peróxido en las pastas.

En la Tabla 33 se muestran los cambios observados en el perfil fenólico de aceites obtenidos a partir de aceitunas de la variedad Picual en dos estadios de maduración extremos, IM = 1 e IM = 5 a las que se adicionó la dosis máxima de H₂O₂ (500 µL H₂O₂/kg de aceituna). Los compuestos fenólicos más afectados por este tratamiento fueron los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol, es decir FDAO, isómeros FAO y FAAO. La degradación oxidativa de estos compuestos se incrementó un 36% en el caso de aceitunas de la variedad Picual con IM = 1 y un 50% en Picual IM = 5. Dado que en ambos casos se añade una dosis idéntica, el que exista un mayor descenso de fenoles totales en el aceite producido a partir de aceitunas maduras (IM=5), estaría relacionado con la mayor carga de actividad POX que poseen los frutos en ese punto más avanzado de la maduración. Además de analizar las variaciones del perfil fenólico del AOV, en los ensayos se analizaron los contenidos de glucósidos fenólicos remanentes de las pastas de aceituna, comprobándose que la adición de H₂O₂ también incrementa significativamente la oxidación de estos compuestos en algo más del 10%.

Tabla 33. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de H_2O_2 ($510\mu\text{L/ kg}$ fruto) durante el procesado de frutos de la variedad Picual (IM=1 e IM=5)

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de H_2O_2			
	Picual IM 1		Picual IM 5	
	Control	+ H_2O_2	Control	+ H_2O_2
Hidroxitirosol	4,5	4,3	6,8	4,1
Tirosol	11,8	12,6	20,0	17,7
Ác. vanílico	3,4	2,1	1,0	0,5
Ác. <i>p</i> -cumárico	5,0	1,5	4,6	2,6
Acetato hidroxitirosol	19,0	22,3	17,2b	6,7a
FDAO	172,8b	80,5a	52,0b	29,1a
Isómeros FAO	105,0b	59,4a	116,4b	48,7a
FDAL	140,1	141,8	50,2	41,8
Pinorresinol	1,5	1,4	0,9	0,7
Ác. cinámico	6,6	0,7	1,4	1,0
1-Acetoxipinorresinol	19,9	14,5	19,3	17,7
FAAO	59,3b	31,8a	13,8b	6,6a
FAAL	54,5	59,5	8,8	5,5
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	8,8	9,8	13,1	11,5
Apigenina	2,1	2,5	4,0	4,0
Polifenoles totales	614,5b	466,9a	329,5b	198,3a
<i>o</i> -difenoles	369,6b	230,4a	219,4b	106,8a
Secoiridoideos	531,9b	372,9a	241,3b	131,8a

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.2.4. Adición de azida sódica.

Además de los ensayos anteriormente descritos en los que se potenciaba el efecto de la POX, también se estudió el efecto de que tiene la reducción la carga enzimática POX. Después de valorar la efectividad y selectividad de distintos inhibidores se eligió la azida sódica (NaN_3) debido a su alta especificidad para suprimir la actividad peroxidativa Aunque es evidente

que, a causa de su toxicidad, este compuesto no podría ser empleado nunca como aditivo durante el proceso de elaboración el AOV si resultaba el más adecuado para valorar individualmente la contribución de la POX dentro del conjunto de procesos oxidativos. Del mismo modo que en el ensayo de H_2O_2 , se probaron diferentes dosis de NaN_3 (66-264 mg/kg aceituna). La Tabla 34 muestra las modificaciones inducidas en el perfil fenólico de los aceites obtenidos tras adicionar la dosis máxima de azida a frutos de la variedad Picual en dos estadios de maduración extremos. En ambos casos se observó un incremento significativo del contenido total de fenoles, un 34% en frutos de Picual IM = 1 y un 23% en frutos de Picual IM = 5, siendo de nuevo los compuestos más afectados la FDAO, FAO y sus isómeros.

Tabla 34. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de azida sódica como inhibidor de POX (264 mg/ kg fruto) durante el procesado de los frutos de la variedad Picual (IM 1 e IM 5).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de NaN_3			
	Picual IM 1		Picual IM 5	
	Control	+ NaN_3	Control	+ NaN_3
Hidroxitirosol	6,0	5,9	5,6	5,4
Tirosol	18,0	17,1	17,7	20,3
Ác. vanílico	3,7	2,7	2,0	1,9
Ác. <i>p</i> -cumárico	9,0	9,2	3,2	3
Acetato hidroxitirosol	0	0	0	0
FDAO	174,3b	235,4a	84,8a	127,4b
Isómeros FAO	141,6	134,5	148,7b	165,7b
FDAL	147,1	156,1	37,3	40,7
Pinorresinol	6,9	8,7	2,6	1,7
Ác. cinámico	19,3a	28,9b	4,6	5,8
1-Acetoxipinorresinol	0	0	11,9	16,1
FAAO	97,6a	155,9ba	10,2	14,2
FAAL	59,9	88,7	3,4	13,7
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	15,5	18,5	12,5	9,8
Apigenina	4,4	5,0	3,6	3,5
Polifenoles totales	703,3a	876,7b	348,0a	429,2b
<i>o</i> -difenoles	435,0a	550,9b	261,7a	322,5b
Secoiridoideos	642,3a	780,7b	284,3a	361,7b

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.3. Modulación de la actividad PPO durante el proceso de obtención del aceite de oliva virgen: efecto en el perfil fenólico del aceite

Igual que se ha descrito en el apartado anterior para la POX, se diseñaron una serie de experimentos tanto para implementar la carga enzimática PPO presente durante las etapas de

molturación de la aceituna y batido de la pasta como para reducirla, valorándose el efecto de esta modulación de la actividad sobre el perfil fenólico de los aceites.

IV.5.3.1. Efecto de la adición de polifenol oxidasa de aceituna

A diferencia de la POX, la actividad PPO se localiza prácticamente en su totalidad en el mesocarpo de la aceituna con valores medios en torno a 200 U de PPO /g pulpa fresca y con niveles casi indetectables en la semilla (en torno a 1 U/g semilla fresca). Estos valores tan altos de actividad PPO en la aceituna supusieron una importante dificultad a la hora de incrementar la carga efectiva de PPO mediante la adición de enzimas exógenas. En este sentido, la única enzima disponible comercialmente y con efectividad demostrada frente a los fenoles de olivo, la PPO de champiñón (SIGMA...) no poseía la suficiente actividad específica para lograr incrementos significativos de actividad PPO en las pastas de aceituna. La única fuente más efectiva de actividad PPO fue el propio polvo acetónico de pulpa de aceituna. Dado que el polvo acetónico contiene actividad β -GLU además de PPO, el experimento se llevó a cabo seleccionando polvos acetónicos de pulpa mesocarpo de aceituna conteniendo niveles diferentes de actividad PPO pero manteniendo idéntica actividad β -GLU. De este modo, se diseñaron dos tratamientos distintos, en el primero se adicionaron 6.100 U de PPO, que representan un 30% de aporte extra de actividad PPO, mientras que en el segundo el incremento de la actividad fue del 100% al adicionar 20.000 U de PPO. El incremento de la carga enzimática de PPO causó un descenso proporcional del contenido fenólico tal que, con la adición del 30% de PPO la degradación oxidativa aumentó un 45% y con la adición del 100% de PPO el descenso fue de un 70%. Prácticamente, como se observa en los datos reflejados en la Tabla 35., los valores iniciales de FDAO y de los isómeros FAO caen hasta cero cuando se duplica la actividad PPO presente inicialmente en las aceitunas de la variedad Picual IM = 5 con las que se realizó el experimento.

Tabla 35. Contenido fenólico ($\mu\text{mol}/\text{kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de PPO durante el procesado de los frutos de la variedad Picual (IM 5).

Polifenoles ($\mu\text{mol}/\text{kg}$ aceite)	Efecto de la adición de PPO de pulpa		
	Control Picual IM 5	+ 30% PPO	+ 100% PPO
Hidroxitirosol	6,2	5,2	4,2
Tirosol	12,3	11,3	10,4
Ác. vanílico	1,2	0,7	0,8
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,0	0,0	0,0
Acetato hidroxitirosol	0,0	0,0	0,0
FDAO	173,7c	84,3b	15,4a
Isómeros FAO	79,2c	10,3b	5,4b
FDAL	224,8c	142,5b	92,9a
Pinorresinol	5,4	3,2	1,7
Ác. cinámico	3,7b	0,8a	0,4a
1-Acetoxipinorresinol	50,3c	40,2b	24,8a
FAAO	0,0	0,0	0,0
FAAL	0,0	0,0	0,0
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0
Luteolina	9,9	9,4	10,3
Apigenina	4,4	3,7	3,4
Polifenoles totales	571,2c	311,6b	169,7a
<i>o</i> -difenoles	269,1c	109,2b	35,3a
Secoiridoideos	477,8c	237,1b	113,7a

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.3.2. Efecto de la adición de tropolona

La tropolona es una sustancia natural usada para el control de patógenos en frutas que actúa como inhibidor específico de la actividad PPO. Se adicionó en distintas dosis en el intervalo de 18-480 mg/kg aceituna. La dosis más elevada se empleó para realizar ensayos de adición tanto en la molienda de los frutos de la variedad Picual IM = 1, como en el batido de

las correspondientes pastas. Según se observa en la Tabla X el efecto del inhibidor resultó ser mayor cuando la adición se produjo sobre el molino, aumentando en este caso un 95% el contenido de los *o*-difenoles, mientras que cuando se hizo durante el batido el aumento del contenido de *o*-difenoles sólo llegó al 53%.

Tabla 36. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de tropolona como inhibidor de PPO (480 mg/ kg fruto) durante el procesado de los frutos de la variedad Picual (IM 1).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de tropolona		
	Control Picual IM 1	+ tropolona en molino	+ tropolona en batido
Hidroxitirosol	9,0ab	8,0a	11,0b
Tirosol	10,8a	15,8b	10,5a
Ác. vanílico	3,6a	6,4b	7,5b
Ác. <i>p</i> -cumárico	2,7	3,1	3,1
Acetato hidroxitirosol	11,2a	19,0b	16,7b
FDAO	223,6a	420,8c	321,8b
Isómeros FAO	263,6a	608,7c	478,6b
FDAL	162,1a	203,5b	176,7a
Pinorresinol	0,0	0,0	0,0
Ác. cinámico	13,2a	25,2c	22,5b
1-Acetoxipinorresinol	0,0	0,0	0,0
FAAO	69,3a	87,6b	63,7a
FAAL	15,9a	21,3b	19,5ab
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0
Luteolina	13,9a	16,1b	14,9ab
Apigenina	7,0	6,6	6,6
Polifenoles totales	805,9a	1442,0c	1153,0b
<i>o</i> -difenoles	590,6a	1160,1c	906,6b
Secoiridoideos	734,5a	1341,8c	1060,2b

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Igual que en los experimentos de modulación de la actividad POX, además de analizar las variaciones del perfil fenólico del AOV, en estos ensayos se analizaron los contenidos de

glucósidos fenólicos remanentes de las pastas de aceituna, comprobándose que la adición de tropolona también reduce significativamente la oxidación de estos compuestos que aumentan su contenido casi en un 40%.

IV.5.4 Otros ensayos

IV.5.4.1. Adición de lipoxigenasa

Como se ha comentado al comienzo del apartado IV.1 la enzima LOX no parece estar implicada en la oxidación de compuestos fenólicos en la aceituna. Sin embargo, parece claro que al ser una enzima oxidativa con una potente actividad en la etapa de molturación del fruto parece claro que debe estudiarse su posible interacción con las oxidoreductasas que si oxidan a los compuestos fenólicos. Los ensayos se llevaron a cabo como en casos anteriores utilizando el sistema Abencor. Para valorar el efecto de la enzima LOX sobre la oxidación de compuestos fenólicos se realizaron adiciones de LOX comercial de soja sobre frutos de la variedad Arbequina en los dos estadios de maduración extremos IM = 1 y 5.molienda. Tal y como se puede apreciar en los resultados mostrados en la Tabla 37, la adición de LOX sobre Arbequina produjo un aumento del contenido fenólico del AOV. En Arbequina IM=1 el contenido total de fenoles aumentó un 56% y el de *o*-difenoles un 87% (principalmente acetato de hidroxitirosol y FDAO). En los frutos de IM=5 los incrementos fueron menores con un aumento del 17% en fenoles totales y un 31% el de *o*-difenoles (principalmente acetato de hidroxitirosol y, en menor medida, FDAO). Estos resultados podrían explicarse como un fenómeno de competencia, ya que tanto LOX como PPO requieren O₂ como cosustrato y el exceso de LOX limitaría la disponibilidad de O₂ para la PPO.

Tabla 37. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de LOX (10000U/ kg fruto) durante el procesado de los frutos (Picual IM 1 y 5).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de LOX			
	Arbequina IM 1		Arbequina IM 5	
	Control	+ LOX	Control	+ LOX
Hidroxitirosol	2,8	2,9	3,0	3,0
Tirosol	8,7	7,6	7,2	5,0
Ác. vanílico	2,4	1,9	0,9	1,0
Ác. <i>p</i> -cumárico	6,4	7,0	2,4	3,0
Acetato hidroxitirosol	22,0	45,1	50,0	126
FDAO	363,3	697,7	437,1	512,0
Isómeros FAO	25,3	39,2	7,9	13,0
FDAL	274,5	334,7	203,1	185,0
Pinorresinol	2,0	1,9	1,9	2,0
Ác. cinámico	4,4	5,5	4,4	5,0
1-Acetoxipinorresinol	55,7	57,3	48,6	44,0
FAAO	0,0	0,0	0,0	0,0
FAAL	0,0	0,0	0,0	0,0
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	7,2	8,4	10,0	10,0
Apigenina	1,9	2,3	1,5	2,0
Polifenoles totales	776,6	1211,6	778,0	910,0
<i>o</i> -difenoles	420,6	793,3	508,1	664,0
Secoiridoideos	663,2	1071,6	648,1	710,0

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

IV.5.4.2. Adición de metabisulfito sódico y ácido cítrico.

El metabisulfito sódico (MB) tiene una reconocida capacidad antioxidante que ha extendido su uso como conservante de alimentos. Según los experimentos realizados *in vitro*, el MB inhibe la oxidación del guayacol por POX y de TBC por PPO; y por tanto, cabría esperar

que la adición de MB en la etapa de molienda incrementase el contenido final de los fenoles en el AOV. En los experimentos realizados se emplearon dosis en el rango de 500-2000 ppm de este compuesto adicionadas en molino y en batido. Contrariamente a lo esperado, el efecto obtenido fue en todos los casos un descenso del contenido fenólico de los aceites, dependiente de la dosis y siempre mayor cuando la adición se efectuaba en el molino. La Tabla 38 muestra los resultados obtenidos al añadir 2000 pmm de MB (3 g/kg aceituna) en el molino sobre aceitunas de las variedades Arbequina y Picual ambas en el mismo estadio de maduración (IM = 1). El contenido total de polifenoles del AOV disminuyó un 23% en el caso de Arbequina (51% los secoiridoideos, 12% los *o*-difenoles) y un 46% en Picual (65% los secoiridoideos, 62% los *o*-difenoles). Por otro lado, es importante señalar que el acetato de hidroxitirosol aumentó un 210% en Arbequina y un 524% en Picual. Experimentos complementarios realizados *in vitro* la β -GLU de olivo, apuntan a que el MB podría estar actuando en las pastas como inhibidor de esta enzima más que como antioxidante capaz de inhibir a POX o PPO.

Un segundo bloque de estudios se hizo utilizando el MB en combinación con ácido cítrico. Las Tablas 39 y 40 muestran los resultados obtenidos tras la adición conjunta de 2000 ppm de metabisulfito con ácido cítrico sobre las variedades Arbequina y Picual en los estadios de maduración IM = 1 y 5. Por efecto de esta adición conjunta en las aceitunas maduras (IM=5) los fenoles totales descendieron un 14% en Arbequina y un 60% en Picual y los *o*-difenoles un 12% en Arbequina y un 62% en Picual. En los frutos verdes (IM = 1) el contenido de fenoles totales aumentó un 16% en Arbequina y un 9% en Picual; los secoiridoideos no se vieron prácticamente afectados en ninguna de los dos variedades (disminuyó un 24% en Arbequina y un 3% en Picual); sin embargo, al desgranar los compuestos que comprenden los derivados secoiridoideos, se observó que los derivados del ligustrósido descendieron un 63% en Arbequina y un 49% en Picual mientras que los *o*-difenoles en Arbequina aumentaron un 134% y un 53% en Picual, siendo la máxima contribución la del acetato de hidroxitirosol.

Tabla 38. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de metabisulfito sódico (3 g/ kg fruto) durante el procesado de los frutos (Arbequina y Picual IM 1).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de metabisulfito			
	Arbequina IM 1		Picual IM 1	
	Control	+ MB	Control	+ MB
Hidroxitirosol	5,1a	5,8ab	7,7	7,6
Tirosol	11,9a	27,5cc	15,0	29,0
Ác. vanílico	2,1a	7,6b	4,4	10,8
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,8a	1,1ab	7,2	8,9
Acetato hidroxitirosol	9,3a	28,8b	8,5	44,5
FDAO	100,8c	39,1a	96,0	27,2
Isómeros FAO	33,9a	34,0a	125,1	32,4
FDAL	242,7d	99,0c	160,0	78,2
Pinorresinol	5,0a	5,9b	4,6	2,1
Ác. cinámico	1,8ab	1,5a	1,9	1,3
1-Acetoxipinorresinol	73,2ab	80,6bc	42,5	25,1
FAAO	0,0	0,0	96,7	0,0
FAAL	10,9ab	17,1b	69,4	55,7
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	29,4a	49,3b	15,0	22,6
Apigenina	13,1a	17,9ab	5,4	7,8
Polifenoles totales	540,3	417,2	659,5	353,2
<i>o</i> -difenoles	178,4	157,1	349,1	134,3
Secoiridoideos	388,3	189,3	547,2	193,5

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Tabla 39. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de metabisulfito sódico + ácido cítrico (3g MB+ 6g ácido cítrico/ kg fruto) durante el procesado de los frutos (Arbequina IM 1 y 5).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de metabisulfito + ácido cítrico			
	Arbequina IM 1		Arbequina IM 5	
	Control	+ MB + cítr	Control	+ MB + cítr
Hidroxitirosol	5,1	5,5	32,4	7,1
Tirosol	11,9	12,1	21,4	8,4
Ác. vanílico	2,1	13,1	3,8	8,8
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,7	2,7	2,3	1,7
Acetato hidroxitirosol	9,3	153,6	61,9	103
FDAO	100,8	170,6	73,4	27,5
Isómeros FAO	33,9	39,4	14,8	10,0
FDAL	242,7	81,41	13,9	7,6
Pinorresinol	5,0	5,1	2,0	3,3
Ác. cinámico	1,8	1,5	2,6	1,2
1-Acetoxipinorresinol	73,2	70,4	23,8	22,5
FAAO	0,0	0,0	0,0	0,0
FAAL	10,9	3,71	10,6	6,1
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	29,4	47,9	32,3	41,6
Apigenina	13,1	16,8	11,9	14,2
Polifenoles totales	540,3	625,6	307,9	263,9
<i>o</i> -difenoles	178,4	417,0	214,8	189,4
Secoiridoideos	388,3	295,1	112,7	51,1

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Tabla 40. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de metabisulfito sódico + ácido cítrico (3g MB+ 6g ácido cítrico/ kg fruto) durante el procesado de los frutos (Picual IM 1 y 5).

Polifenoles ($\mu\text{mol/kg}$ aceite)	Efecto de la adición de metabisulfito + ácido cítrico			
	Picual IM 1		Picual IM 5	
	Control	+ MB + cítr	Control	+ MB + cítr
Hidroxitirosol	7,7	7,9	11,2d	6,3a
Tirosol	15,0	12,3	22,8d	12,4c
Ác. vanílico	4,4	9,1	1,3a	2,7c
Ác. <i>p</i> -cumárico	7,2	11,4	3,0b	3,1b
Acetato hidroxitirosol	8,5	85,0	10,7b	15,4c
FDAO	96,0	74,7	204,6e	11,8a
Isómeros FAO	125,1	294,7	459,6c	199,5a
FDAL	160,0	73,9	117,0e	15,2a
Pinorresinol	4,6	3,5	2,9bc	2,5a
Ác. cinámico	1,9	1,5	6,9b	2,4a
1-Acetoxipinorresinol	42,5	28,4	52,3c	32,5a
FAAO	96,7	46,7	59,5d	22,1a
FAAL	69,4	39,3	57,7b	43,1a
Ác. ferúlico	0,0	0,0	0,0	0,0
Luteolina	15,0	24,4	42,6b	40,4ab
Apigenina	5,4	7,5	15,3e	14,1d
Polifenoles totales	659,5	720,5	1067,4	423,3
<i>o</i> -difenoles	349,1	533,4	788,1	295,3
Secoiridoideos	547,2	529,4	898,3	294,6

*Cada dato es la media de tres determinaciones analíticas realizadas sobre dos experimentos diferentes. Los valores acompañados de letras distintas indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

La complejidad de los resultados obtenidos podría deberse no sólo a las complejas interacciones que se establecen en las mezclas de antioxidantes sino también a modificaciones del pH de las pastas de aceituna que pudieran afectar de distinta forma a las enzimas implicadas en el proceso.

IV.5.4.3. Adición de ácido ascórbico

La adición de ácido ascórbico se probó por ser este compuesto un buen antioxidante y un conocido aditivo alimentario que además, mediante ensayos *in vitro*, se había comportado como un eficaz inhibidor de las actividades oxidativas POX y PPO. La adición de ácido ascórbico (3,5 g/ kg fruto) se hizo en la etapa de molturación y sobre aceitunas de la variedad Picual IM = 5. Como se observa en la Figura 45, el tratamiento produjo un incremento en el contenido final de compuestos fenólicos en el aceite del 25%.

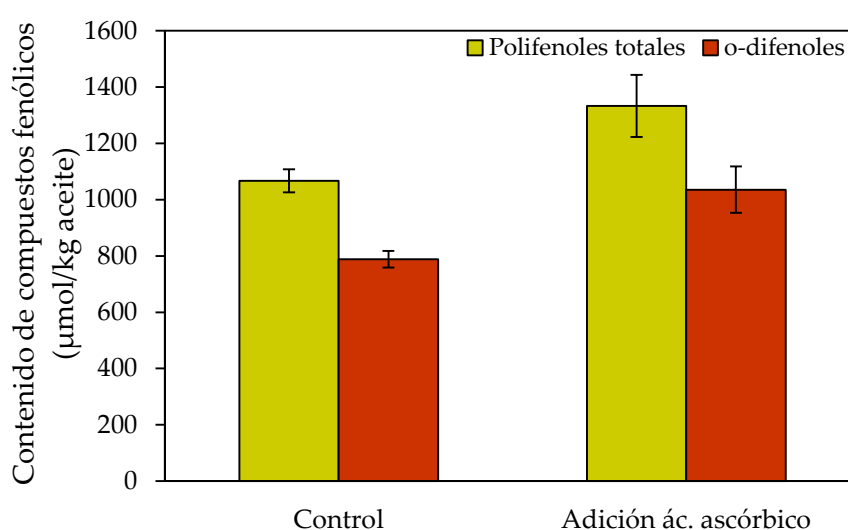


Figura 45. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición ácido ascórbico (3,5 g/ kg fruto) durante el procesado de los frutos (Picual IM = 5).

IV.5.4.4. Adición de ácido gálico y ácido oxálico.

Igual que en el caso anterior se estudió el efecto de los los ácidos gálico y oxálico como antioxidantes alimentarios habituales. El tratamiento también en este caso, se realizó directamente en el molino sobre aceitunas de la variedad Picual con IM = 5. El efecto fue el mismo ya comentado para el ascórbico, ya que en ambos casos aumentó el contenido fenólico

del AOV. Tal y como se observa en la figura, el aumento de compuestos fenólicos observado fue en torno al 11% al añadir ácido gálico y cercano al 13% al añadir ácido oxálico.

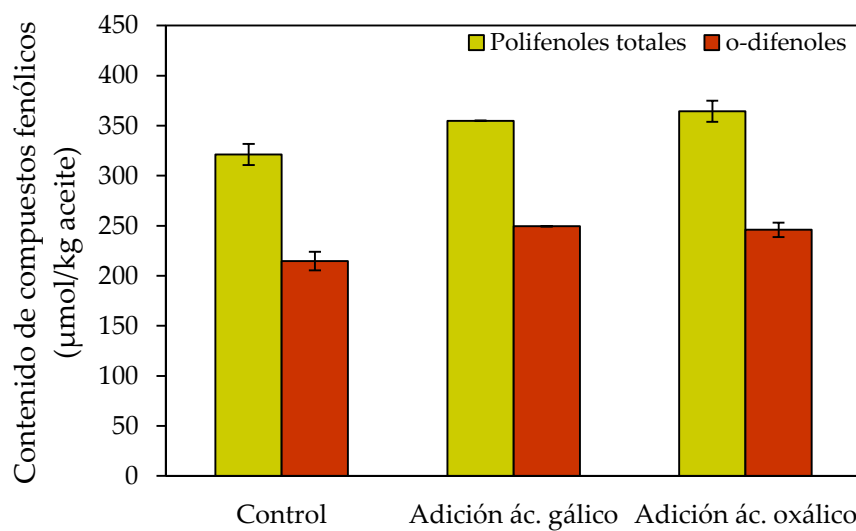


Figura 46. Contenido fenólico ($\mu\text{mol/kg}$ aceite) de los aceites obtenidos tras la adición de ácido gálico (680 mg/kg fruto) y ácido oxálico (360 mg/kg fruto) durante el procesado de frutos de la variedad Picual ($\text{IM} = 5$).

Los compuestos fenólicos están íntimamente vinculados con los atributos de calidad del aceite de oliva virgen. Como ya se ha comentado en la Introducción, el perfil fenólico del AOV está condicionado por la composición fenólica inicial del fruto que dependerá en buena parte de la variedad del olivo, de las técnicas de cultivo y de recolección, de la conservación y del procesado del fruto. Todos esos factores condicionarán el nivel de precursores fenólicos presentes en la aceituna así como la actividad de las enzimas que regulan la biosíntesis y el catabolismo de los compuestos fenólicos. La escasez de estudios bioquímicos relacionados con el metabolismo de compuestos fenólicos justifica la necesidad de explorar los factores bioquímicos determinantes en la síntesis y/o degradación de éstos durante el proceso de obtención del AOV. En relación con la primera etapa de esta síntesis, en estudios anteriores, se purificó y caracterizó una proteína con actividad β -GLU (Romero-Segura, 2009) capaz de hidrolizar selectivamente los glucósidos del fruto y se investigó el papel de esta β -GLU de olivo en la formación de los compuestos mayoritarios del AOV, los derivados secoiridoideos (Romero-Segura, 2012). El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido investigar el papel que juegan las enzimas óxido-reductasas POX, PPO y LOX en la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos que caracterizan al AOV, profundizando especialmente en la contribución de la POX mediante la purificación y caracterización de las proteínas con actividad POX en aceituna.

A pesar de que existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que las actividades óxido-reductasas son determinantes en el contenido final de compuestos fenólicos en el AOV, no existían resultados concluyentes acerca de la capacidad real de POX, PPO y LOX para oxidar a los compuestos fenólicos naturales del olivo. Ya en una fase preliminar de este estudio, la actividad LOX fue descartada como enzima implicada en el metabolismo de los polifenoles, ya que todos los experimentos de cooxidación realizados, tanto con LOX comercial de soja como extractos de LOX de aceituna, utilizando fenoles de la aceituna y el AOV como co-sustratos de la reacción de oxidación del ácido linolénico, proporcionaron resultados negativos. Estos resultados negativos se vieron corroborados en los ensayos de extracción de aceite en los que se adicionaron distintas dosis de LOX comercial de soja

durante la molturación de frutos de las variedades Picual y Arbequina. El perfil fenólico de los aceites de la variedad Picual no se vio alterado; por el contrario, sí se observó efecto en el caso de los aceites de la variedad Arbequina. Sin embargo, a diferencia de lo que cabría esperar, la adición de LOX de soja provocó un aumento en el contenido final de fenoles. Estos resultados se podrían explicar en base a la competencia de las enzimas LOX y PPO que requieren la presencia de oxígeno como cosustrato. Esta limitación de la actividad LOX de aceituna por la reducida disponibilidad de O₂ fue demostrada por Sánchez-Ortiz et al. (2008). En este estudio se comprobó que el contenido de compuestos volátiles del AOV, sintetizados a través de la ruta de la LOX, se incrementa con el aumento de la concentración de oxígeno presente durante el proceso de obtención del AOV. En el mismo sentido, Taticchi et al. (2013), describieron que la tasa de la oxidación de fenoles por PPO aumentaba proporcionalmente con la concentración de oxígeno. Por tanto, una dosis extra de LOX, que consumiría oxígeno como cosustrato, retiraría oxígeno del medio impidiendo que éste fuera empleado por la PPO, inhibiendo en cierto grado su capacidad oxidativa y provocando un incremento del contenido final de compuesto fenólicos en el AOV. Paralelamente, se ha demostrado el efecto inhibitor de los fenoles de la aceituna sobre la actividad LOX, lo que permite confirmar que la LOX no está implicada de manera directa en el metabolismo de los compuestos fenólicos, sino únicamente en la biosíntesis de la fracción volátil del AOV (Sánchez-Ortiz et al., 2012).

Una vez descartada la implicación de LOX parece claro que la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos durante el procesado de la aceituna debe recaer en la POX y/o PPO. En este sentido, la comparación entre los perfiles fenólicos de aceites de las variedades Arbequina y Picual obtenidos inmediatamente después de la molienda y aquéllos obtenidos tras 30 minutos de batido, mostró grandes diferencias en el contenido fenólico de los aceites que sin duda son atribuibles a la degradación oxidativa de estos compuestos. El contenido fenólico de los aceites fue máximo a tiempo cero de batido y, se redujo a medida que se prolongó el tiempo de batido de la pasta de aceituna, con un descenso del 60% en el caso de Arbequina y un 41,4% en Picual a los 30 minutos de batido. Los datos obtenidos, que apoyan resultados previos recogidos en la bibliografía (Servili et al., 2004), muestran que los componentes más afectados en ambas variedades de aceituna fueron el acetato de

hidroxitirosol y la FDAO. Esta degradación sería consecuencia directa de la actuación de las actividades óxido-reductasas POX y PPO aunque no se podría conocer a priori la contribución relativa de cada una de ellas. Para intentar hacer una primera estimación de la contribución relativa de ambas enzimas POX y PPO a la oxidación de compuesto fenólicos se procedió a evaluar la actividad de ambas durante el proceso de obtención del AOV. En estos estudios se evaluó paralelamente la actividad β -GLU como principal responsable de la síntesis de compuestos secoiridoideos. La cuantificación de las actividades remanentes de β -GLU, POX y PPO a distintos tiempos de batido (0, 15 y 30 minutos), indicó que la POX era la única de las tres enzimas relacionadas con el metabolismo de polifenoles que se mantenía activa a lo largo de todo el proceso con un 20% de actividad remanente al final de la etapa de batido respecto a la que presentaba el fruto fresco. Por el contrario, la β -GLU se inactivaba durante la etapa de molienda y la PPO lo hacía a mitad del proceso de batido manteniendo sólo un 15% de la actividad inicial hasta los 15 minutos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Taticchi et al. (2013) que observaron que la actividad POX se mantenía durante todo el proceso de obtención del aceite mientras que la PPO se inactiva más rápidamente. Paralelamente, estas mismas actividades enzimáticas fueron estudiadas a lo largo de la maduración de cinco variedades seleccionadas de aceituna (Menya, Piñonera, Shengeh, Arbequina y Picual), comparándose sus perfiles de actividad con los cambios del contenido fenólico de los correspondientes aceites. También en este caso se observó una buena correlación entre el descenso del contenido fenólico de los aceites obtenidos de frutos de grado de maduración creciente y la evolución de los niveles de actividad POX en esos mismos estadios de maduración. A diferencia de lo observado para la actividad POX, que aumenta su actividad desde el estadio 2 hasta el estadio 5 (octubre-enero), la actividad PPO no siguió una tendencia definida en el período estudiado. La evolución del contenido fenólico de los frutos de estas variedades coincide con la tendencia natural (García *et al.*, 2002; Gómez-Rico *et al.*, 2008) en la que hidroxitirosol y demetiloleuropeína aumentan con la maduración y, por el contrario, oleuropeína y ligustrósido descienden. Sin embargo, este mismo estudio pone de manifiesto la existencia de ciertas discordancias entre los niveles de actividad POX de variedades cuyos aceites poseen niveles extremos de compuestos fenólicos (Shengeh y

Menya) lo que sugiere que hay que tener en cuenta otros factores adicionales como el contenido fenólico de la aceituna, precursores de los derivados secoiridoideos del AOV, que son mucho más elevados en Menya que en Shengeh, y también la influencia de la actividad β -GLU que es mayor en Menya.

Los ensayos iniciales de extracción de proteínas con actividad POX y PPO y la cuantificación de sus niveles de actividad se llevaron a cabo tanto en pulpa como en semilla de las variedades Arbequina y Picual. Sin embargo, y aunque la congelación con nitrógeno líquido puede ser un método adecuado para semilla, la necesidad de disponer de un material estable y homogéneo de ambos tejidos durante largos períodos de tiempo, nos llevó a utilizar polvos acetónicos de pulpa y semilla de aceituna para la obtención de los extractos enzimáticos

La primera conclusión evidente de estos estudios fue que, tal y como se sugería en estudios preliminares (Luaces *et al.*, 2007; Servili *et al.*, 1999; Amirante *et al.*, 2006 y Servili *et al.*, 2007), prácticamente toda la actividad POX de aceituna se localiza en la semilla, mientras que la actividad PPO se distribuye mayoritariamente en la pulpa de la aceituna. Así mismo, es importante señalar que no se han encontrado diferencias significativas entre las variedades objeto de estudio, Arbequina y Picual, respecto a la carga de ambas actividades enzimáticas. La distribución de ambas actividades óxido-reductasas en distintos tejidos fue clave para el desarrollo de este trabajo ya que facilitó la evaluación de cada una de ellas de manera independiente.

La actividad PPO, principal responsable de la reacción de pardeamiento enzimático por oxidación de fenoles, ya había sido relacionada con el metabolismo de los compuestos fenólicos en aceituna, pero siempre de un modo indirecto, cuantificando su actividad con fenoles simples y relacionándola con medidas paralelas del contenido de fenoles del olivo a lo largo de la maduración (Ben-Shalom *et al.*, 1977; Goupy *et al.*, 1991; Ortega-García y Peragón, 2009), existiendo un único trabajo previo acerca de la oxidación enzimática de la oleuropeína por la PPO de champiñón (Tzika *et al.*, 2008). En el presente trabajo se han utilizado por primera vez como sustratos de la PPO de aceituna tanto compuestos fenólicos de la aceituna como derivados secoiridoideos mayoritarios en el AOV. Se ha observado que, el pH óptimo

para la reacción de oxidación de fenoles catalizada por la actividad PPO fue 6,5, aunque no existen grandes variaciones de actividad en el rango de pH comprendido entre 5.5 y 7.2. Este valor coincide con el pH óptimo encontrado en pulpa de aceituna de la variedad manzanilla por Segovia-Bravo *et al.* (2007). El estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad PPO permitió establecer que en el intervalo de 10-50 °C las variaciones de actividad son inferiores al 20%. Este dato sobre el rango óptimo de temperatura calculado para la actividad PPO de pulpa de aceituna de la variedad Picual coincide con los obtenidas para cuatro variedades distintas de aceituna tales como Coratina, Ogliarola, Moraiolo y Peranzana (Tatichi *et al.*, 2013). Este dato sobre el rango óptimo de temperatura de la actividad PPO en aceituna concuerda con lo descrito en la bibliografía para otros productos vegetales como el aguacate (Vanini *et al.*, 2010 Una vez que se optimizaron las condiciones de extracción y de medida de la actividad PPO empleando TBC como sustrato en determinaciones colorimétricas y SDS para activar la PPO oxidasa latente (Espín *et al.*, 1999; Cabanes *et al.*, 2007), se procedió a analizar la capacidad oxidativa de dicha actividad enzimática frente a los compuestos fenólicos de la aceituna y el AOV. Para ello se llevó a cabo una purificación parcial de la PPO mediante precipitación fraccionada con sulfato amónico (35-60%). Con los extractos parcialmente purificados se realizaron estudios de oxidación de los compuestos fenólicos mediante incubaciones *in vitro* cuyos blancos de reacción se realizaron con la enzima inactivada o bien empleando tropolona, que es un potente inhibidor de la actividad PPO (Fortea *et al.*, 2009). En una primera fase de estudio se demostró que la actividad PPO de aceituna posee la capacidad de oxidar a los compuestos fenólicos de la aceituna. Los fenoles mayoritarios de la aceituna fueron ensayados de manera aislada y en diferentes mezclas. Los resultados más relevantes se obtuvieron con las mezclas de fenoles ya que estas simulan, en la medida de lo posible, la situación que tiene lugar en la etapa de molienda del fruto cuando se ponen en contacto enzimas y sustratos antes separados en distintos compartimentos celulares. En estos ensayos de competencia de sustratos se pone de manifiesto que la enzima PPO muestra una mayor selectividad por el acetato de hidroxitirosol y el verbascósido, muy baja selectividad por la demetiloleuropeína en presencia de oleuropeína y no resultó ser activa frente al glucósido fenólico ligustrósido, precursor de los derivados secoiridoideos FDAL y

FAAL. Los resultados obtenidos en incubaciones *in vitro* de PPO con sustratos puros indican que la oxidación de oleuropeína en el tiempo se produce de manera lineal durante los 30 minutos en los que se llevan a cabo las reacciones, que en la reacción con hidroxitirosol se observa la formación de productos de oxidación que también son sustratos de la enzima PPO (García-Molina, 2007) y que la reacción con tirosol, aunque requiera de un período de tiempo largo, tiene lugar, lo que implicaría la existencia de actividad monofenolasa o tirosinasa (Espín et al., 2001), nunca antes descrita en aceituna. Cuando el extracto parcialmente purificado de PPO de aceituna se incubaba con fenoles de AOV se observa la máxima actividad frente a los *o*-difenoles mayoritarios en el aceite (FDAO, isómeros FAO y FAAO) en los que se aprecia una degradación lineal hasta los 20 minutos, tiempo a partir del cual se observa que la velocidad de reacción desciende considerablemente. De esta forma se confirmó que la actividad PPO de aceituna, como se apuntó en estudios anteriores (Goupy *et al.*, 1991), exhibe preferentemente actividad difenolasa. Estos ensayos *in vitro* se vieron corroborados con experimentos de extracción de aceite en los que se aumentó la carga efectiva de actividad PPO. Para aumentar la carga efectiva no fue posible emplear enzimas comerciales, como la PPO de champiñón, ya que la elevada actividad PPO existente en la aceituna, hace imposible incrementar de manera significativa la actividad PPO. Con este objetivo, los experimentos de aumento de la actividad PPO se hicieron utilizaron distintas dosis de polvos acetónicos de pulpa de aceituna. Dado que los polvos acetónicos de pulpa de aceituna, además de actividad de PPO, también tienen actividad β -GLU, los polvos acetónicos seleccionados para estos experimentos poseían distintas dosis de PPO pero la misma actividad β -GLU con el objetivo de evaluar únicamente la acción de la enzima óxido-reductasa sobre el perfil fenólico del AOV. El incremento del 30% de actividad PPO en la etapa de molienda provocó un descenso del 45% en contenido fenólico total, mientras que la adición del 100% de actividad PPO dio lugar a un descenso del contenido fenólico del 70%. Los compuestos más susceptibles de ser oxidados por la actividad PPO fueron los *o*-difenoles. Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos en los que se redujo el nivel de actividad PPO durante el proceso de obtención del aceite mediante el uso de un inhibidor específico de la actividad PPO, la tropolona (Subramanian *et al.*, 1999; Jiménez-Atiénzar *et al.*, 2009). La tropolona fue añadida en distintas

dosis eligiéndose la mayor de ellas, 480 mg/kg de aceituna, para realizar adiciones tanto en la etapa de molienda como en la de batido, incrementándose el contenido de polifenoles totales un 95 y un 53% respectivamente. Los resultados obtenidos indican que la oxidación catalizada por la actividad PPO se inicia en el mismo instante en que la rotura del tejido pone en contacto enzima y sustratos y que sufre una rápida inactivación durante la etapa de molienda.

Las proteínas con actividad POX son glicoproteínas ampliamente distribuidas en el reino vegetal y con numerosas funciones biológicas asignadas que en el ámbito de los alimentos vegetales las relacionan con alteraciones importantes de sabor, aroma, color, textura y valor nutricional. En aceituna se han descrito ensayos *in vitro* que relacionan la POX con cambios de color (Roca *et al.*, 2007) y textura (Saraiva *et al.*, 2007) pero no existen publicaciones previas que hayan estudiado la degradación oxidativa de los fenoles del olivo por esta vía. En este sentido, es importante señalar que en las publicaciones previas la actividad POX se determinó utilizando sustratos sintéticos como el ABTS y se expresó simplemente en términos de incremento de absorbancia (Tzika *et al.*, 2009). En esta memoria se presentan por primera vez evidencias experimentales de la degradación oxidativa tanto de los glucósidos fenólicos como de sus productos de hidrólisis, los derivados secoiridoideos, por acción de la actividad POX presente en la semilla de aceituna.

Con el objetivo de extraer selectivamente proteínas con actividad POX se realizaron extracciones enzimáticas empleando distintos valores de pH. Se comprobó que a pH 5.5 se favoreció en mayor medida la extracción selectiva de las proteínas con actividad POX. Sin embargo, en este medio se produjeron rápidas pérdidas de actividad en los extractos que limitaban la realización del estudio. Por este motivo, se seleccionó como pH óptimo para la extracción el valor de 6,7, que se aproxima bastante a los empleados en la extracción de POX en pulpa de aceituna madura (Saraiva *et al.*, 2007; Tzika *et al.*, 2009) y que permite una extracción bastante selectiva de las proteínas con actividad POX. En cualquier caso, es conveniente resaltar que, como ya se ha comentado, el valor de pH permite extraer un mayor nivel de actividad POX fue 5,5, que se encuentra más próximo al valor medio de pH de las pastas de aceituna durante el proceso de obtención del AOV. Se ha comprobado además que

la utilización de tritón en el tampón mejora la extracción de actividad POX, lo que induce a pensar que en aceituna existen proteínas con actividad POX asociadas a membranas. En la bibliografía se describen tanto POX solubles, como asociadas a membrana o a la pared celular de productos vegetales. Algunas de las enzimas asociadas a membranas han sido descritas en el melón (Rodríguez-López et al., 2000), el pimiento rojo (Serrano-Martínez et al., 2008; Núñez-Delicado et al., 2008), la papaya (Da Silva et al., 1990) y la fresa (Civello et al., 1995).

Una vez que fueron optimizadas las condiciones de aislamiento de las proteínas con actividad POX y las medidas de actividad por procedimientos espectrofotométricos se procedió a estudiar la capacidad oxidativa de la POX de semilla con los glucósidos fenólicos del fruto y con fenoles del AOV. Los resultados obtenidos en las reacciones con mezclas de los glucósidos mayoritarios de la aceituna han puesto de manifiesto la enorme selectividad de la POX por el verbascósido, y un nivel de oxidación muy similar con la oleuropeína y la demetiloleuropeína. Los datos sobre estos dos glucósidos son especialmente relevantes ya que son precursores de los derivados secoiridoideos FDAO (producto de la hidrólisis de la demetiloleuropeína catalizada la actividad β -GLU) y los isómeros FAO y la forma FAAO (formados por hidrólisis de la oleuropeína) (Romero et al., 2012). De los datos experimentales obtenidos utilizando como sustratos los compuestos fenólicos del AOV puede deducirse que la POX, que actúa durante la molturación de la aceituna y el batido de las pastas, es más activa frente a *o*-difenoles (derivados de la oleuropeína) que frente a monofenoles (derivados del ligustrósido). Algo similar sucede con los flavonoides, encontrándose una tasa de oxidación mayor para la luteolina (el *o*-difenol) que para la apigenina (monofenol).

Dado que los ensayos *in vitro* demostraron la habilidad de la POX para oxidar tanto los compuestos fenólicos presentes en el fruto como los mayoritarios del AOV, se diseñó una serie de experimentos *in vivo* en los que se modificó la carga efectiva de actividad POX, implementándola o reduciéndola, con el objetivo de investigar la contribución real de dicha actividad a la conformación del perfil fenólico del AOV. La capacidad de la actividad POX de semilla de aceituna para oxidar fenoles durante el proceso de obtención del aceite ya había sido sugerida en estudios tecnológicos anteriores a nivel tecnológico en los que se describía la relación existente entre el deshuesado de la aceituna y el aumento en el contenido fenólico de

los aceites (Lavelli *et al.*, 2005; Amirante *et al.*, 2006; Luaces *et al.*, 2007). Para ello, se llevaron a cabo extracciones de aceite en las que se incrementaban los niveles de actividad POX de forma exógena. El incremento del nivel de actividad POX utilizando POX de rábano comercial dio lugar a un leve descenso en el contenido de compuestos fenólicos del aceite. El escaso efecto obtenido con la enzima comercial, 12% de descenso en el contenido fenólico cuando se añadió en el molino y 20% de descenso cuando se adicionó en el batido, contrasta con la fuerte actividad mostrada por la enzima comercial *in vitro*. Esta discrepancia podría explicarse en base a una intensa y rápida inactivación de la enzima durante la molienda de la aceituna. Sin embargo, cuando se utilizó la semilla de aceituna como fuente de POX el descenso de o-difenoles en los aceites de Picual y Arbequina fue superior al 50%. Teniendo en cuenta que los estudios realizados mostraban que la mayor parte de la actividad POX se localizaba en la semilla de la aceituna, se llevaron a cabo diferentes experimentos con frutos partenocárpicos de aceituna (zofairones). Los resultados obtenidos demostraron que tanto el perfil fenólico de los frutos como el de los correspondientes aceites eran similares en frutos normales y frutos partenocárpicos de la variedad Gordal. Estos resultados se explican en base a que la pulpa del zofairón posee un nivel muy alto de actividad POX significativamente superior al del fruto no partenocárpico que compensa la ausencia de semilla. Así mismo, se comprobó que el incremento de actividad POX mediante la adición de semilla a frutos partenocárpicos tenía el mismo efecto que el descrito anteriormente para las variedades Picual y Arbequina.

La POX oxida compuestos fenólicos a expensas de la reducción de H_2O_2 , co-sustrato de la reacción. Los experimentos realizados *in vitro* han demostrado que el peróxido de hidrógeno no posee la capacidad por sí mismo de oxidar a los compuestos fenólicos. Con el fin de analizar la posible limitación de este co-sustrato se realizaron diferentes adiciones de distintas dosis de H_2O_2 en la etapa de molienda en el proceso de obtención del AOV. Los resultados obtenidos indican una relación clara dosis/efecto en el rango de 100-500 $\mu L H_2O_2/ Kg$ de aceituna que parece sugerir que la actividad POX de aceituna está íntimamente ligada a la disponibilidad de peróxidos en las pastas de aceituna y que la concentración de peróxido durante la molienda de la aceituna es un factor limitante en la oxidación de compuestos fenólicos por esta vía. Sin embargo, no puede descartarse que a

lo largo del proceso de obtención del AOV se pueda generar más H_2O_2 por acción de la actividad tirosinasa de la PPO, como indican Jiang y Miles (1993) y Richard-Forget y Gaillard (1997), entre otras posibilidades. La adición de la dosis más alta de las empleadas de ($500\mu/ Kg$ de aceituna) ensayada sobre aceitunas de la variedad Picual en estadio IM = 1 provocó un descenso del 36% del contenido total de polifenoles en el AOV, mientras que sobre aceitunas de la variedad Picual con IM = 5, el descenso cuantificado fue del 50%. El mayor incremento de degradación oxidativa en las aceitunas maduras se justifica en base a la mayor carga enzimática de POX, que como ya se ha comentado anteriormente, aumenta a lo largo de la maduración. Paralelamente al análisis de los compuestos fenólicos extraídos de los aceites obtenidos en el ensayo de adición de H_2O_2 , se analizaron perfiles de los glucósidos fenólicos remanentes en las pastas a lo largo del batido y se observó un descenso algo mayor del 10% de estos glucósidos.

En este bloque de estudios centrados en modular los niveles de actividad POX se realizaron distintos experimentos en los que se reducía la carga de actividad POX, utilizando un inhibidor específico de esta actividad, la azida sódica, durante el proceso de obtención del AOV. La dosis más elevada de las ensayadas, adicionada sobre aceitunas de la variedad Picual, IM = 1 y 5, dio lugar a un aumento del contenido total de polifenoles del aceite del 34 y 23% respectivamente. Estos resultados son compatibles con el incremento de actividad POX observado a lo largo de la maduración del fruto. Así, el efecto del inhibidor fue menos acusado sobre el lote de frutos de la variedad Picual que poseía mayor carga enzimática POX. Todos los ensayos realizados contribuyen a reforzar el papel clave de la enzima POX como factor bioquímico determinante en el contenido de polifenoles del AOV, muy especialmente en relación con los secoiridoideos derivados de la oleuropeína (FDAO, FAAO y sus isómeros) que son a su vez los que tienen un mayor interés por sus propiedades nutricionales y organolépticas. Esta contrastada capacidad de la actividad POX de semilla de aceituna para oxidar compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV podría además tener interesantes aplicaciones biotecnológicas que se beneficiarían de un conocimiento más preciso de las proteínas con actividad POX en aceituna.

Existen numerosos estudios de purificación y caracterización de POX en diversos organismos. La POX de aceituna ha sido caracterizada en pulpa de aceituna por Saraiva et al. (2007) en la variedad Douro y caracterizada parcialmente por Tzika et al. (2009) en Koroneiki. En el primero de los dos trabajos mencionados no se hace alusión alguna a la capacidad de oxidación de compuestos fenólicos naturales del olivo de ninguna de las ocho isoformas purificadas de la POX de pulpa de aceituna y en el segundo, se concluye que la POX de pulpa de aceituna no es activa frente a la oleuropeína, resultado contrario al encontrado en este trabajo. Con el fin de estudiar con mayor profundidad la contribución de esta actividad enzimática en la síntesis del perfil fenólico se procedió a purificar las proteínas con actividad POX localizadas en la semilla de aceituna. Para ello, se escogió como material de partida el polvo acetónico de semilla, ya que resultó ser un material más homogéneo y estable en el tiempo. Eligiéndose la variedad Arbequina, por ser una de las más representativas de nuestro país y la de mayor distribución internacional, en su estadio óptimo de maduración IM = 3.

El pH seleccionado para la extracción de proteínas con actividad POX, como ya se indicó al hablar de los resultados obtenidos para EC de POX, fue 6,7 que coincide con el empleado para extraer esta actividad en pulpa de aceituna (Saraiva et al., 2007; Tzika et al., 2009), y en en otros frutos (Rodríguez-López et al., 2000; Pomar et al., 1997; Serrano-Martínez et al., 2008; Núñez-Delicado et al., 2008; Mohamed et al., 2011; Thongsook et al., 2005; Duarte-Vázquez et al., 2007; Da Silva et al., 1990; Khan et al., 1993; Civello et al., 1995; Motamed et al., 2009) Una vez obtenido el extracto crudo a partir del polvo acetónico las siguientes etapas de la purificación consistieron en la precipitación fraccionada con sulfato amónico y cromatografías de intercambio aniónico y catiónico. La precipitación con sulfato amónico 30-80% permitió concentrar la actividad POX y retirar aproximadamente un 93% de las proteínas originales del extracto. El factor de purificación de este primer paso resultó ser un valor en torno a 13, muy similar al conseguido en el fraccionamiento de la POX de pulpa de aceituna (Tzika et al., 2009). En el caso de la purificación de la POX en la raíz de rábano (Mohamed et al., 2011), en semilla de soja (Schmitz et al., 1995) y en pulpa de fresa (Civello et al., 1995) el precipitado con sulfato amónico se utilizó como un paso de concentración de proteínas y no de fraccionamiento. Como ya se comentó en el apartado correspondiente de resultados, este

valor tan elevado podría deberse a que en el EC existan posibles inhibidores que no permitan cuantificar realmente la actividad y que están ausentes en el precipitado proteico del 30-80%. La cromatografía de intercambio aniónico dio como resultado la elución de un pico de proteínas no retenido en la columna que mostró alrededor del 75% de la actividad POX y dos picos bien definidos de proteínas retenidas: el primero de ellos conteniendo aproximadamente el 90% del total de las proteínas introducidas en la columna y un segundo pico más pequeño y más fuertemente retenido que eluye aproximadamente con 0.9 M de NaCl. Entre todos estos picos de proteína solo un pequeño hombro del primer pico de proteína retenido presentó actividad POX. Esta fracción de proteína, que representó en torno al 3% de la actividad POX del extracto crudo original se denominó isoforma POXan. La fracción no retenida en esta columna de intercambio aniónico debería tener naturaleza catiónica o neutra; por tanto, el siguiente paso consistió en una cromatografía de intercambio catiónico. En esta segunda cromatografía se observaron dos picos de proteínas: uno no retenido con un 45% de actividad respecto de la que se introdujo en la columna y otro retenido con una elevadísima actividad específica, que se denominó isoforma POXcat, que resultó ser en torno al 8% de la actividad del extracto crudo original. La actividad recuperada en cada una de las isoformas difirió de un estadio de maduración a otro, de manera que, a las 42 SDF la POXan representaba alrededor del 0,5% de la actividad, mientras que la POXcat supuso un 15%. Los resultados descritos en la tabla de purificación se refieren a las isoformas purificadas en polvos acetónicos de semillas correspondientes a la 38 SDF. La pureza de las dos isoformas se evaluó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes que mostró las bandas de proteína correspondientes a las formas monoméricas de cada una de las isoformas a homogeneidad electroforética y que permitió calcular las masas moleculares de éstas. Para la forma monomérica de la POXan se estimó una masa molecular de 18 kDa mientras que para el monómero de la POXcat se obtuvo una masa molecular de 44 kDa. La masa molecular de las enzimas POX purificadas en productos hortofrutícolas está comprendida en un amplio intervalo, 18-65 kDa, aunque la mayoría de ellas tiene un valor próximo a 45 kDa. Ningún peso molecular de los recogidos en la bibliografía fue tan bajo como el de la POXan, aunque se aproxima a los valores de las 4 isoformas aniónicas

purificadas en la pulpa de aceituna (Saraiva et al., 2007), entre 18-20 kDa. Los valores de las 4 isoformas de POX de naturaleza catiónica purificadas en pulpa de aceituna por Saraiva et al., (2007) oscilaban entre 60-67 kDa y la POX purificada en pulpa de aceituna por Tzika et al. (2009) mostró una masa molecular de 44 kDa. El valor de la masa molecular de la POXcat fue más parecido al de otras POX purificadas como la de la raíz de rábano (Lavery et al., 2010) que fue de 40 kDa; la de las isoformas neutra y catiónica de brócoli, 43 kDa (Thongsook et al., 2005); la isoforma aniónica de la POX de piel de patata dulce, 37 kDa (León et al., 2002); la de semilla de soja, 42 y 43 kDa (Schmitz et al., 1996; Gijzen et al., 1993); y la de pulpa de papaya, 41 kDa (Da Silva et al., 1990). Aunque, no ha sido posible establecer por el momento la estructura de la forma activa de la proteína, los resultados obtenidos mediante filtración diferencial apuntan a que la forma activa de POXan sería un tetrámero mientras que la forma activa de POXcat sería un monómero.. La forma activa algunas POX descritas en la bibliografía resultó ser la tetramérica, como es el caso de la vainilla (Márquez et al., 2008) cuya forma monomérica posee una masa molecular de 46,5 kDa y que por cromatografía de exclusión molecular mostró una forma activa con una masa molecular de 186 kDa; y de la enzima purificada de tallo de brócoli (Duarte-Vázquez et al., 2007), cuya forma activa mostró una masa molecular de 200 kDa, mientras que para la forma monomérica observada tras la electroforesis se calculó una masa molecular de 49 kDa.

Una vez comprobado que las dos fracciones se encontraban purificadas a homogeneidad electroforética, se procedió a la caracterización de ambas. En primer lugar se estudió la especificidad y la selectividad de las dos isoformas sobre los compuestos fenólicos mayoritarios de la aceituna. Cuando se ensayaron de manera individual los distintos compuestos fenólicos como sustratos, se encontró que el verbascósido fue el sustrato de mayor afinidad para POXan mientras que para la POXcat fue la demetiloleuropeína, que sin embargo fue un sustrato muy poco afín para POXan. Ambas isoformas mostraron un alto nivel de actividad frente a la oleuropeína y el hidroxitirosol y en menor medida frente al tirosol (único monofenol del conjunto de sustratos ensayados). Una vez comprobada la capacidad de ambas para oxidar algunos de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna, se realizaron los ensayos de competencia con mezclas complejas de todos los compuestos

fenólicos presentes en la aceituna. Los resultados obtenidos mostraron que el acetato de hidroxitirosol es el sustrato por el que ambas isoformas muestran mayor selectividad y, en ausencia de éste, el verbascósido. Ambas isoformas muestran una afinidad similar por oleuropeína y demetiloleuropeína, y ninguna de las dos muestra actividad frente al tirosol, al ligustrósido y al nucénido, incluso utilizando concentraciones equimolares a la oleuropeína y la demetiloleuropeína. De igual manera se comprueba que la actividad relativa de las dos isoformas se ve modificada en función de los compuestos fenólicos presentes en el medio de reacción y de las concentraciones de cada uno de ellos. Por otra parte se ha encontrado que tanto POXan como POXcat oxidan más rápidamente a los isómeros FAO y la FDAO que a la oleuropeína de la que ambos derivan. Los parámetros cinéticos correspondientes a cada una de las isoformas de POX de aceituna purificadas se calcularon utilizando oleuropeína, por ser el fenol mayoritario en la aceituna, y con el sustrato colorimétrico guayacol. También se calcularon estos parámetros cinéticos para el so-sustrato de la reacción, el peróxido de hidrógeno. Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y k_m con obtenidos para las isoformas POXan y POXcat con la oleuropeína 667 U/mg y 5000 U/mg, y $8,53 \text{ mM}^{-1}$ y $4,50 \text{ mM}^{-1}$ respectivamente no pueden ser comparados con el de enzimas similares por no existir en la bibliografía estudios cinéticos con este sustrato. Los valores de k_m para el guayacol fueron inferiores a los obtenidos para la oleuropeína. Los valores de k_m para el sustrato guayacol fueron similares, $2,35 \text{ mM}^{-1}$ para POXan y $1,00 \text{ mM}^{-1}$, para POXcat, aunque, de nuevo, la isoforma catiónica resultó ser más afín que la aniónica como ocurría con la oleuropeína. Estos valores fueron similares a los obtenidos para la enzima de vainilla (Márquez et al., 2008) que fue $3,8 \text{ mM}^{-1}$, superiores a los calculados para las isoformas aniónica y neutra de la enzima purificada de brócoli que fueron $0,3 \text{ mM}^{-1}$ y $0,7 \text{ mM}^{-1}$, respectivamente, y más bajos que para la isoforma catiónica de brócoli que fue $8,8 \text{ mM}^{-1}$ (Thongsook et al., 2005) y que el mostrado para la POX comercial de rábano, $16,4 \text{ mM}^{-1}$. El valor calculado de k_m para el cosustrato H_2O_2 resultó ser próximo a 1 mM^{-1} para las dos isoformas tanto con guayacol como con oleuropeína, que coincide con el valor calculado para la POX de pimiento rojo (Serrano-Martínez et al., 2008). Salvo en el caso de la isoforma catiónica del brócoli (Thongsook et al., 2005) que fue $9,7 \text{ mM}^{-1}$ y de rábano

(Mohamed et al., 2011) que fue $3,3 \text{ mM}^{-1}$, el resto de valores de km publicados para POX de distintas especies vegetales fueron inferiores a $0,5 \text{ mM}^{-1}$.

El efecto del pH sobre la actividad de ambas isoformas con oleuropeína y guayacol fue similar. El pH óptimo de actividad para ambas isoformas fue 6,5 al emplear guayacol como sustrato, valor muy próximo al óptimo descrito para otras POX purificadas en vegetales en el rango de pH 6-7 (Lavery et al., 2010; Schmitz et al., 1996; Civello et al., 1995; Thongsook et al., 2005). La POX purificada de pulpa de aceituna (Saraiva et al., 2007) fue ensayada con fenol y también mostró la máxima actividad a pH 7 mientras que la otra proteína con actividad POX purificada de pulpa de aceituna (Tzika et al., 2009) se ensayó con ABTS como sustrato obteniéndose como pH óptimo 4, el cual coincide con el obtenido para POXan y POXcat con este mismo sustrato y es también similar al encontrado para ese sustrato en estudios de otras POX vegetales (León et al., 2002; Serrano-Martínez et al., 2008; Núñez-Delicado et al., 2008; Rodríguez-López et al., 2000; Caramysev et al., 2006; Al-Senaïdy, et al., 2008; Mohamed et al., 2011) En ningún caso de los estudiados el pH óptimo de las enzimas POX fue superior a 7 e inferior a 4, salvo para la POX purificada de vainilla que fue 3,8 (Márquez et al., 2008). Con la oleuropeína, el único sustrato natural del olivo empleado en estudios cinéticos, el pH óptimo se desplazó hacia valores más ácidos para ambas isoformas lo que apoya la actuación de dichas isoformas en las pastas de aceituna que tiene poseen un pH en torno a 4.6.

Se estudió el efecto de la fuerza iónica del tampón del medio de reacción empleando como sustratos guayacol y ABTS. Se observó en ambas isoformas y con los dos sustratos mencionados mayor actividad enzimática en aquellos medios de reacción con menor fuerza, obteniéndose máxima actividad con fosfato sódico 25 mM, que fue el tampón empleado para las reacciones con los compuestos fenólicos.

En relación a la influencia de la temperatura se realizaron dos tipos de ensayos: la determinación de la temperatura óptima de actuación de ambas isoformas de POX de semilla de aceituna y su estabilidad térmica. La temperatura óptima para las dos isoformas fue de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque con muy pocas variaciones en el rango de 10 a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Éste es un dato especialmente llamativo ya que el resto de las enzimas POX presentan una temperatura óptima de actuación más elevada, en torno a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en la mayoría de los casos como ocurre con

la POX de pulpa de aceituna (Saraiva et al., 2007; Tzika et al., 2009), el rábano (Lavery et al., 2010), la fresa (Civello et al., 1995), e incluso a mayores temperaturas en rábano (Mohamed et al., 2011) y hoja de la palmera (Al-Senaidy et al., 2008). La temperatura óptima de la POX purificada de vainilla (Márquez et al., 2008) fue la más parecida a la obtenida para POXan y POXcat, 16 °C. En relación a la temperatura, el ensayo más interesante fue el de la estabilidad térmica ya que podría tener importantes consecuencias sobre el proceso de industrial de obtención del AOV. En los ensayos realizados en el intervalo 30-75°C ambas isoformas demostraron ser muy resistentes a la inactivación térmica. El comportamiento de ambas isoformas es prácticamente idéntico hasta los 60 °C, siendo a partir de esta temperatura cuando las diferencias entre ambas se acentúan y resultando más estable en el tiempo la isoforma catiónica que después de 5 min a 75 °C aún conserva un 65% de actividad. La termo estabilidad es una característica común a la mayoría de las POX (Tzika et al., 2009; Motamed et al., 2009) utilizándose de hecho la actividad POX como un indicador de la inactivación enzimática durante el procesado de numerosos vegetales (Goncalves et al., 2009). Esta marcada influencia de la temperatura sobre la actividad POX de aceituna se puso de manifiesto en una serie de experimentos de extracción de AOV a distintas temperaturas. Dentro de ese bloque de ensayos se realizaron extracciones de aceite a dos temperaturas distintas 15 y 45 °C. En los ensayos realizados a 15 °C, temperatura próxima a la óptima de actuación de la POX, se comprobó que el contenido de polifenoles totales del aceite obtenido tras tiempos de batido de 15 minutos era muy inferior (53%) al encontrado en los aceites cuyas pastas se habían batido a 45 °C. El mayor contenido de fenoles en las pastas batidas a 45 °C podría asociarse a una mayor actividad de la enzima β -GLU a esa temperatura muy próxima a su temperatura óptima de actuación (Romero-Segura et al., 2009), pero como se ha indicado en esta memoria la actividad β -GLU está completamente inactivada durante el batido. La modificación del contenido fenólico del AOV a esta temperatura también podría atribuirse a la alteración del coeficiente de reparto de los compuestos fenólicos entre el aceite y la fase acuosa (Rodis et al., 2002). Sin embargo, ambas hipótesis son descartadas al comprobar que a tiempos prolongados de batido (100 min) a esas mismas temperaturas el descenso de fenoles a 15 °C llega hasta el 76% y es del 36% a 45 °C. Los resultados obtenidos

podrían tener una inmediata aplicación a nivel industrial ya que cuando fueran necesarios tiempos prolongados de batido para mejorar el rendimiento (Cruz et al., 2007) un adecuado control de la temperatura permitiría minimizar la pérdida de compuestos fenólicos. Estos datos de la influencia de la temperatura de batido en la actividad POX están en consonancia con los resultados obtenidos por Taticchi et al. (2013). En este mismo bloque de estudios relacionados con el efecto de la temperatura podría inscribirse el estudio de conservación de aceitunas de la variedad Arbequina a 4 y 25 °C. Los resultados de dicho estudio mostraron la capacidad de modular las principales actividades enzimáticas vinculadas al metabolismo de compuestos fenólicos mediante la conservación a distintas temperaturas. De las actividades enzimáticas estudiadas la POX fue la que experimentó menores variaciones durante un mes de conservación a 4 y 25 °C, manteniendo niveles prácticamente idénticos a los de frutos de aceituna que maduraron en el árbol y corroborando que en ese intervalo de temperatura su actividad sufre pocas variaciones

El efecto que ejercen los iones metálicos sobre las POX descritas en la bibliografía es muy diverso, aunque prácticamente en todos los casos hay coincidencias en el gran efecto inhibitorio Hg^{2+} y Ag^{2+} sobre la actividad POX (Márquez et al., 2008; Lai et al., 2006). En el caso de las isoformas POXan y POXcat sólo el mercurio produjo una inhibición total de la actividad, encontrándose por el contrario muchos iones metálicos que provocaron cierto aumento de la actividad enzimática. En cuanto a los otros inhibidores no metálicos ensayados *in vitro*, únicamente la azida sódica resultó ser inhibir de manera específica la actividad POX, mientras que otros compuestos como el ácido cítrico, el metabisulfito sódico y el ácido ascórbico, que tienen cierto efecto inhibitorio sobre la actividad POX *in vitro*, deben considerarse como inhibidores inespecíficos de ambas óxido-reductasas. Precisamente el carácter inespecífico de estos compuestos antioxidantes hace extraordinariamente compleja la tarea de interpretar los resultados obtenidos cuando fueron utilizados como aditivos en distintos experimentos de extracción de AOV.

La capacidad de las actividades POX y PPO de aceituna para oxidar a los compuestos fenólicos presentes en la aceituna y el AOV apoyan la idea de que ambas las enzimas

intervienen en la degradación oxidativa de dichos compuestos fenólicos durante el proceso de obtención del AOV. Sin embargo, con los datos de los que disponemos en la actualidad no es posible cuantificar la contribución relativa de cada una de ellas, más aún cuando es previsible que ambas actúen de manera sinérgica (Cantos *et al.*, 2002) y paralela a otros procesos de oxidación química. Los estudios de oxidación *in vitro* y los realizados durante el proceso de obtención del aceite han demostrado que tanto POX como PPO son capaces de oxidar los principales glucósidos fenólicos presentes en el fruto y los compuestos secoiridoideos característicos del AOV, especialmente aquéllos derivados del hidroxitirosol como FDAO y FAAO. Debido a que los compuestos derivados del hidroxitirosol poseen un elevado carácter antioxidante e importantes propiedades sensoriales, más que los derivados del tirosol, la modulación de las POX y PPO de aceituna podrían tener un gran efecto sobre la calidad nutricional y organoléptica del aceite de oliva virgen.

De los estudios realizados parece concluirse que aunque la PPO de aceituna pueda jugar un papel clave en la oxidación de fenoles durante la molturación de los frutos, sufre una rápida desactivación en la etapa de batido de la pasta de aceituna. Por el contrario, la POX de aceituna, activa también durante la etapa de molienda, se mantiene activa durante todo el proceso de obtención del aceite, incluso a tiempos de batido prolongados. En este sentido, la elevada actividad POX remanente en las pastas durante todo el proceso industrial, la localización de esta actividad en la semilla y el marcado efecto de la temperatura sobre la actividad POX en aceituna sugieren que el control de esta actividad enzimática durante el proceso de obtención del aceite podría tener interesantes aplicaciones tecnológicas.

1. Se han determinado las actividades enzimáticas de POX y PPO de aceituna de las variedades Arbequina y Picual en distintos tejidos del fruto y se ha concluido que prácticamente la totalidad de la POX se localiza en semilla mientras que la PPO se localiza en pulpa.

2. El seguimiento de ambas actividades a lo largo de la maduración del fruto (26-42 SDF) muestra que la POX tiende a incrementar su valor entre los meses de septiembre a enero encontrándose el máximo de actividad entre las 38-42 SDF; por el contrario, la PPO disminuye siendo más brusco el descenso en Picual que en Arbequina y, por tanto, el máximo de actividad cuantificado se corresponde con las aceitunas más verdes, recolectadas alrededor de las 26 SDF.

3. La PPO de aceituna es capaz de oxidar *in vitro* tanto los compuestos fenólicos de la aceituna como los derivados secoiridoideos del AOV, exhibiendo preferentemente la actividad difenolasa frente a la monofenolasa.

4. Las extracciones de aceite en las que se adicionaron polvos acetónicos de pulpa de aceituna como fuente de PPO y de tropolona como inhibidor de dicha enzima, corroboraron la capacidad de PPO para catalizar la oxidación de los glucósidos fenólicos de la aceituna y de sus productos de hidrólisis.

5. Se han purificado a homogeneidad electroforética dos isoformas de POX a partir de semilla de aceituna de la variedad Arbequina, una de naturaleza aniónica y otra catiónica, POXan y POXcat, que resultaron ser activas frente a los compuestos fenólicos presentes en el fruto y en el AOV, oxidando más efectivamente a los *o*-difenoles que a los monofenoles.

6. La POXan cuya forma activa parece ser un trímero constituido por monómeros de 18 kDa presenta un pH óptimo de 6,5 frente al sustrato colorimétrico guayacol, una temperatura óptima de 10 °C y muestra una mayor especificidad por el verbascósido que por el resto de los

compuestos fenólicos del olivo ensayados *in vitro*. La forma activa de la POXcat es un monómero de 44 kDa, presenta los mismos valores de pH y temperatura óptimos que la isoforma aniónica y muestra una mayor especificidad por la demetiloleuropeína. En mezclas complejas de compuestos fenólicos de fruto ambas presentaron mayor selectividad por el acetato de hidroxitirosol y el verbascósido. En incubaciones con compuestos fenólicos del AOV, por FDAO e isómeros FAO.

7. Las extracciones de aceite en las que se adicionaron POX comercial de rábano, semillas de aceituna y polvos acetónicos de semilla como fuente de POX, H₂O₂ y azida sódica como inhibidor específico de la POX, confirmaron la capacidad de dicha enzima para modificar el perfil fenólico del AOV.

8. Los estudios realizados durante el proceso de obtención del aceite apuntan a que la actividad PPO actúa fundamentalmente en la etapa de molienda del fruto, cuando se ponen en contacto enzimas y sustratos, y se inactiva durante la etapa de batido de las pastas de aceituna. Por el contrario la POX actúa durante la molienda pero mantiene una importante actividad remanente durante todo el proceso batido.

9. La existencia de importantes niveles de actividad POX remanente en las pastas de aceituna, su localización en la semilla y el marcado efecto de la temperatura sobre ésta actividad enzimática sugieren que el control de la actividad POX durante el proceso de obtención del aceite podría tener interesantes aplicaciones tecnológicas.

- Alba, J. (1997). El cultivo del olivo. Ed. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. Ediciones Mundi Prensa pp. 509-537. Madrid, España.
- Al-Senaidy, A. M.; Ismael, M. a. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 293–298.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A; Macheix, J.J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34: 823-826.
- Amirante, P; Clodoveo, M.L.; Dugo, G; Leone, A; Tamborrino, A (2006). Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: Influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality. *Food Chem.* 98: 797-805.
- Angerosa, F.; Basti, C.; Vito, R.; Lanza, B. (1999). Efect of fruit stone removal on the production of virgin olive oil volatile compounds. *Food Chemistry.* 67: 295–299.
- Angerosa, F.; Mostallino, R.; Basti, C., Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils, 72: 19–28.
- Antolovich M.; Bedgood D.; Bishop A.; (2004). LC-MS Investigación of oxidation products of phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 962-971.
- Artajo, L.S.; Romero, M.P.; Tóvar, M.J.; Motilva, M.J. (2006). Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 19-27.
- Ben-Shalom N.; Kahn V.; Harel E.; Mayer A. (1977). Cathecol oxides from green olives: properties ando partial purification. *Food Chemistry* 16: 115.

- Boskou, D (2002). Olive oil. En: *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses* (ed. Gunstone, F), pp. 244-277.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anl. Biochem.* 72: 248-254.
- Brenes, M; Hidalgo, F.J.; García, A; Ríos, J.J.; García, P; Zamora, R; Garrido, A (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 715-720.
- Cantos, E.; Tudela J.A.; Gil M.I.; Espín, J.C. (2002). Phenolic compounds and related enzymes are no rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3015-3023.
- Caramyshev, A. V.; Firsova, Y. N.; Slastyá, E. A.; Tagaev, A. A.; Potapenko, N. V.; Lobakova, E. S.; Pletjushkina O. Y.; Sakharov, I. Y. (2006). Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 9888–94.
- Civello, P. M.; Martinez, G. A.; Chaves, A. R.; Anon, 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.
- Conde, C.; Delrot, S.; Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of plant physiology*, 165: 1545–62.
- Cruz, S.; Yousfi, K.; Oliva, J.; García, J. M. (2007). Heat Treatment Improves Olive Oil Extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84: 1063–1068.

- Damtof, S.; Franzyk, H.; Jensen, S. R. (1993). Biosynthesis of secoiridoids glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, 34:1291-1299.
- Deepa, S. S.; Arumughan, C. (2002). Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq .) leaf. *Phytochemistry*, 61: 503–511.
- Del Río, J. A.; Baidez, A.G.; Botía, J. M. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry* 83: 75-78.
- Di Giovacchino, L; Solinas, M; Miccoli, M (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 1189-1194.
- Duarte-Vázquez, M. A.; García-Padilla, S.; García-Almendárez, B. E.; Whitaker, J. R.; Regalado, C.(2007). Broccoli processing wastes as a source of peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55: 10396-10404.
- Espín, J. C.; Wichers, H. J. (1999a). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47: 3518–25.
- Espín, J. C., Wichers, H. J. (1999b). Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47: 3503–8.
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. A, Wichers, H. J. (2001). Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 1187–93.
- Fernández-Bolaños, J; Rodríguez, R; Guillén, R; Jiménez, A; Heredia, A (1995). Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum* 93: 651-658.

- Fortea, M. I.; López-Miranda, S.; Serrano-Martínez, A.; Carreño, J.; Núñez-Delicado, E. (2009). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry*, 113: 1008–1014.
- García, A.; Brenes, M.; Martínez, F.; Alba, J.; García, P.; Garrido, A. (2001). HPLC evaluation of phenols in virgen olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78: 625-629.
- García, A.; Brenes, M.; Romero, C.; García, P.; Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the Picual variety. *European Food Research and Technology*, 215: 407–412.
- García, A.; Romero, C.; Medina, E.; García, P.; de Castro, A.; Brenes, M. (2008). Debittering of olives by polyphenol oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56: 11862–7.
- García, J.M.; Yousfi, K.; Mateos, R.; Olmo, M.; Cert, A (2001b). Reduction of bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4231-4235.
- García-Molina F.; Muñoz J.L.; Varón R., Rodríguez-López J.N.; García-Cánovas F. (2007). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9739-9749.
- García-Muriana, F.J.; López, A; Garrido, A (Ed.) (2004). Human Nutritional Properties of Olive Oil. *Grasas y Aceites*, Special Issue.
- Gijzen, M.; van Huystee; R., Buzzel, R. I. (1993). Soybean seed coat peroxidase. *Plant Physiology*, 103: 1061-1066.
- Gilabert, M. A.; Hiner, A. N. P.; García-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; García-Molina, F.; Acosta, M.;

- García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J. N. (2004). Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 169: 235–243.
- Gómez-Rico, A; Salvador, M.D.; La Greca, M; 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. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7130-7136.
- Gómez-Rico, A.; Fregapane, G.; 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.
- Gómez-Rico, A; Inarejos-García, A.M.; Salvador, M.D.; Fregapane, G (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *J. Agric. Food Chem.* 57: 3587-3595.
- Goupy P.; Fleuriet A.; Amiot M-J.; Macheix J-J. (1991). Enzymatic browning, oleuropein content, and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 92-95.
- Gutfinger, T (1981). Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 966-968.
- Hamid, M.; Khalil-ur-Rehman (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115: 1177–1186.
- Jiang, Y.; Miles, P. W. (1993). Generation of H₂O₂ during enzymatic oxidation of catechin. *Phytochemistry*, 33: 39-34.

- Khan, A. A.; Robinson, D. S. (1993). Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango (*Mangifera indica* L. var. *chaunsa*). *Food Chemistry*, 46: 61–64.
- Keys, A; Keys, M (1975). *How to eat well and stay well, the Mediterranean Way*. Doubleday and Co., Garden City, U.K.
- Lavery, C. B.; Macinnis, M. C.; Macdonald, M. J.; Williams, J. B., Spencer, C. A.; Burke, A. A.; Irwin, D. J. G.; D’Cunha, G. B. (2010). Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 8471–6.
- Leon, J. C.; Alpeeva, I. S.; Chubar, T. A.; Galaev, I. Y.; Csoregi, E.; Sakharov, I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163: 1011-1019
- Luaces, P.; Romero, C.; Gutiérrez, F. (2007). Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *Journal of Science of Food and Agriculture* 87: 2721-2727.
- Márquez, O.; Waliszewski K.N.; Oliart R.M.; Pardo V.T. (2008). Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. *LWT-Food Science and Technology* 41: 1372-1379.
- Martínez, J.M.; Muñoz, E.; Alba, J.; Lanzón, A. (1975). Report about the use of the Abencor Analyser. *Grasas y Aceites* 26: 379-385.
- Mateos, R.; Domínguez, M.M.; Espartero, J.L.; Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7170-7175.
- Mateos, R; Cert, A; Pérez-Camino, M.C.; García, J.M. (2004). Evaluation of Virgin Olive Oil

- Bitterness by Quantification of Secoiridoid Derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 71-75.
- Migliorini, M.; Mugelli, M.; Cherubini, C.; Viti, P.; Zanoni, B. (2006). Influence of O₂ on the quality of virgin olive oil during malaxation. *J. Sci. Food Agric* 86: 2140-2146.
- Mohamed, S. A.; Abulnaja, K. O., Ads, A. S.; Khan, J. A.; Kumosani, T. A. (2011). Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. *Food Chemistry*, 128: 725-730.
- Montedoro, G (1972). Phenolic substances present in virgin olive oil. Note I. Identification of phenolic acids and their antioxidant power. *Sci. Technol. Aliment.* 177-186.
- Montedoro, G; Garofolo, L (1984). The qualitative characteristics of virgin olive oils. The influence of variables such as variety, environment, preservation, extraction, conditioning of the finished product. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 61: 157-168.
- Montedoro, G; Servili, M; Baldioli, M; Selvaggini, R; Miniati, E; Macchioni, A (1993). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234.
- Montedoro, G.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Begliomini, A.L.; Taticchi, A. (2002). Relationships between Phenolic Composition of Olive Fruit and Olive Oil: the Importance of the Endogenous Enzymes. *Acta Hort.* 586: 551-556.
- Morales, M.T.; Tsimidou, M (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. En: *Handbook on Olive Oil: Analysis and Properties* (eds. Harwood, J; Aparicio, R), pp. 393-458.
- Morelló, J.R.; Romero, M.P.; 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. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6002-6009.
- Motamed, S.; Ghaemmaghami, F. (2009). Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase : Purification and Characterization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 10614–10618.
- Obied, H. K.; Prenzler P. D.; Ryan D.; Servili M.; Taticchi A.; Esposito S.; Robards K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europea* L. *Natural Product Reports* 25: 1167-1179.
- Ortega-Garcia, F.; Blanco, S.; Peinado, M.A. (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.
- Passardi, F.; Cosio, C., Penel, C.; Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*, 24: 255–65.
- Passardi, F.; Theiler, G.; Zamocky, M.; Cosio, C.; Rouhier, N.; Teixeira, F.; Margis-Pinheiro, M.; Ioannidis, V.; Penel, C.; Falquet L.; Dunand, C. (2007). PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605–11.
- Pomar, F.; Bernal, M. A.; Díaz, J.; Merino, F. (1997) Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 8: 1313-1317.
- Pourcel, L.; Routaboul, J.M.; Cheynier, V.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12: 29–36.
- Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401-436.
- Roca M.; Gandul-Rojas B.; Mínguez-Mosquera M.I. (2007). Varietal differences in catabolic

- intermediates of chlorophylls in *Olea europea* (L.) fruit cvs. Arbequina and Blanqueta. *Postharvest Biology and Technology* 44: 150-156.
- Rodríguez-López, J. N.; Espín, J. C.; Amor, F.; Cerda, A.; Garcá, F. (2000). Purification and Kinetic Characterization of an Anionic Peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivated under Different Salinity Conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48:, 1537–1541.
- Romero-Segura, C.; Sanz, C.; Perez, 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
- Ryan, D.; Antolovich, M; Prenzler, P; Robards, K; Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* 92: 147-176.
- Sánchez-Ortiz, A.; Romero-Segura, C.; Sanz, C., Pérez, A. G. (2012). Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipoxygenase activity load during the oil extraction process. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60: 812–22.
- Saraiva J.A.; Nunes C.S. Coimbra M.A. (2007). Purification and characterization of olive (*Olea europea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry* 101: 1594-1602.
- Segovia-Bravo, K.A.; Jarén-Galán, M.; García-García P; Garrido-Fernández, A. (2009). Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved. *Food Chemistry* 114: 1380-1385.
- Serrano-Martínez, A.; Fortea, M. I.; del Amor, F. M.; Núñez-Delicado, E. (2008). Kinetic characterisation and termal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107: 193-199.

- Servili, M.; Baldioli, M.; Mariotti, F.; Montedoro, G. (1999). Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during the oil mechanical extraction process. *Acta Hort.* 474: 609-613.
- Servili, M.; Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 602-613.
- Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Montedoro, G. (2003). Volatile Compounds and Phenolic Composition of Virgin Olive Oil: Optimization of Temperature and Time of Exposure of Olive Pastes to Air Contact during the Mechanical Extraction Process. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7980-7988.
- Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposito, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A* 1054: 113-127.
- Servili, M.; Esposito, S.; Lodolini, E.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Montedoro, G.; Serravalle, M; Gucci, R (2007). Irrigation effects on quality, phenolic composition and selected volatiles of virgin olive oils Cv. Leccino. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6609-6618.
- Servili, M.; Taticchi, A.; Esposito, S.; Urbani, S.; Selvaggini, R.; 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. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10048-10055.
- Silva, E. D. A.; Lourenco, E. J.; Neves, V. A. (1990). Soluble and bound peroxidases from papaya fruit. *Phytochemistry.* 29: 1051-1056.

- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Bronze, M.; Coelho, A. V.; Boas, L. V. (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.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J.C.; Wichers, H. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1013-1023.
- Takahama, U.; Oniki, T. (2000). Flavonoids and Some Other Phenolics as Substrates of Peroxidase: Physiological Significance of the Redox Reactions. *Journal of Plant Research*, 113: 301–309.
- Taticchi, A.; Esposto, S.; Veneziani, G.; Urbani, S.; Selvaggini, R.; 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: 975–83.
- Thogsook, T.; Barrett, D. M. (2005). Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 3206-3214.
- Toscano G.; Colarieti M.L.; Greco, G. (2003). Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 47-54.
- Tovar, M.J.; Motilva, M.J.; Romero, M.P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5502-5508.
- Tovar, M.J.; Romero, M.P.; Girona, J; Motilva, M.J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) fruit grown under different irrigation regimes. *J. Sci. Food Agric.* 82: 892-898.

- Tzika E.D.; Papadimitriou V.; Sotiroudis T.G.; Xenakis A. (2008). Oxidation of oleuropein studied by EPR and spectrophotometry. *European Journal of Lipid Science Technology* 110: 149-157.
- Tzika E.D.; Sotiroudis T.G.; Papadimitriou V.; Xenakis A. (2009). Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europea* cv. Koroneiki). *European Food Research and Technology* 228: 487-495.
- Vanini, L. S.; Kwiatkowski, A.; Clemente, E. (2010). Polyphenoloxidase and peroxidase in avocado pulp (*Persea americana* Mill.), 30: 525–531.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65: 249–259.
- Vela, J. C. (1997). Purificación y caracterización cinética de polifenol oxidasa de tomate, 32–60.
- Vergara-Domínguez, H.; Roca, M.; Gandul-Rojas, B. (2013). Characterisation of chlorophyll oxidation mediated by peroxidative activity in olives (*Olea europaea* L.) cv. Hojiblanca. *Food chemistry*, 139(1-4), 786–95.
- Visioli, F.; Bogani, P.; Grande, S.; Galli, C. (2007). Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites*, 55: 66–75.
- Yousfi, K.; Cayuela, J. A.; García, J. M. (2008). Reduction of virgin olive oil bitterness by fruit cold storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56: 10085–91.
- Yousfi, K.; Cayuela, J. A.; García, J. M. (2009). Effect of Temperature, Modified Atmosphere and Ethylene During Olive Storage on Quality and Bitterness Level of the Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86: 291–296.

Yousfi, K.; Weiland, C. M.;García, J. M. (2012). Effect of harvesting system and fruit cold storage on virgin olive oil chemical composition and quality of superintensive cultivated "Arbequina" olives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 4743–50.