

R-11279  
T 911

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
ORGÁNICA Y FARMACEÚTICA

Trabajo de Licenciatura presentado por:

CONCEPCIÓN SALDAÑA ORTIZ-REPISO

Sevilla, Noviembre 1995



Codirectores:

Vº Bº

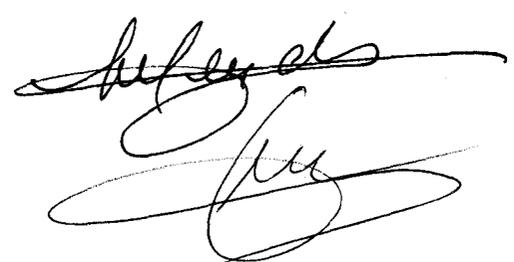
El Catedrático Ponente



Fdo.: Dr. Felipe Alcudia González  
Catedrático de Química Orgánica  
de la Facultad de Farmacia. Jefe  
del Departamento.

Vº Bº

Directores del Trabajo



Fdo.: Dra. Antonia Heredia Moreno  
Investigador Científico del C.S.I.C  
y, Dr. Juan Fernández-Bolaños Guzmán  
Colaborador Científico del C.S.I.C.

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA      FACULTAD DE FARMACIA**

**"MODIFICACIONES DE TEXTURA EN ACEITUNAS ALIÑADAS"**

**CONCEPCION SALDAÑA ORTIZ-REPISO**

**SEVILLA, 1995**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. D. Felipe Alcudia González, Catedrático Ponente de esta Tesis de Licenciatura.

A la Dra. Dña. Antonia Heredia Moreno, Investigador Científico del Instituto de la Grasa (CSIC), Directora de esta Tesis de Licenciatura, por su dirección y apoyo.

Al Dr. D. Juan Fernández-Bolaños Guzmán, Colaborador Científico del Instituto de la Grasa (CSIC), Codirector de este trabajo, por sus orientaciones e incansable apoyo, tanto en la realización del mismo como a nivel personal.

A Blanca, Coral, Rocío y Ana, por su ayuda y disposición en todo lo necesario para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. D. Rafael Guillén Bejarano, por el interés mostrado en el desarrollo del tema y por su colaboración en todo momento.

A Dña. Elena Cabello y a D. Sebastián Sánchez, por su colaboración en la realización del trabajo experimental.

Al Dr. D. Antonio Garrido Fernández, Jefe del Departamento de Biotecnología de Alimentos, por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo, así como al resto de los componentes de dicho Departamento de los que, de diversas formas, he recibido un gran apoyo.

A mi familia y amigos, por su apoyo y aliento, sobre todo en los momentos difíciles.

A una persona, que quizá sin saberlo, ha sido la base de este trabajo.

**ÍNDICE**

	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	
<b>1. PARED CELULAR</b>	<b>3</b>
<b>2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PARED</b>	<b>5</b>
2.1. CELULOSA	5
2.2. HEMICELULOSAS	7
2.3. POLISACÁRIDOS PÉCTICOS	10
2.4. PROTEÍNAS	11
2.4.1. Proteínas estructurales (HPRG)	11
2.4.2. Enzimas	13
2.5. LIGNINA Y COMPUESTOS FENÓLICOS	14
<b>3. TEXTURA DE FRUTOS Y VEGETALES PROCESADOS</b>	<b>14</b>
3.1. PÉRDIDA DE TEXTURA EN VEGETALES Y FRUTOS; FACTORES IMPLICADOS	15
3.2. CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y EFECTO EN EL ABLANDAMIENTO DE PRODUCTOS ADEREZADOS	20

	2
<b>4. ACEITUNAS "ALIÑADAS"</b>	<b>22</b>
4.1. DEFINICIONES	22
4.2. TIPOS DE ACEITUNAS EMPLEADAS	23
4.3. ESPECIAS Y OTROS CONDIMENTOS	23
4.4. ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE ESPECIAS Y CONDIMENTOS	24
4.5. CONTAMINACIONES MICROBIANAS QUE INTRODUCEN LAS ESPECIAS Y CONDIMENTOS. EFECTOS ENZIMÁTICOS ENDÓGENOS Y EXÓGENOS	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. MUESTRAS</b>	<b>28</b>
1.1. MUESTRAS EMPLEADAS	28
1.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	28
1.3. ELABORACIÓN DE ALIÑOS	28
<b>2. TEXTURA DEL FRUTO</b>	<b>29</b>
<b>3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl, pH, ACIDEZ LIBRE Y ACIDEZ COMBINADA</b>	<b>30</b>
3.1. DETERMINACIÓN DE pH, ACIDEZ LIBRE Y ACIDEZ COMBINADA	30

	3
3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CLORURO SÓDICO	31
<b>4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS</b>	<b>32</b>
<b>5. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS</b>	<b>33</b>
5.1. MEDIDA DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	33
5.2. MEDIDA DE ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA	35
5.3. MEDIDA DE ACTIVIDAD DE GLICOSIDASAS	36
<b>6. ANÁLISIS DE PARED CELULAR</b>	<b>38</b>
6.1. AISLAMIENTO DEL MATERIAL DE PARED (MP)	38
6.2. FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL DE PARED	40
<b>7. DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE AZÚCARES NEUTROS (ENSAYO DE LA ANTRONA) (Dische, 1962)</b>	<b>42</b>
<b>8. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS (ENSAYO DEL m- HIDROXIBIFENILO) (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973)</b>	<b>43</b>

## **INTRODUCCIÓN**

De una revisión de los conocimientos actuales sobre aceitunas aliñadas se obtiene la conclusión de que no existe un estudio básico de los mecanismos implicados en estas preparaciones comerciales.

Por el momento, los estudios que se conocen en torno a las mismas son debidos a los realizados en el Instituto de la Grasa (Grupo de Investigación del Dr. Borbolla y Alcalá continuado por el Dr. Rejano) y se pueden resumir en :

- Recopilación de diferentes fórmulas de aliño.
- Adición de este tipo de aliños a la tradicional aceituna de mesa estilo sevillano, con objeto de conseguir nuevos sabores.
- Experiencias de conservación por la adición de antisépticos y/o aditivos.
- Experiencias de conservación mediante pasterización.

La situación actual de mercado de aceitunas aliñadas continua siendo, en su mayor parte, artesanal. En su gran mayoría se expenden en el mercado a granel, cuyo control casi exclusivo responde al buen saber del artesano que las preparó. Una pequeña parte, que se comercializan envasadas, ha sido sometida a un proceso de pasteurización.

Dada la situación actual de la Tecnología de alimentos, no es admisible que pueda existir en el mercado un producto que se venda sin ningún tipo de control. Para poder ejercerlo se necesita, en primer lugar, tener conocimientos del mismo para posteriormente, poder llegar a establecer unas normas de calidad.

Este trabajo constituye un estudio previo de una serie de investigaciones incluidas dentro de un Proyecto de la CICYT (ALI94-0980-C02). Con él se ha pretendido iniciar un estudio de los cambios de textura que se originan en este tipo de preparaciones comerciales que permita abordar, en investigaciones posteriores, los mecanismos químicos, bioquímicos y microbiológicos que tienen implicaciones en las características organolépticas.

En este trabajo que se presenta como Tesis de Licenciatura, los objetivos han sido:

-Conocer las evoluciones de textura en diferentes fases de maduración del fruto y con distintas condiciones de conservación (temperatura, antisépticos, tiempo).

-Estudiar los enzimas presentes en distintos tipos de aliño, y su incidencia en la textura.

-Estudiar los cambios que se originan en la pared celular.

**ANTECEDENTES**

## 1. PARED CELULAR (PC)

Se denomina pared celular (PC) a la capa más externa de las células vegetales, que rodea a su vez a la membrana plasmática y está íntimamente relacionada con la textura de los tejidos. Es una estructura dinámica en cuanto a su composición, forma y propiedades, que sufre modificaciones como respuesta al crecimiento de la planta, estado de diferenciación, desarrollo de las células y función de las mismas.

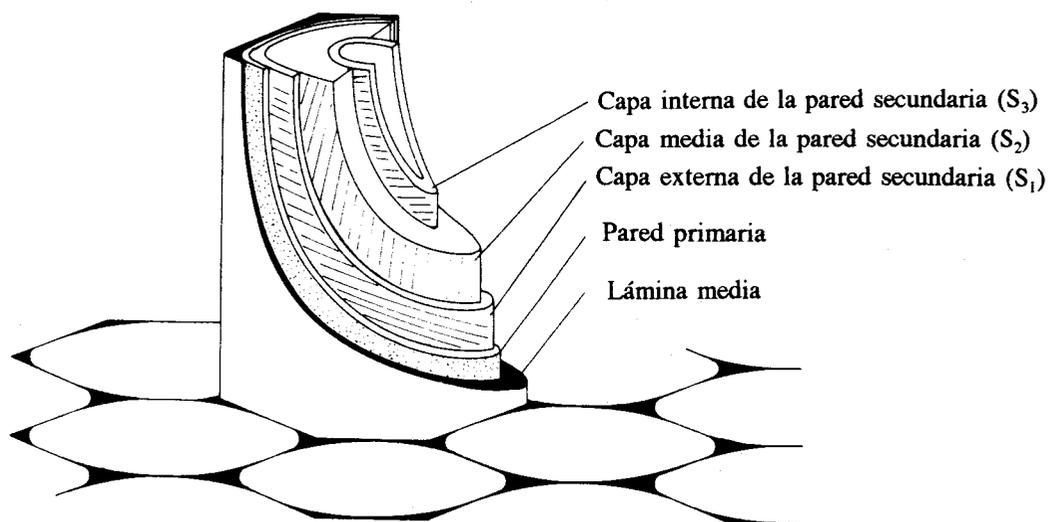
Es una membrana relativamente gruesa que interviene de forma diferente en la vida de tejidos y órganos, pudiendo actuar como tampón entre el medio y el contenido protoplasmático. De ella toma el citoplasma diversas sustancias que necesita para su metabolismo y sirve, a su vez, de compartimento para la excreción de compuestos (secreciones y desechos) que elabora.

Entre sus características, se encuentra la de ser permeable al agua y a los metabolitos, lo que hace que se oponga a la presión osmótica interna, asegurando así la turgencia del organismo.

Como resultado de la evolución de una serie de etapas de diferenciación celular, se consideran distintas zonas de la PC (Fig.1).

Lámina media: Es la zona más externa, común a dos células contiguas, entre las que actúa como un tabique de separación. No posee ordenación concreta y es muy rica en sustancias pécticas, lo que determina la cohesión intercelular.

Pared celular primaria: Aparece una vez que se ha formado la lámina media, debido a que a ambos lados de la misma comienzan a depositarse carbohidratos y otros compuestos segregados por las células. Paralelamente al engrosamiento producido en la pared, se da un crecimiento longitudinal. Se trata de una cubierta



**Figura 1. Organización de la pared celular por capas.**

flexible y resistente a la vez, sin ordenación de las moléculas, que proporciona a la célula un mecanismo de defensa frente a agentes externos.

Finalizada la etapa de crecimiento celular, si la pared sigue aumentando en grosor, aparece la pared secundaria, cuya estructura es más ordenada y sólo está presente en células bien diferenciadas (traqueidas, vasos, etc.) que adquieren su especificidad funcional dentro de tejidos concretos (Fig. 1). La célula con pared secundaria es capaz de soportar mejor presiones externas (Wilson, 1993).

## 2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PARED

Se distinguen dos fases en la PC: una es la llamada microfibrilar, formada por cadenas largas de celulosa ( $\beta$ -1,4-glucanos con grado de polimerización superior a 15.000) ordenadas en microfibrillas, que da lugar a una estructura cristalina; la otra fase se denomina amorfa o matriz y está constituida por una gran variedad de polímeros unidos por enlaces de distinto tipo relacionados, a su vez, con las microfibrillas que quedan englobados dentro de esta estructura compleja.

La composición de la PC, así como la proporción relativa de sus componentes, va variando a lo largo del proceso de maduración del vegetal.

### 2.1 Celulosa

Está constituida por moléculas de  $\beta$ -glucosa unidas a través de enlaces glucosídicos entre el C 1 de una molécula y el C 4 de la contigua. Estas uniones se ven reforzadas, a su vez, por enlaces de hidrógeno entre el hidrógeno perteneciente adyacente. Por otra parte, es posible la unión entre distintas cadenas de celulosa mediante enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ -1,6 (Fig. 2).

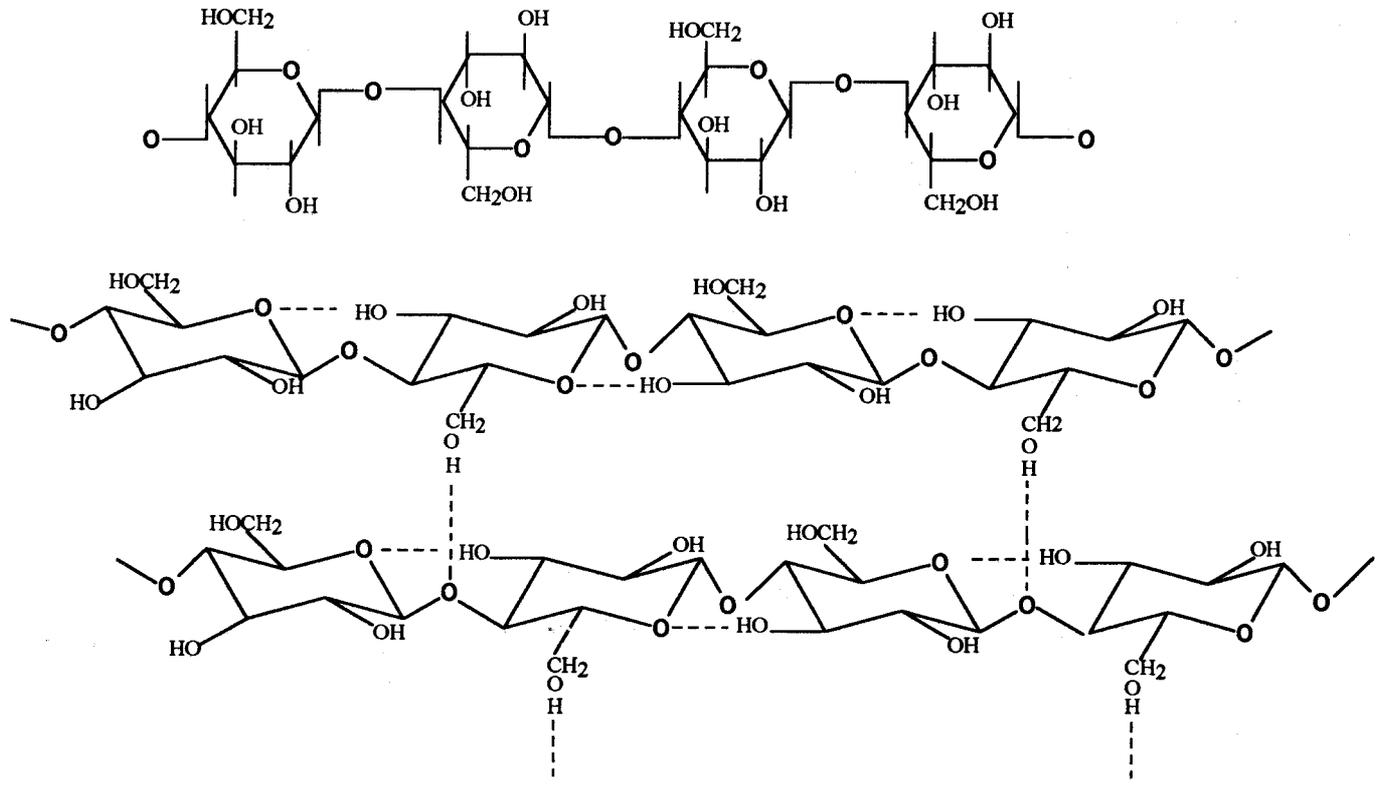


Figura 2. Estructura de las cadenas de celulosa.

La celulosa aparece rodeada por una capa de xiloglucanas (polisacáridos hemicelulósicos) unidas a ella por puentes de hidrógeno, y por polisacáridos pécticos que se le enlazan mediante una serie de cadenas laterales de galactanas y arabinogalactanas.

Es un homopolisacárido bastante inerte, tanto más cuando mayor sea su forma cristalina; no obstante, puede ser modificado por acción enzimática o por calentamiento, al aumentar su grado de hidratación. Por difracción de Rayos-X se ha podido constatar que la estructura cristalina se encuentra rodeada por otra de menor grado de organización, en la que se pueden localizar otros polisacáridos unidos mediante enlaces covalentes (Brillouet y Mercier, 1981; Taiz, 1984; Koller et al., 1991).

## 2.2 Hemicelulosas

Son polisacáridos complejos, tanto en su estructura como en sus conexiones con los restantes polisacáridos de pared, pudiendo contener distintos tipos de azúcares (Southgate, 1990). Son insolubles en agua y solubles en álcali (Fry, 1988).

Entre los polisacáridos hemicelulósicos se encuentran: xilanas, glucomanas, galactoglucomanas, mananas, galactomananas, xiloglucanas,  $\beta$ -1,4-glucanas y arabinogalactanas tipo II.

Xilanas: las PC de plantas anuales contienen entre el 15 y 30% de xilanas (Brett y Waldron, 1990). Son difíciles de aislar como homopolímeros, sin embargo se ha caracterizado una xilana en pulpa de aceituna, cuya cadena principal es una  $\beta$ -1,4-xilopiranososa con ramificaciones en los restos O-2 de xilosa (Gil Serrano et al., 1986).

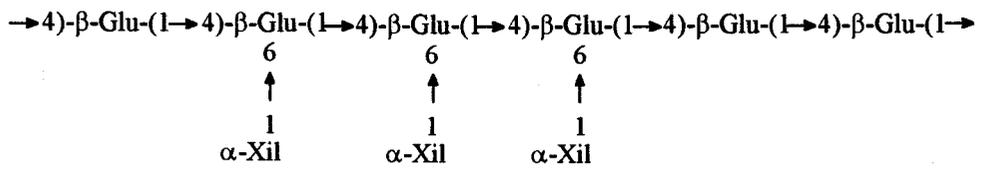
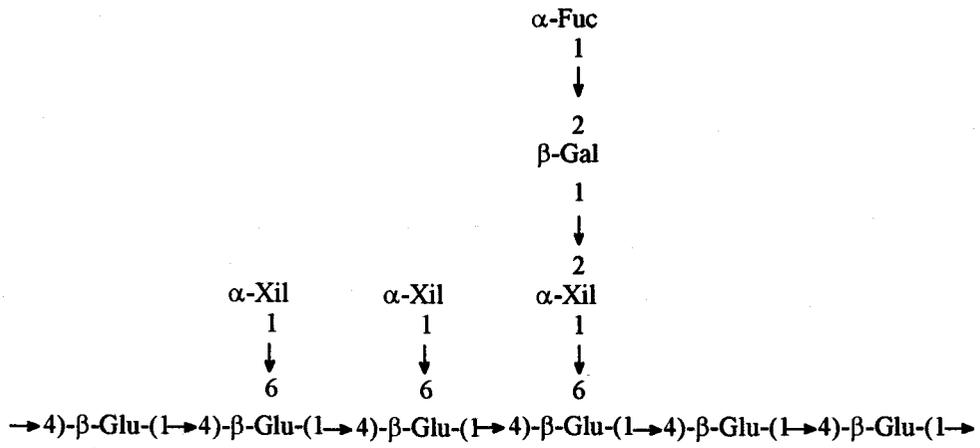
Glucomananas y Galactoglucomananas: Ambas están formadas por cadenas  $\beta$ -1,4-glucosa y  $\beta$ -1,4-manosa sin que exista regularidad en la secuencia de estos azúcares, y las galactoglucomananas presentan además cadenas laterales de galactosa, unidas principalmente a la primera por enlaces  $\alpha$ -1,6 (Stephen, 1983).

Mananas y Galactomananas: Están formadas por cadenas  $\beta$ -1,4-manosa a las que, en el caso de las galactomananas, se une galactosa por enlaces  $\alpha$ -1,6 (Brett y Waldron, 1990). Las mananas son polisacáridos muy compactos e insolubles en agua, debido a la gran cantidad de puentes de hidrógeno intramoleculares, llegando incluso a localizarse en microfibrillas de celulosa en distintos vegetales, como girasol (Düsterhöft y Voragen 1991) y remolacha (Bertin et al., 1988); sin embargo, las galactomananas son mucho más solubles en agua (Stoddart, 1984; Aspinall, 1983).

Xiloglucanas: Son las principales hemicelulosas de la PC primaria de dicotiledóneas (el 20% en peso de la PC) (Darvill et al., 1980). Su estructura es, básicamente, una cadena principal de  $\beta$ -1,4-glucosa, a la que se unen unidades de xilosa mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 (Fig. 3) (Albersheim et al., 1972). Se encuentran unidas a la celulosa por puentes de hidrógeno y esta unión es tan potente que para disociarla es necesario el empleo de álcali fuerte (Hatfield, 1993; Hayashi et al., 1994).

O'Donoghue y Huber (1992) comprueban que las xiloglucanas son los componentes hemicelulósicos mayoritarios.

Algunos autores proponen que, además de las uniones xiloglucana-celulosa, existen enlaces de tipo covalente, o no covalente, con otros polisacáridos de la matriz. Bauer et al. (1973) proponen uniones covalentes con polisacáridos pécticos; se han caracterizado dos xiloglucanas en el tejido parenquimático de la judía, íntimamente unidos a las cadenas de celulosa (Ryden y Selvendran, 1990), en col (Stevens y Selvendran, 1980), etc.



**Figura 3. Estructura simplificada de xilogucana.**

Arabinogalactana II: Son polisacáridos muy ramificados en los que aparecen residuos de  $\beta$ -D-galactopiranososa unidos por enlaces 1,3 a la cadena principal y 1,6 a las laterales. (Manzi et al., 1990; Mabusela et al., 1990).

Como índice general, se puede decir que están más fuertemente unidos en la pared que los polisacáridos ácidos, por lo que su modificación depende del grado de ramificación que posean; los poco ramificados forman puentes interpoliméricos, con la consiguiente rigidez en la pared, en tanto que los que contienen alto porcentaje de cadenas laterales, son capaces de absorber agua, dando lugar a un esqueleto altamente hidratado y, en consecuencia, más inestable y de fácil accesibilidad.

### 2.3. Polisacáridos pécticos

En la PC de frutos, se encuentra una elevada proporción de residuos de ácido galacturónico, galactosa y arabinosa, típicos de polisacáridos pécticos.

Las sustancias pécticas constituyen el nexo de unión entre células contiguas, y son muy susceptibles a sufrir modificaciones. En condiciones alcalinas suaves se produce una demetoxilación de los grupos ácidos, que se incrementa si se eleva la temperatura; igualmente, el calentamiento a pH neutro o alcalino da lugar a roturas de enlaces glicosídicos entre residuos de ácido galacturónico, por  $\beta$ -eliminación. En condiciones ácidas suaves se origina la hidrólisis de los enlaces glicosídicos entre residuos de azúcares neutros. En general, las roturas suelen producirse en la ramnosa de la cadena principal, o en las cadenas laterales de ramnogalacturonano, originándose solubilización de estos polisacáridos de pared. Entre los polisacáridos pécticos de la pared primaria se encuentran:

Ramnogalacturonanas: Son los mayoritarios en la lámina media. Están ampliamente ramificados, unidos a cadenas laterales de arabinanas y galactanas por enlaces covalentes. Las moléculas de ramnosa en la cadena principal constituyen los

puntos de unión a las cadenas laterales de arabinosa y xilosa (Mc.Neil et al 1984) (Fig. 4).

Arabinanas: Su estructura consta de unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa unidas por enlaces 1,5, con gran número de ramificaciones en C3 y C2 fundamentalmente formadas por cadenas laterales de oligosacáridos de  $\alpha$ -arabinofuranosa (Stephen,1983).

Galactanas: Son homopolímeros de  $\beta$ -1,4-galactosa y se localizan como polisacáridos estructurales en gran variedad de géneros y órganos (Stephen, 1983).

$\beta$ -Galacturonanas: Son polisacáridos compuestos fundamentalmente por cadenas de ácido  $\alpha$ -1-4-galacturónico, con grado de esterificación variable, en las que no se conoce cual es la distribución de los grupo metilo que esterifican los restos de ácido galacturónico; se han localizado, entre otros, en girasol (Darvill et al., 1980) y cebolla (McCann et al., 1992).

## **2.4. Proteínas**

Las proteínas que forman parte de la pared celular se dividen en proteínas estructurales y enzimas.

### **2.4.1. Proteínas estructurales (HPRG)**

Lo más habitual es que se encuentren glicosidadas (glicoproteínas) y con un alto contenido del aminoácido hidroxiprolina, unidos mediante enlaces covalentes, lo cual proporciona rigidez a la matriz y la hace insoluble (Mc.Neil et al., 1984).

Según que las glicoproteínas se hallen glicosidadas por cadenas de arabinosa o arabinogalactana, se distinguen dos tipos:

$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Ram-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Ram-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Ram-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Ram-(1}\rightarrow$

**Figura 4. Estructura simplificada de ramnogalacturonana I.**

Glicoproteínas extensinas, cuyo aminoácido mayoritario es la hidroxiprolina (Hyp). Contiene arabinosa, como carbohidrato principal, unida mediante enlace covalente, aunque también pueden aparecer uniones no covalentes, como las existentes entre este tipo de glicoproteínas y los polisacáridos pécticos ácidos (Hatfield 1993).

Arabinogalactana-proteína (AgP), en la que la porción de aminoácido la componen los Hyp, Ser, Ala y Gly (Brett y Waldron, 1990) y la glucídica contiene, en su mayor parte, arabinogalactana II.

La diferencia entre estos dos tipos de glicoproteínas radica fundamentalmente en que las primeras son capaces de unirse covalentemente en la pared y las segundas, que son solubles, se encuentran enlazadas iónicamente, o mediante algún tipo de interacción débil.

#### **2.4.2. Enzimas**

Son muy diversos los enzimas encontrados en la PC de las plantas superiores, relacionados con el metabolismo, maduración y procesos de ablandamiento (Fry, 1988). Entre ellos se encuentran las peroxidasas, que catalizan las uniones entre fenoles, pudiendo intervenir también en la unión de proteínas, ligninas, hemicelulosas etc. Estos enzimas están implicados en los mecanismos de defensa de las plantas (Cassab y Varner, 1988), en el crecimiento de las mismas, y en procesos de maduración y ablandamiento (Fry 1988; Huystee et al., 1992).

Otro grupo de enzimas relacionados con la PC son las hidrolasas, que se pueden encontrar de múltiples formas. Están implicadas en procesos metabólicos y mecanismos defensivos de los vegetales. Dentro de ellas se encuentran celulasas, glicosidasas y enzimas pectinolíticas, que se describen en el apartado 5.

## **2.5. Lignina y compuestos fenólicos**

La lignina es un polímero que solamente se encuentra en células diferenciadas en las que ha finalizado al crecimiento. Está constituida por redes tridimensionales de fenilpropano unidas por enlaces C-C y C-O-C (éter) siendo estas últimas mayoritarias (Sjöstrom, 1993).

Desempeña diferentes funciones en la pared celular, tales como proporcionar rigidez a las células especializadas de los tejidos conductores (traqueidas, vasos del xilema, esclerénquima, etc.). Igualmente, actúa como capa que impermeabiliza la pared, evitando en gran parte la entrada del agua y constituyendo una barrera de penetración de nutrientes y patógenos, por lo que contribuye a la función de defensa de la célula contra los microorganismos (Brett y Waldron, 1990).

Entre los compuestos fenólicos que aparecen en la PC se encuentra el ácido fenílico, que se encuentra generalmente asociado a carbohidratos.

## **3. TEXTURA DE FRUTOS Y VEGETALES PROCESADOS**

Una de las características organolépticas de los alimentos vegetales es la textura, factor determinante de su aceptabilidad o rechazo por parte del consumidor.

El mercado mundial es cada vez más selectivo y exigente en cuanto a la calidad de los alimentos y ésta depende, en cuanto se refiere a la textura, de la estructuración de su pared celular y de la acción enzimática sobre la misma.

En la actual Ciencia y Tecnología de Alimentos uno de los objetivos fundamentales es lograr un control de la textura y la posibilidad de modificarla según convenga y, es por ello que ocupa un lugar destacado el estudio de la PC como principal implicada en la misma.

Son numerosos los alimentos vegetales que sufren distintos tipos de elaboración para su consumo, ocupando un lugar preferente los procesos térmicos y los fermentativos, en sus diversas formas (Van Buren 1979; Jiménez 1993).

### **3.1. Pérdida de textura en vegetales y frutos y factores implicados**

La textura es un atributo de calidad importante en frutos, tanto frescos como procesados y, como ya se ha indicado, la estructura de la PC es un factor determinante de la misma.

La pérdida de textura se asocia, por lo general, a cambios de los polisacáridos que constituyen la PC; estas modificaciones pueden ser debidas a acciones enzimáticas en frutos frescos, o bien a la acción conjunta de enzimas y agentes químicos, tales como álcalis, ácidos, etc., en frutos elaborados.

Entre los cambios más significativos que se originan en la pared se encuentran la disminución de azúcares neutros (Lavavitch 1981; Huber 1983a; Gross y Sams, 1984) y/o la disminución de pesos moleculares de hemicelulosas y polisacáridos pécticos (Huber 1983b; 1984; Gross et al. 1986; McCollum et al. 1989).

Son numerosos los factores que pueden afectar a la textura, entre los que se encuentran variedad, estado de madurez, forma y duración de almacenamiento, presencia de sales, acidez del medio, etc. (Meurer y Gierschner, 1992).

a) Sal, calcio y pH: Tradicionalmente, en la industria se han utilizado altas concentraciones de sal durante la fermentación de frutos en salmuera (5-8% NaCl) y durante su almacenamiento (10-16% NaCl) para prevenir el ablandamiento enzimático (Walter et al., 1985).

La pérdida de turgencia de la célula, debida a la desorganización de la

membrana citoplasmática, junto con las roturas y uniones entre pectinas y polisacáridos hemicelulósicos es muy discutida; otro factor que puede ser importante para explicar la pérdida de textura durante estos procesos puede ser la desesterificación de pectinas. Estos procesos aumentan drásticamente la densidad de carga en las cadenas pécticas debido a los grupos carboxilos libres; la presencia de estas cargas negativas llevan a la desestabilización de la estructura celular, a causa de las repulsiones electrostáticas en las cadenas que cambian su conformación y, por tanto, su capacidad de formar geles tridimensionales.

Se ha demostrado que el calcio mejora la retención de firmeza de muchos frutos y vegetales durante el almacenamiento y procesado (Mínguez et al 1978; Hudson y Buescher 1985; Van Buren et al 1988). El sodio tiene un doble efecto: por un lado, mejora la textura por reducción de la repulsión electrostática de grupos ácidos, a valores de pH bajos, puesto que los iones sodio pueden neutralizar parcialmente las cargas negativas de los grupos carboxílicos y, por otro, el efecto contrario al actuar en competencia con el calcio (Van Buren 1979).

En pepinillos, la adicción de calcio en la salmuera de fermentación mejora los resultados de firmeza a concentración relativamente baja de NaCl (Fleming et al. 1978), incluso en presencia de PGasas de origen fúngico (Buescher et al. 1979, 1981); sin embargo, se encuentra que el gran poder inhibidor del calcio en la velocidad de ablandamiento a valores de pH por debajo de 3.5 no puede ser explicado por entrecruzamiento de pectinas (McFeeters y Fleming 1991).

b) Enzimas: También se ha relacionado la pérdida de textura en productos vegetales, en general, con los cambios sufridos en polisacáridos pécticos y hemicelulósicos.

Después de la fermentación, la textura de aceitunas disminuye, lo que es indicativo de que la actividad de enzimas exógenos y/o endógenos puede jugar un papel importante en el ablandamiento de los frutos (Fernández-Bolaños et al. 1992;

Heredia et al. 1993; Jiménez et al. 1995). En el caso de los vegetales fermentados, si no hay una fase de escaldado previo a la fermentación, los enzimas endógenos están allí presentes durante la primera fase de la misma, o cuando se colocan en salmuera. Bajo ciertas condiciones ambientales, actúan de forma diferente según los enzimas o sistemas enzimáticos: algunos enzimas son fuertemente inhibidos por la sal, otros son activados e incluso en la región de pH ácido, muchos enzimas son inactivados irreversiblemente (Meurer y Gierschner, 1992).

La pérdida de textura se ha atribuido en algunos casos a enzimas pectinolíticas (Bartley y Knee 1982, Brady 1987) ya que durante la maduración de muchos frutos ocurre una disminución de sustancias pécticas insolubles y un aumento de las solubles (Huber y O'Donoghue 1993; Brady 1987). Pero actualmente se puede afirmar que no son estos los únicos enzimas los que originan el ablandamiento de los frutos. Estos estudios están avalados por dos experimentos genéticos realizados en tomates, el primero de ellos por Giovannoni et al. (1989) que consiste en la inducción del enzima PGasa en un mutante rin del tomate, que tiene inhibidas muchas de las funciones típicas de la maduración, entre ellas el ablandamiento, y sus resultados muestran que, como consecuencia de esta inducción, se produce un aumento de poliuronidos solubles y una disminución de pesos moleculares, pero no se origina ablandamiento. El segundo experimento ha sido llevado a cabo por el grupo de Smith (1990), y llegan a la conclusión de que cuando se inhibe genéticamente la actividad de PGasa en tomate normal, no se inhibe la solubilización de poliuronidos ni el ablandamiento.

Hay evidencias que demuestran que otros enzimas además de PG pueden contribuir a la disminución del peso molecular de poliuronidos. Por ejemplo, preparaciones purificadas de  $\beta$ -galactosidasa de melón (Ranwala et al. 1992) y aguacate (De Veau et al. 1993) se muestran capaces, independientemente de PG, de disminuir los pesos moleculares de las cadenas de poliuronidos, vía degalactosidación.

Además de los cambios en los polisacáridos pécticos, actualmente se asume que el ablandamiento, que acompaña a la maduración de los frutos, es también debido a la modificación de las hemicelulosas de la pared celular, que constituyen una red de unión entre polisacáridos pécticos y celulosa. Una pérdida neta de azúcares no celulósicos y cambio en la distribución de pesos moleculares de hemicelulosa se ha observado durante la maduración de melón (McCollum et al. 1989), tomate (Tong y Gross, 1988), fresas (Huber, 1984), pimientos (Gross et al. 1986), aguacates (O'Donoghue y Huber, 1992) y aceitunas (Heredia et al. 1992). Por lo tanto otras hidrolasas de la pared celular, tales como las celulasas y glicosidasas ( $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -arabinosidasa,  $\alpha$ -manosidasa o  $\beta$ -glucosidasa) pueden ser importantes en la degradación de la pared.

Un incremento en la actividad de celulasa (endo- $\beta$ -1,4-glucanasa) está bien correlacionado con el ablandamiento de varios frutos (Awad y Young, 1979; Paull y Chen, 1983) pero el sustrato de este enzima y su papel "in vivo" sigue sin estar muy claro. O'Donoghue y Huber (1992) no apoyan la idea de que la glucanasa de aguacate actúe como una xiloglucanasa, es decir que esté incluida en la depolimerización de los xiloglucanos que ocurre durante la maduración. Sólo formaría parte de un complejo con capacidad de degradar en parte el xiloglucano antes de la acción de otros enzimas.

Recientemente, Redgwel y Fry (1993) han descubierto en kiwi otro enzima, una xiloglucana endotransglicosilasa (XET) que cataliza la transferencia de un fragmento de una molécula de xiloglucano a otra molécula, lo cual podría causar, si el enzima cataliza el paso de fragmentos de polisacáridos a oligosacáridos, la reducción del peso molecular del xiloglucano (Lorences y Fry, 1993). Este enzima es un nuevo candidato a tener en cuenta en los cambios de la pared celular que ocurren durante el ablandamiento del fruto, preparando la pared celular para la posterior modificación por los otros enzimas de pared.

En la actualidad se investiga en profundidad cual es su papel real en los

citados cambios.

c) Estado de madurez: La acción de los enzimas, que pueden degradar la pared celular de los frutos durante su maduración hasta originar ablandamiento, es también uno de los factores más importantes, que van a influir en los cambios de textura de vegetales fermentados (Meurer y Grierschner, 1992).

A continuación, utilizando como ejemplo los cambios que se producen en la aceituna durante su maduración y los conocimientos que existen sobre el tema en la actualidad, se va a describir cómo se relaciona el grado de madurez con los cambios de textura.

En estudios realizados sobre las aceitunas se ha demostrado que las principales modificaciones en la textura coinciden con el inicio de cambios de coloración, disminuyendo en un 50% entre las aceitunas en estado verde maduro y las de color cambiante, para posteriormente permanecer más o menos constante en fruto negro (Heredia et al. 1992).

No obstante, a pesar de la presencia y actividad de altos niveles de celulasas (Heredia et al. 1991) y PGasas (Mínguez, 1982) solubles en tampones de baja fuerza iónica (enzimas citoplasmáticos y/o apoplásticos) no se había encontrado una total correlación en el tiempo entre actividad de estos y la velocidad de ablandamiento, ya que aparecen en las aceitunas maduras, cuando apenas hay cambios en la textura. Posteriormente, fueron encontradas y descritas una serie de glicosidasas (Heredia et al. 1992, 1993) que correlaciona mejor con los cambios que ocurren en las paredes celulares durante el período que disminuye más la textura. No obstante su acción no es suficiente para explicar por sí solas los cambios de textura.

Recientemente, utilizando paredes celulares enzimáticamente activas, aisladas de aceitunas, este mismo grupo de trabajo ha llegado a detectar siete glicosidasas ( $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -arabinosidasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -

xilosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa), una celulasa y una endopoligalacturonasa intraparietales, enzimas asociados a la pared mediante enlaces iónicos (sólamamente solubilizadas con tampones de alta fuerza iónica) y covalentes, cuyas actividades están todas presentes en los frutos en estado verde, coincidiendo con los cambios más rápidos de textura (Fernández-Bolaños et al. 1995). La acción conjunta de estos enzimas con las glicosidasas solubles anteriormente indicadas son los que originan los grandes cambios de textura del fruto.

d) Almacenamiento: El tiempo de almacenamiento es otros de los factores que afectan a la textura de los frutos. Hay estudios que relacionan las actividades enzimáticas con las pérdidas de textura durante el periodo de almacenamiento. Almacenando aceitunas en cámaras a 15°C, la actividad enzimática de PE se incrementa en los ocho primeros días para luego descender paulatinamente, en cambio la actividad de PGasas aumenta progresivamente con el tiempo de almacenamiento (Castillo et al. 1978).

Burns (1990) ha realizado estudios de  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa en naranjas durante su almacenamiento. Las actividades de galactosidasas aparecen a las 8 semanas de almacenamiento a 10°C. La actividad total de  $\alpha$ -galactosidasa permanece constante pero la  $\beta$ -galactosidasa disminuye después de 8 semanas.

En mandarinas Satsuma se observa una elevada actividad de endo-PG en el almacenamiento a baja temperatura, siendo este enzima responsable de la despolimerización de las pectinas, que tiene lugar durante el almancenamiento en frío (Naohara y Manabe 1994).

### **3.2. Contaminación microbiana y efecto en el ablandamiento de productos aderezados**

En los productos del aderezo (aceitunas, pepinillos, etc) son muchas las

bacterias, levaduras y hongos presentes en la salmuera de conservación o fermentación que pueden producir una serie de enzimas que, actuando sobre los polisacáridos de la pared celular, afecten negativamente a la textura de los productos fermentados.

Desde muy antiguo, se ha relacionado el ablandamiento de estos productos con los cambios sufridos en las sustancias pécticas como resultado de la acción de los enzimas pectinolíticos, producidos por los mohos que crecen en la superficie de las salmueras de conservación, fundamentalmente las especies de los géneros, Penicillium, Fusarium, etc (Bell et al. 1950; Costilow et al. 1980).

Vaughn et al. (1972) han asociado también esta alteración con los enzimas pectinolíticos producidos por los hongos Penicillium y Aspergillus y por algunas levaduras de tipo fermentativo, presentes en las salmueras de fermentación y conservación de aceitunas, específicamente las especies de Saccharomyces oleaginosus y Hansenula anomala, y algunas especies de Bacillus (B. mesentericus, B. polymyxa, B. macerans, etc).

Posteriormente se ha demostrado, que incluso bacterias lácticas que incluyen Lactobacillus plantarum (Sakellaris et al. 1988) y Leuconostoc mesenteroides (Juven et al. 1985) pueden producir PGasas.

Buescher y Hudson (1984) señalan que las celulasas en salmuera producen, asimismo, serios problemas de ablandamiento en los pepinillos. También se ha observado ablandamiento en algunos casos en que no se detecta en salmuera actividad pectinolítica. Esta alteración podría haber sido causada por enzimas de origen fúngico, o por el resultado conjunto de PGasas (McFeeters et al. 1980) y de otros enzimas endógenos de pepinillos, particularmente a concentraciones de baja sal.

Son numerosas las bacterias y hongos que aparecen en plantas superiores y tienen la capacidad de producir enzimas, tanto pectinolíticos como celulolíticos.

Walter et al. (1985) encuentran hifas de hongos de pepinillos duros y blandos, por lo que no es posible determinar si el ablandamiento es debido a enzimas extracelulares producidos por microorganismos invasores o a enzimas endógenos del propio fruto.

#### 4. ACEITUNAS "ALIÑADAS"

##### 4.1. Definiciones

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 1980), "se denomina aceituna de mesa al fruto de variedades determinadas de olivo cultivado (*Olea europea sativa*), sano, cogido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal, que sometido a las preparaciones adecuadas, dé un producto de consumo y de buena conservación como mercancía comercial. Estas preparaciones pueden, eventualmente, incluir la adición de diversos productos o aromatizantes de buena calidad alimentaria".

En la Reglamentación Técnico-Sanitaria Española (1983) se definen los distintos productos que se ofrecen al consumidor, incluyendo las preparaciones artesanales y tradicionales como los derivados de aquella y perfeccionados por la investigación. Sin embargo, formas de elaboración tan apreciadas y difundidas como son las "*aceitunas aliñadas y aromatizadas*", aunque no son definidas específicamente en la Norma, estarían incluidas dentro de las preparaciones de "*aceitunas machacadas (partidas voluntariamente)*" o "*aceitunas seccionadas (rayadas)*" que se conservan en una salmuera, con vinagre o sin él, pudiendo incorporar a la misma agentes aromatizantes, o dentro de otras "*especialidades*", siempre que los frutos o ingredientes utilizados respondan a las definiciones generales establecidas por las Normas, además de estar incluidas claramente dentro del concepto de "*preparaciones comerciales*" que utiliza el COI (1980).

## 4.2. Tipos de aceitunas empleadas

Las aceitunas más empleadas para ser aliñadas son las verdes, recogidas antes del envero y cuando han alcanzado su tamaño normal, y las de color cambiante, con un color rosado, rosa vino o moradas, recogidas antes de su completa maduración y de que adquieran un color totalmente negro.

Estas aceitunas son endulzadas con cambios periódicos de agua, son tratadas con lejía y lavadas, o bien conservadas en salmuera hasta el momento de su elaboración. Actualmente muchas de las aceitunas aliñadas son elaboradas a partir de aceitunas verdes estilo sevillano, (tratadas con una lejía alcalina y acondicionadas posteriormente en salmuera, en la que sufren una fermentación láctica).

El tipo de aceituna empleada y los componentes del aliño influyen de forma decisiva en la conservación del producto. La disponibilidad de azúcares (más elevada en las endulzadas y menor en las aderezadas al estilo sevillano) y, por lo tanto, la capacidad de tener un medio más o menos favorable para el desarrollo microbiano, lleva a que en la condimentación final se puedan dar alteraciones, si las sustancias que se utilizan tienen cierta carga microbiana. Además, las aceitunas procedentes de una fermentación ácido láctica favorecen la conservación del producto (Garrido, 1991).

## 4.3 Especies y otros condimentos

Las **especies** se han definido por la "Food and Drug Administration", como sustancias vegetales aromáticas que se utilizan para el condimento de alimentos.

**Condimento** es un término más amplio que se aplica a las mezclas de especias y que puede o no contener otros ingredientes, como cebolla, ajo, sal, azúcar, etc.

En la industria se utilizan productos naturales, frescos o desecados y molidos, o bien otros sustitutos, tales como "extractos naturales dispersados sobre sal o dextranos", "aceites esenciales", obtenidos por un proceso de destilación y "oleoresinas", obtenidas por extracción con disolventes (Hainrihar, 1991), o la mezcla de estas esencias con productos naturales.

El Real Decreto nº 2242/84, del 26 de Septiembre, contiene la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias, clasificando estos productos en: especia o condimento aromático, condimentos preparados o sazonadores y sucedáneos de especias.

Se designa "especia o condimento aromático" a las plantas o partes de las mismas, frescas o desecadas, enteras, troceadas o molidas, que por su color, aroma o sabor característicos se destinan a la preparación de alimentos y bebidas, con el fin de incorporarles estos atributos, haciéndolos más apetecibles y sabrosos y, en consecuencia, consiguiendo un mejor aprovechamiento de los mismos.

A pesar de que los productos vegetales naturales, tales como bulbos (ajo), frutos (comino, hinojo, pimentón), hojas (perejil, tomillo, laurel), flores (orégano) etc., se utilizan desde antiguo en la preparación de aceitunas aliñadas de forma artesanal, actualmente y debido a que se tiende a mantener una producción homogénea de alimentos, se suelen poner más objeciones al empleo de dichos productos naturales (Fernández, 1985). El resto de productos (aceites esenciales, oleoresinas, etc) presentan la ventaja, con respecto a los naturales, de estar prácticamente exentos de gérmenes, poseer muy baja actividad enzimática y ser fácilmente estandarizados, con lo cual se asegura la reproducibilidad de las preparaciones (Borbolla y Alcalá 1977; Fernández, 1985).

#### **4.4. Acción antimicrobiana de especias y condimentos**

Las especias y condimentos, en general, además de proporcionar sabores

característicos a los alimentos pueden tener, en determinadas circunstancias, cierta acción conservadora.

El poder bacteriostático o bactericida de las especias se debe a que en su composición se encuentran los aceites esenciales, que ejercen un poder inhibitor o destructivo sobre algunos microorganismos (Saraza et al.1993). Esta característica depende de distintos factores como son origen, forma de almacenamiento (entero o molido), etc. Asimismo, este poder inhibitor varía de una especia a otra y con el tipo de microorganismo (ICMSF,1983; Martínez et al. 1988).

La cantidad de especias empleadas para el aliño de alimentos en general, es muy pequeña, por lo que los aceites esenciales que se aportan también lo es. Como consecuencia, el poder inhibitor de las especias añadidas es escaso, si bien puede potenciar la acción de otros conservadores adicionados a los alimentos y reducir la resistencia térmica de los microorganismos (Saraza et al.1993).

Entre los condimentos más utilizados se encuentran:

**Ajo.-** es el condimento que ocupa el primer lugar por su aporte de sabor y por la frecuencia que se utiliza como constituyente en las fórmulas de aliño. Se ha comprobado que sus derivados sulfurados (sulfóxidos de cisteína) son capaces de inhibir el crecimiento microbiano, siendo la sensibilidad en este orden: levaduras > hongos > bacterias (Dababneh y Al-Delainy, 1984; Yoshida et al.1987; Ghaunoum, 1989).

**Tomillo, laurel, orégano.-** Tienen un ligero poder inhibitor contra la mayoría de los microorganismos.

**Canela y clavo.-** Contienen aldehído cinámico y eugenol, respectivamente; son, en general, más bacteriostáticos que los anteriores.

**Hinojo.**- Es el fruto maduro y desecado de Foeniculum vulgare, muy rico en anetol, que actúa como antiséptico.

**Limón y cítricos en general.**- Se encuentran entre los aromatizantes más importantes por poseer el mayor número de sustancias aromáticas (Gordon von Campe, 1990) y, además, ayudar a la conservación por acidificación.

#### **4.5. Contaminaciones microbianas que introducen las especias y condimentos. Efectos enzimáticos endógenos y exógenos**

Las especias son productos naturales y como tales poseen una flora habitual que provienen del medio donde se desarrollan. Además, en su proceso de elaboración y comercialización pueden sufrir alguna otra contaminación por una amplia variedad de microorganismos: bacterias saprófitas, levaduras, hongos, bacterias termófilas anaerobias y aerobias, etc. (Garrido et al.1988), que pueden contribuir al deterioro de los productos.

Aunque estas alteraciones no sean perjudiciales para la salud del consumidor tienen una fuerte repercusión en el campo tecnológico o de elaboración de alimentos por la pérdida de propiedades por las que fueron elegidas (Saraza et al.1993).

Entre las fuentes de contaminación destaca, por su importancia, el crecimiento de hongos durante el proceso de desecación de las especias cuando no se realiza en las condiciones de humedad y temperatura adecuada (Salmeron et al.1988, Martínez et al.1988).

El ajo se encuentra sujeto a diversas alteraciones microbianas, entre las que destaca por su importancia la "descomposición fúngica azul" producida por el desarrollo de algunas especies de hongos pertenecientes al género Penicillium (Salmeron et al. 1988).

Según se desprende de la bibliografía, el empleo de ajos, contaminados por mohos y bacterias, puede ser la causa indirecta del ablandamiento de productos aderezados, producido por los enzimas pectinolíticos segregados por estos gérmenes; sin embargo, los ajos libres de contaminación microbiana (esterilizados, deshidratados, etc) no producen dicha alteración (Fernández, 1985).

Se han encontrado en ajos una pectinesterasa y una poligalacturonasa. La primera se ha aislado en muestras descompuestas por el hongo Penicillium canescens, no existiendo en las alteradas por Fusarium oxysporium, lo cual parece indicar que no todos los gérmenes de hongos que atacan a esta planta producen dicho enzima (Borbolla y Alcalá, 1972).

En ajos frescos la PE es más activa que la que se encuentra en ajos deshidratados y en polvo, disminuyendo su actividad a concentraciones del 3-4 % de NaCl y valores de pH de 4. Así mismo, se inhibe su actividad por la pasteurización a 72°C, durante 5 minutos (Borbolla y Alcalá 1977)

El pimentón, ingrediente bastante común en aceitunas aliñadas, suele ser una fuente importante de contaminación, con abundante desarrollo de bacilos esporulados( G. Bacillus).

De todo ello se deduce que algunos de los enzimas procedentes de los microorganismos contaminantes pueden contribuir a la alteración de los alimentos producidas por algunas especias (Martínez et al.1988; Garrido et al.1988). Sin embargo, también hay que tener en cuenta la posible acción de aquellos enzimas endógenos (lipolíticos, pectinolíticos, celulolíticos, etc.) de las especias, que actuarían alterando las grasas contenidas en ellos, o provocando el ablandamiento de los mismos (Fernández, 1985).

## **MATERIALES Y METODOS**

## **1. MUESTRAS**

### **1.1. Muestras empleadas**

Aceitunas de la variedad Hojiblanca, recolectadas en la Estación Experimental de Extensión Agraria de Cabra (Córdoba).

La toma de muestra se realiza en árboles previamente seleccionados, recogiendo los frutos en tres estados de maduración: verde, color cambiante y negro.

### **1.2. Preparación de la muestra**

Los frutos verdes se seleccionan según el tamaño, en cinta transportadora; posteriormente se deshuesan, en deshuesadora mecánica, se aliñan (según la fórmula de aliño indicada en el apartado 1.3) y se envasan en frascos de 1/2 galón.

Las aceitunas color cambiante y negras se seleccionan de forma análoga a las verdes y se colocan en un fermentador, con salmuera (solución al 6% de NaCl), y 0,4% de ácido acético, con aireación. Al cabo de 3 meses se toma una muestra que se deshuesa, se aliña y se envasa en frascos de 1/2 galón.

### **1.3. Elaboración de aliños**

Para la preparación de los aliños se ha recopilado una serie de fórmulas de los mismos existente en la bibliografía (Borbolla y Alcalá, 1972). En total se disponen de 29 fórmulas de aliños en las cuales aparecen reiteradamente una serie de componentes del aliño, como son el ajo, limón o naranja amarga, etc. De todas ellas

se ha seleccionado una que se va utilizar en todas las preparaciones.

Su composición es, por cada Kg de aceitunas deshuesadas:

- 50 g ajo
- 45 g limón
- 1,3 g de orégano
- 0,15 g de tomillo
- 0,20 g laurel
- 0,03 g comino
- 0,10 g hinojo
- sal 4%
- vinagre de 5° (58 mL por litro de salmuera)

Tras mezclar minuciosamente, se envasan las aceitunas con su aliño en dos lotes, en botes de 1/2 galón, se dejan equilibrar durante 10 días (con agitación diaria) y se conservan en cámara a 30°C y 5°C.

## **2. TEXTURA DEL FRUTO**

La determinación de la textura se realiza por compresión-cizallamiento, que es una buena forma de correlación con los ensayos organolépticos para juzgar el grado de firmeza y jugosidad de la aceituna (Fernández y Vidal, 1968). Para ello se ha utilizado un texturómetro Instron Universal (modelo 1011), que lleva acoplado una célula de compresión-cizallamiento (Kramer).

### **Metodología**

Una vez calibrado el texturómetro, se lleva a cabo la rotura del fruto

deshuesado y pesado, con una velocidad de cizallamiento de 200mm/min, midiéndose la fuerza necesaria para ello, procurando que la fuerza ejercida sobre la misma no supere los 500 N. Se realizan 15 replicados para cada medida y los valores se expresan en N/g de fruto deshuesado.

### **3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl, pH, ACIDEZ LIBRE Y ACIDEZ COMBINADA**

Las medidas de pH, acidez libre y acidez combinada se han realizado conjuntamente en un procesador automático "Tritroprocessor" (Methovor), equipado con electrodos potenciométricos, basándose las medidas en volumetrías de neutralización.

La *acidez libre* es un parámetro definido por la suma de los distintos ácidos orgánicos libres en salmuera. La *acidez combinada* o lejía residual viene dada por las sales de los ácidos orgánicos existentes en la salmuera (procedente de los frutos o de los componentes de los aliños), que contribuyen en el sistema amortiguador de la salmuera y, por lo tanto, influyen directamente en el pH del medio.

La determinación del contenido en cloruro sódico se basa en una volumetría de precipitación.

#### **3.1. Determinación de pH, acidez libre y acidez combinada**

##### **Reactivos**

- Solución de hidróxido sódico 0,5 N (Merck)
- Solución de ácido clorhídrico 2 N (Merck)

## **Metodología**

Se parte de 10 mL de jugo de aceituna (obtenido por presión a partir de la pulpa molida del fruto y separado por decantación de la fase oleosa) y se llevan a un volumen de 25 mL con agua destilada. El procesador realiza inicialmente la medida del pH y, en función de éste, adiciona la cantidad suficiente de NaOH 0,5 N para alcanzar la neutralidad (exactamente hasta un valor de pH de 8,3, punto de viraje de la fenolftaleína). El volumen de NaOH gastado da la medida de la acidez libre.

La determinación de la acidez combinada se lleva a cabo por la adición de ClH 2 N hasta que la muestra alcanza un valor de pH de 2,6 (para este valor de pH todas las sales de lactato se encuentran como ácido láctico) corrigiendo el propio aparato, de forma automática, los equivalentes de NaOH añadidos previamente para la determinación anterior.

La acidez libre se expresa en gramos de ácido láctico/100mL y la acidez combinada en equivalentes/L de NaOH.

### **3.2. Determinación del contenido en cloruro sódico**

#### **Metodología**

0,5 mL de jugo de aceituna se diluyen con agua destilada y se valoran con nitrato de plata, usando como indicador cromato potásico. La cantidad de cloruro sódico se expresa como % en peso por 100 mL de jugo.

## 4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

### Material

- Centripet.
- Centrífuga refrigerada (Sorvall).
- Ultraturrax.
- Agitador magnético (Vortex).
- Papel de filtro.

### Reactivos

- Solución tampón acético/acetato 0,05 M, pH 5,5.

### Metodología

Las preparaciones de los extractos enzimáticos se han llevado a cabo de forma diferente según hayan sido extractos de salmuera, extracto de ajo o de limón;

A.- Extracto de salmuera: El procedimiento seguido para la obtención de extractos enzimáticos de salmueras de aceitunas aliñadas ha sido el siguiente: se parte de 30 mL de salmuera previamente filtrada, se introducen en los centripet (15 mL por centripet), se centrifugan a 3.200 rpm durante 1,5 horas; posteriormente, se añaden a cada centripet otros 15 ml de salmuera filtrada y se vuelve a centrifugar, en las mismas condiciones. Con estas dos centrifugaciones se ha conseguido concentrar extractos hasta 1/6 a 1/7 de su volumen inicial.

A continuación se dializan, lavando sucesivamente los extractos concentrados con tampón acetato 0,05 M, pH 5,5, y centrifugando en las condiciones anteriormente indicadas, en cada lavado. Esta operación se repite 4 veces. En este

extracto dializado se realizan posteriormente las determinaciones de actividades enzimáticas.

Tras el proceso se consiguen extractos enzimáticos concentrados (de 6 a 7 veces) y dializados, con la ventaja de poder cambiar las condiciones de pH y tampón cuando sea necesario. Es suficiente con lavar 4 veces con el tampón deseado y proceder de forma análoga a la descrita anteriormente.

B.- Extracto de ajo: Se pesan 20 g de ajo, previamente triturados y se le añaden 50 mL de tampón acetato 0,05 M, pH 5,5; se homogeneiza en Ultraturrax durante un tiempo máximo de 30 segundos a velocidad máxima y se deja en agitación en cámara a 4°C durante 2 horas (con el fin de favorecer la extracción). Transcurrido este período de tiempo se centrifuga a 13500 g durante 20 minutos y se filtra mediante papel de filtro. El filtrado constituye el extracto enzimático.

C.- Extracto de limón: Se pesan 10 g de limón, se trituran y se mezclan con 25 ml de tampón acetato pH 5,5. A continuación se procede de manera análoga a la preparación del extracto de ajo.

## 5. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 5.1 Medida de actividad celulolítica

#### Materiales

- Baño viscosimétrico Viscobath-134, termómetro Thermostad-634, (Crison)
- Viscosímetro Cannon Fenske viscosimeter (serie 150)
- Agitador magnético Vortex
- pH-metro Digilab 518 (Crison)

## **Reactivos**

- Solución tampón acético/acetato 0,05M, pH 5,5 (Panreac).
- Solución de carboximetilcelulosa (CMC), Solucel N-50 (Sigma) al 0,75% P/V. La CMC se disuelve en tampón acetato pH 5,5, empleando un agitador magnético para homogeneizar. Se añaden unas gotas de mertiolato (Solución al 0,01%) con objeto de evitar una posible contaminación microbiana.

## **Metodología**

La actividad celulolítica se determina midiendo la disminución de viscosidad del sustrato (CMC) tras ser incubado con la solución de enzima (extractos enzimáticos).

### Medida de la viscosidad

En un viscosímetro capilar de vidrio de tipo Canon- Fenske, se coloca la mezcla de reacción: 5 mL de solución de CMC (0,75%) y 2 mL de extracto enzimático y se introduce en un baño cilíndrico de pared transparente; como medida de viscosidad se utiliza el tiempo de descenso de la solución entre dos marcas del mismo a la temperatura de 30°C; paralelamente se lleva a cabo la estandarización determinando el tiempo de flujo del agua en dicho viscosímetro.

El extracto enzimático debe prepararse a una concentración de enzima tal que la actividad determinada sea directamente proporcional a la cantidad de enzimas presentes. Para ello, se lleva a cabo la medida de descenso de viscosidad cada 10 minutos, hasta que la relación entre tiempo de paso y tiempo de reacción (60 minutos) sea lineal.

Las determinaciones se realizan a tiempo cero y cada 15 minutos durante la primera hora y seguidamente a las 2, 3 y 4 horas de incubación.

Expresión de la actividad enzimática.

Se calcula como porcentaje de descenso relativo de la viscosidad del extracto enzimático activo (A) respecto al blanco (B).

$$\% \text{ descenso viscosidad} = \frac{\text{Viscosidad(B)} - \text{Viscosidad (A)}}{\text{Viscosidad (B)}} \times 100$$

Dichos porcentajes se convierten en unidades relativa de actividad enzimática, utilizando la transformación de Almin et al., 1967, según la ecuación:

$$[\eta]^{\alpha} = \frac{B}{C^{\alpha}} t + [\eta_0]^{-\alpha}, \text{ siendo:}$$

B : Unidades relativas de actividad enzimática

$\eta$  : Viscosidad intrínseca

$\alpha$  : Constante empírica (3,66)

$\eta_0$  : Viscosidad intrínseca a tiempo 0

C : Concentración de sustrato (g/l)

t : tiempo de reacción

## 5.2 Medida de actividad de poligalacturonasa

### Materiales

- Baño viscosimétrico Viscobath-134.

- Viscosímetro Canon-Fenske.
- Centrífuga refrigerada (Sorvall).

### **Reactivos**

- Solución tampón acético/acetato sódico 0,05 M pH 5,5 (Panreac).
- Solución de pectina de limón (Sigma) al 0,6% P/V. Se prepara en tampón acético/acetato pH 5,5 y se adicionan unas gotas de mertiolato (solución al 0,01%) para su conservación.

### **Metodología**

La actividad de la PGasa se determina de forma análoga a la descrita en el apartado 4.1, utilizando como sustrato pectina de limón al 0,6 % P/V, en solución tampón acético/acetato 0,05 M, pH 5,5 y midiendo la disminución de viscosidad de la solución de la pectina.

### **Expresión de la actividad enzimática.**

Se calcula a partir de los datos de viscosidad, mediante la ecuación de Almin et al. (1967), de forma análoga a lo indicado en el apartado 4.1 para la CMC.

## **5.3 Medida de actividad de glicosidasas**

### **Materiales**

- Espectrofotómetro 500 E, UV/VIS (Perkin-Elmer).
- Baño termostático con agitación (Selecta).
- pH-metro Digilab 518 (Crison).

## Reactivos

-Solución tampón citrato (ácido cítrico/citrato sódico) 50 mM, pH 4,6 (Panreac).

-Solución de carbonato sódico 500 mM (Panreac).

Como sustratos se utilizan soluciones de los siguientes reactivos:

4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (Fluka).

2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (Boheringer).

p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucapiranosido (Fluka).

2-nitrofenil- $\alpha$ -arabinopiranosido (Sigma).

## Metodología

Las actividades de  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -arabinosidasa, se determinan midiendo el incremento de absorbancia que tiene lugar por acción de cada enzima, al liberarse p-nitrofenol del respectivo p-nitrofenilderivado, utilizado como sustrato.

La mezcla de reacción contiene 0,1 ml de disolución de sustrato, en tampón citrato 50 mM y 0,2 ml de extracto enzimático. Se incuban durante 15 minutos a 40°C ( $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -arabinosidasa), durante 15 minutos a 35°C ( $\alpha$ -galactosidasa) y 30 minutos a 35°C ( $\beta$ -galactosidasa). Posteriormente se adicionan 5 ml de disolución de carbonato sódico 500 mM con el fin de detener la reacción enzimática. Se mide la absorbancia a 420 nm.

Paralelamente, se prepara el blanco correspondiente a cada enzima, con una mezcla análoga a la anterior, pero para un tiempo de incubación de 0 minutos.

### Expresión de la actividad enzimática.

Se expresa en  $\eta$ Kat, definiéndose un katal (unidad de sistema internacional) como la cantidad de enzima que convierte un mol de sustrato en producto, en un segundo.

## **6. ANÁLISIS DE PARED CELULAR**

### **6.1. Aislamiento del material de pared (MP)**

Un sistema de aislamiento de pared de productos vegetales consiste en tratarlos con un detergente acuoso (laurilsulfato sódico) para eliminar proteínas citoplasmáticas y componentes de bajo peso molecular solubles en agua. Posteriormente se añade al residuo una mezcla de fenol:ácido acético:agua para inactivar los enzimas de pared y eliminar proteínas residuales, pigmentos y fenoles.

Apoyándonos en la bibliografía, se ha puesto a punto este método de trabajo, con las modificaciones que se han considerado más adecuadas para el fruto en estudio.

#### **Material**

- Ultraturrax T25 (Janke Kunke)
- Ultracentrífuga refrigerada (Sorvall)
- Filtros de vidrio GF/C (Whatman)
- Rotavapor (Büchi)
- Sacos de diálisis de Pm 12.000 (Sigma)
- Liofilizador (General Engineering Co)

## Reactivos

- Laurilsulfato sódico (Merck)
- N-octanol (Merck)
- Fenol (Panreac)
- Acido acético (Fluka)
- Acetona (Panreac)
- Hexano (Scharlau)

## Metodología

A 50 g de pulpa, deshuesada y triturada, se le añaden 200 mL de una solución al 1% de laurilsulfato sódico y 2 mL de octanol, se homogeneiza en ultraturrax y se mantiene 12 horas en agitación, a 4°C. Se centrifuga a 27.500g durante 40 minutos y se filtra en embudo Büchner, conservándose el filtrado a 4°C. Al residuo se le añaden 3 x 250 mL de agua destilada, tras homogeneizar en Ultraturrax, se centrifuga, se filtra, y se unen las aguas de lavado al extracto anterior, constituyendo la *fracción soluble en laurilsulfato sódico* (LSS). El residuo húmedo se trata con 100 mL de fenol:ácido acético:agua en la proporción 2:1:1, se homogeneiza en Ultraturrax y tras centrifugar en análogas condiciones, se repite una segunda vez esta operación. Se lava repetidamente con agua destilada y posteriormente con acetona, hasta la obtención de filtrados incoloros. El residuo sólido obtenido constituye el *material de pared* (MP).

La fracción solubilizada en LSS, se concentra en rotavapor sin llegar a sequedad y se dializa frente a agua destilada durante una semana, con dos cambios diarios de agua y al cabo de ese tiempo, se extrae tres veces con hexano, a 4°C, para eliminar restos de grasa. La fracción acuosa se concentra en rotavapor y se liofiliza en matraz previamente tarado, para su posterior cuantificación gravimétrica.

## 6.2. Fraccionamiento del material de pared

Los polisacáridos constituyentes de la pared celular se extraen secuencialmente, de acuerdo con sus solubilidades en diferentes disolventes.

### Material

- Baño termostático (Unitronic 320 OR)
- Filtros de vidrio GF/C (Whatman)
- Sacos de diálisis Pm 12.000 (Sigma)
- Ultracentrífuga refrigerada (Sorvall)
- Liofilizador (General Engineering CO)

### Reactivos

- Imidazol (Fluka)
- Acido clorhídrico (Panreac)
- Carbonato sódico (Panreac)
- Borohidruro sódico (Merck)
- Hidróxido potásico (Panreac)
- Acido acético glacial (Panreac)

### Metodología

A 1 g de material de pared se le añaden 100 mL de imidazol/clorhídrico (0,5 M, pH 7), realizándose dos extracciones sucesivas, la primera durante 12 horas a temperatura ambiente y, una vez separado el residuo por filtración, se lleva a cabo la segunda, durante 3 horas en las mismas condiciones. Tras separar el sobrenadante, se lava con agua destilada. Los tres filtrados reunidos constituyen la *fracción soluble en imidazol* (FSI).

El residuo húmedo obtenido anteriormente se suspende en 100 mL de carbonato sódico 0,05 M (20 mM en borohidruro sódico), realizándose una primera extracción durante 16 horas a 4° C y una segunda durante 3 horas, a temperatura ambiente. Se lava con agua destilada, y se une a los sobrenadantes separados de las anteriores extracciones, lo que constituye la *fracción soluble en carbonato sódico* (FSC).

El residuo húmedo resultante se trata con 100 mL de hidróxido potásico al 4 % (20 mM en borohidruro sódico) durante 12 horas, a 4° C, se filtra y se extrae de nuevo durante 1 hora a temperatura ambiente, se vuelve a filtrar y se unen los sobrenadantes. El residuo se lava con agua destilada, y se une el agua de lavado con los sobrenadantes anteriores, constituyendo la *fracción soluble en hidróxido potásico al 4%* (FSK-1).

El residuo procedente del tratamiento anterior se suspende en 100 mL de hidróxido potásico al 24% (20 mM en borohidruro sódico) durante 12 horas a temperatura ambiente, se filtra y se realiza una segunda extracción durante 1 hora, en las mismas condiciones. Tras el lavado, los sobrenadantes se reúnen, constituyendo la *fracción soluble en hidróxido potásico al 24%* (FSK-2).

El sólido resultante del fraccionamiento se lava repetidamente con agua destilada hasta que el filtrado sea neutro. Posteriormente se liofiliza, en matraz previamente tarado y constituye la *fracción de celulosa* (CEL).

Las fracciones alcalinas (FSC, FSK-1 y FSK-2) se acidifican en baño de hielo, hasta pH 6-7 con lo que precipitan las fracciones hemicelulósicas. Los precipitados se separan por centrifugación (19.000g) y se dializan dos días frente a agua destilada.

## 7. DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE AZÚCARES NEUTROS (ENSAYO DE LA ANTRONA) (Dische, 1962)

### Material

- Baño termostático (Selecta)
- Pipeta y puntas de pipeta para ácidos (Labsystem)
- Lector de microplaca, modelo 450
- Microplacas (Bio-Rad)

### Reactivos

- Antrona (Sigma): disolución al 0,2%, en ácido sulfúrico concentrado.
- Acido sulfúrico concentrado (Panreac)
- Glucosa (Fluka): disolución patrón en agua, de 0,5 mg/mL

### Metodología

Sobre una alícuota de 0,5 mL de muestra se añade 1 mL de solución de antrona, se agita en Vortex y se incuba en baño de agua a 80°C, durante 5 minutos. Se deja enfriar y se mide la absorbancia a 630 nm.

Para la determinación cuantitativa, se construye una línea de calibrado con una disolución patrón de glucosa, en un rango entre 5 y 50 µg.

## **8. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS (ENSAYO DEL m-HIDROXIBIFENILO) (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).**

### **Material**

- Baño termostático (Selecta)
- Pipeta y puntas de pipeta para ácidos (Labsystem)
- Lector de microplaca modelo 450
- Microplacas (Bio-Rad)

### **Reactivos**

- Hidróxido sódico (Panreac)
- Meta-hidroxibifenilo (Fluka): disolución al 0,15%, en NaOH 0,5%
- Acido sulfúrico concentrado (Panreac)
- Tetraborato sódico (Fluka): disolución 0,0125 M, en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado

### **Metodología**

Se toma una alícuota de 200  $\mu$ L de la muestra, se añaden 1,2 mL de la solución ácido sulfúrico/tetraborato sódico, se agita en Vortex y se calienta en baño termostático a 100°C, durante 5 minutos. Se deja enfriar y se añaden 20  $\mu$ L de NaOH 0,5N. Se construye una línea de calibrado a partir de una disolución acuosa de ácido galacturónico, en un rango entre 5 y 30  $\mu$ g.

## **9. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN GLICOSÍDICA: CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES CELULÓSICOS Y NO CELULÓSICOS**

Para conocer los monosacáridos constituyentes de oligo y polisacáridos es

necesario romper el enlace glicosídico. Para ello el procedimiento más común es la hidrólisis, que generalmente se realiza en medio ácido. Una vez liberados los azúcares, se convierten en derivados volátiles y se cuantifican por medios cromatográficos.

Se ha comprobado que el uso de ácido trifluoracético (TFA) 2 M, a 120°C, durante 1 hora, origina hidrólisis cuantitativa de los polisacáridos neutros no celulósicos (York et al., 1986; Fry, 1988) y su alta volatilidad, que permite eliminarlo fácilmente, lo convierte en un sistema de hidrólisis ampliamente utilizado.

Para la liberación cuantitativa de glucosa, a partir de celulosa, se requiere un tratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 %, durante 2 ó 3 horas para que su hidrólisis sea completa (Saeman et al., 1954; Fry, 1988; Selvendran y Ryden, 1990).

El sistema más usado para la cuantificación de azúcares neutros es su conversión en acetatos de alditoles, que por cromatografía gaseosa da un solo pico para cada azúcar (Englyst y Cumming, 1984). Esta reacción de derivación se basa en una reducción secuencial y una acetilación de los azúcares monoméricos.

### **Material**

- Tubos de vidrio de tapón roscado (Pyrex)
- Placa calefactora (Tembloc, Selecta)
- Centrífuga (Sorvall, RT 6000 D)
- Cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 Serie II)
- Detector selectivo de masas (Hewlett Packard 5972)

### **Reactivos**

- Ácido trifluoracético (Sigma)
- Ácido sulfúrico concentrado (Merck)

- Inositol (Sigma)
- Metanol (Panreac)
- Hidróxido amónico (Panreac)
- Borohidruro sódico (Merck)
- Ácido acético glacial (Panreac)
- Anhídrido acético (Fluka)
- Metilimidazol (Sigma)
- Diclorometano (Merck)

### **Metodología**

Hidrólisis de las fracciones que no contienen celulosa: se pesan 100  $\mu\text{g}$  de la fracción a estudiar, en tubos con tapón roscado, y se añaden 250  $\mu\text{L}$  de TFA 2 N (al que se le ha adicionado previamente 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de inositol). Se cierran bien los tubos, para evitar pérdidas por evaporación, y se colocan en bloque calefactor a 121°C, durante 1 hora. Seguidamente se evapora el ácido en corriente de aire y se eliminan los restos lavando 3 veces con metanol.

Hidrólisis de las fracciones que contienen azúcares celulósicos: se pesan alrededor de 5 mg de la correspondiente fracción, en tubos de tapón roscado, y se añaden 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 72 %. Se colocan en bloque calefactor, 2 horas a 40°C, y se adicionan 5,5 mL de agua destilada, manteniéndose a 100°C, durante 2 horas. Se toman 0,2 mL del hidrolizado y se le añaden 0,2 mL de inositol en agua (concentración de 1 mg/mL).

Determinación por cromatografía gaseosa: a los hidrolizados anteriores se le añaden 200  $\mu\text{L}$  de hidróxido amónico y 200  $\mu\text{L}$  de borohidruro sódico (10 mg/mL) en  $\text{NH}_4\text{OH}$  1N y se mantienen en tubo cerrado durante 1 hora a temperatura ambiente. Se destruye el exceso de reactivo con ácido acético glacial, hasta que cese el desprendimiento de burbujas y se evapora a sequedad en corriente de aire. Los restos de borohidruro sódico y ácido acético se eliminan añadiendo 3 x 0,5 mL de

metanol-acético 9:1 y evaporando a sequedad en baño y corriente de aire. A continuación se trata tres veces con metanol y se evapora en corriente de aire. A cada tubo se añaden 600  $\mu\text{L}$  de anhídrido acético y 120  $\mu\text{L}$  de metilimidazol, que actúa como catalizador. Al cabo de 10 minutos se añaden 2 mL de diclorometano y 5 mL de agua, se agita y se centrifuga a 1000 g, durante 5 minutos. La fase acuosa se desecha y a la de diclorometano se añaden 2 x 5 mL de agua, agitando y centrifugando en las mismas condiciones. Los acetatos de alditol disueltos en la fase orgánica se inyectan directamente en el cromatógrafo.

**Condiciones cromatográficas:** la separación de los acetatos de alditol se realiza en columna capilar de sílice fundida, de 30 cm de largo y 0,25 mm de diámetro interno. La fase líquida es SPTM 2330 (Supelco). Como gas portador se ha empleado helio, con un flujo de 1 mL/min, y este mismo gas, a una relación de 60 mL/min, ha sido utilizado como gas auxiliar.

El flujo de hidrógeno ha sido 6 mL/min. La temperatura del bloque de inyección 250°C, la del detector 300°C y la de la columna 250°C. Se han inyectado 1,5  $\mu\text{L}$  de cada muestra. El horno trabaja con una programación de temperaturas de 200°C a 240°C, a razón de 4°C/min, manteniéndose a esta temperatura final 10 minutos y siendo el tiempo de equilibrio de 3 minutos.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## 1. FÓRMULAS DE ALIÑO Y RELACIÓN DE COMPONENTES FUNDAMENTALES.

Son muchas las formulaciones que se emplean para el aliño de aceitunas, ya que al tratarse de una elaboración fundamentalmente artesanal varían según regiones y costumbres, sin que exista homogeneidad en cuanto a tipo y cantidad de componentes.

En este estudio, se ha seguido como sistema para seleccionar los componentes más fundamentales para la formulación de un aliño, el considerar todos aquellos que aparecen un mayor número de veces en las fórmulas recopiladas. En total, se han conseguido reunir 43 diferentes (Borbolla et al. 1972 ; March y Ríos, 1989), en las que los ingredientes o condimentos usados, que aparecen en mayor número, corresponden en orden decreciente a ajo, tomillo, naranja amarga, limón, pimiento verde, pimentón, orégano, laurel, hinojo, comino, guindilla, pimiento morrón, clavo, culantro y pimienta.

De entre ellos se pueden establecer como componentes fundamentales los ocho primeros, por ser los que se encuentran con más frecuencia en las formulaciones:

<u>Condimento</u>	<u>Nº de veces que aparecen en las 43 fórmulas de aliño</u>
Ajo	30
Tomillo	29
Limón o naranja	28
Laurel	22
Hinojo	17
Orégano	15

Pimentón	12
Pimiento morrón	4

En muchos casos, también se emplea ácido acético como acidulante, añadido en forma de vinagre, característico fundamentalmente en las aceitunas aliñadas y que es un importante agente de conservación de estos productos. El vinagre, además de suministrarles un sabor y olor característico facilita, gracias a su contenido en ácido acético, una actividad antiséptica mayor que la del ácido láctico. Al parecer, el poder bacteriostático, más que bactericida del ácido acético, no es directamente dependiente del pH, sino de la molécula no ionizada, forma en la que se suele encontrar en los aliños, debido a los bajos pH que normalmente existen.

## **2. TIPOS DE ACEITUNAS Y FORMAS DE PREPARACIÓN: FÓRMULA DE ALIÑO "TIPO" UTILIZADA.**

Los tipos de aceitunas utilizadas para el desarrollo de este trabajo han sido:

- Aceitunas verdes, deshuesadas y endulzadas mediante sucesivos lavados de agua.
- Aceitunas color cambiante (frutos que muestran signos de coloración púrpura), deshuesadas y conservadas en salmuera.
- Aceitunas moradas (frutos con la piel totalmente morada y con la pulpa blanca) deshuesadas y conservadas en salmuera.

A los frutos color cambiante y morado se le ha adicionado salmuera del 2%, elevando paulatinamente esta concentración hasta el 6%, conservándose hasta 6 meses. Además se ha añadido ácido acético (solución al 0,4%), con objeto de corregir el valor del pH inicial a 4,0-4,5 unidades y evitar así el desarrollo de posibles microorganismos indeseables. Esta salmuera de conservación permite

experimentar una fermentación más o menos completa, por levaduras y/o bacterias lácticas. También, al tratarse de estados de maduración algo más avanzados que las verdes, la conservación se ha realizado bajo aireación (0,3 litro/hora/litro de capacidad, en discontinuo, durante 8 h al día) para evitar la aparición de posibles problemas de alambrado (Brenes et al. 1987 )

Las aceitunas se han deshuesado, con objeto de que se dé un perfecto contacto exterior e interior de la pulpa con la salmuera y se produzca más rápidamente el equilibrado de la misma. Posteriormente, se han envasado con una salmuera en la que se emplea como acidulante ácido acético (en forma de vinagre) y se le añaden los correspondientes productos saporíferos o aromatizantes naturales.

Para este estudio se ha elegido una fórmula de aliño "tipo" de entre las 43 mencionadas, que contiene seis de los ocho ingredientes reseñados que se repiten con mayor frecuencia y, además, comino. En la mayoría de las formulaciones existentes no se especifican las proporciones de algunos de sus ingredientes, o se hace de una forma poco concreta; por ejemplo, "tres cucharaditas de ...". No obstante, en la formulación empleada, se han establecido las cantidades por Kg de fruto deshuesado, que se han mantenido a lo largo del estudio y que son los siguientes:

- Ajos 50 g
- Limón 45 g
- Orégano 1,3 g
- Tomillo 0,15 g
- Laurel 0,20 g
- Comino 0,03 g
- Hinojo 0,1 g
- Sal 4%
- Vinagre de 5° (58 mL por litro de salmuera)

Algunos ingredientes figuran en pequeña proporción, lo que no excluye la

posibilidad de que cualquiera de ellos solos, o en combinación con los restantes, tenga su importancia, sobre todo por aportar el olor penetrante de las especias.

Se ha prestado atención especial al ajo y al limón porque, además de figurar los primeros por el número de veces que aparecen en las formulaciones de aceitunas aliñadas, se encuentran en cantidades más apreciables que el resto.

### **3. INFLUENCIA DE LOS ALIÑOS NATURALES SOBRE LA TEXTURA DURANTE LA CONSERVACIÓN DE LAS ACEITUNAS.**

Se han planteado experiencias con aceitunas de la variedad Hojiblanca en los tres estados de maduración indicados: verde, color cambiante y morada.

#### **3.1. Aceitunas verdes (deshuesadas, endulzadas con cambios periódicos de agua)**

*El objetivo de esta experiencia es determinar si en fruto verde existen cambios de textura y su posible causa.*

Se han utilizado aceitunas verdes maduras, clasificadas para tener homogeneidad de tamaño y, después de lavadas, han sido deshuesadas.

La eliminación del glucósido amargo oleuropeina, también llamado en términos populares "endulzado", se ha realizado cubriendo las aceitunas con agua, con cambios diarios de la misma, durante 8 días. Transcurrido este tiempo, se ha adicionado el correspondiente aliño "tipo", y se han mantenido durante 10 días antes de iniciar la experiencia de conservación.

La salmuera de los frutos aliñados, ya equilibrada, dió los siguientes resultados analíticos:

<u>pH</u>	<u>Acidez libre</u>	<u>Acidez combinada</u>	<u>%NaCl</u>
3.89	0.46	21.00	2.3

A continuación los frutos se han distribuido de la siguiente forma:

- En diez frascos de 1/2 galón, que se han conservado en cámara a 30°C, para acelerar los posibles procesos de alteración.
- En dos frascos de 1/2 galón, conservados a 5°C, con objeto de ver el efecto de una baja temperatura sobre la conservación.

Se han mantenido hasta 9 meses, tomando muestras a los 3, 5, 6 y 9 meses.

En la tabla 1 se recogen los resultados de textura y en la tabla 2 su correspondiente análisis químico. Se ve claramente que no existen cambios en textura durante los 3 primeros meses de conservación, ni a 30°C ni a 5°C. Entre los primeros frascos existen cuatro (1, 2, 5, 6) en los que su análisis químico refleja bajadas de pH respecto al inicial (3,89) entre 3,39 y 3,57 y subidas de acidez libre respecto al mismo (0,46) entre 0,74 y 0,80, lo que podría sugerir la presencia de microorganismos pero, no obstante, no hay cambios de textura.

Avanzando en el tiempo, al tomar muestras a los 5 meses se comprueba que la textura ha sufrido un notable descenso, especialmente en las conservadas a 30°C, disminución que se continúa en éstas de forma acusada en los meses sucesivos, no existiendo diferencias significativas entre frascos. A 5°C, tras esta bajada inicial, la textura permanece prácticamente constante con el tiempo. Por tanto, a partir de aquí aparecen diferencias significativas con las de 30°C.

A la vista de estos resultados y después de analizar los cambios de pH, acidez

Frascos	Tiempo de conservación			
	3 meses	5 meses	6 meses	9 meses
1-30°C	99.1 aA	68.1 bABC	56.9 cA	31.84 dA
2-30°C	95.6 aA	78.1 bC	61.9 cA	29.99 dA
3-30°C	109.5 aA	80.7 bCD	59.6 cA	33.52 dA
4-30°C	107.2 aA	77.9 bCD	55.1 cA	32.34 dA
5-30°C	120.1 aA	54.6 bA	54.1 cA	--
6-30°C	119.0 aA	74.7 bBC	63.3 cA	41.07 dA
7-30°C	121.6 aA	70.6 bBC	63.7 cA	42.09 dA
8-30°C	117.4 aA	75.6 bC	63.8 cA	39.12 dA
9-30°C	106.6 aA	79.3 bCD	62.3 cA	38.78 dA
10-30°C	117.1 aA	59.6 bAB	57.7 cA	39.85 dA
1-5°C	119.3 aA	91.1 bD	93.1 cB	92.60 dB
2-5°C	130.1 aA	94.3 bD	90.6 cB	87.80 dB

**Tabla 1. Valores de textura (N/g), en aceitunas verdes aliñadas.**

\* Valores de textura con la misma letra minúscula no son diferentes significativamente con el tiempo, según el test de ANOVA ( $p=0,05$ )

\* Valores de textura con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente para un mismo período de tiempo, según el test de ANOVA ( $P=0,05$ )

Tiempo de conservación												
Frascos	3 meses			5 meses			6 meses			9 meses		
	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C
1-30°C	3.57	0.75	22.5	3.28	0.95	21.8	3.24	0.92	22.0	3.16	0.90	19.0
2-30°C	3.39	0.75	22.6	3.29	0.92	21.0	3.21	0.91	18.6	3.15	0.89	16.4
3-30°C	3.89	0.47	20.8	3.29	0.72	18.1	3.23	0.69	16.4	3.16	0.67	15.9
4-30°C	3.88	0.51	22.5	3.24	0.84	18.3	3.18	0.88	17.7	3.11	0.82	17.0
5-30°C	3.54	0.74	22.6	3.31	0.88	19.4	3.22	0.88	17.9	3.14	0.88	16.7
6-30°C	3.50	0.80	22.8	3.29	0.92	23.1	3.24	0.66	17.2	3.17	0.68	16.9
7-30°C	3.76	0.52	18.6	3.31	0.81	20.3	3.24	0.77	17.7	---	---	---
8-30°C	3.84	0.49	19.9	3.22	0.88	18.5	3.19	0.86	16.7	---	---	---
9-30°C	3.79	0.50	18.1	3.26	0.83	18.3	3.22	0.80	16.5	3.13	0.77	14.1
10-30°C	3.89	0.52	22.8	3.24	0.92	20.5	3.21	0.88	18.5	3.14	0.88	16.2
1-5°C	3.94	0.47	23.4	3.76	0.52	20.24	3.70	0.52	18.5	3.73	0.43	16.3
2-5°C	3.95	0.49	21.8	3.70	0.54	19.2	3.65	0.48	16.6	3.65	0.52	15.8

**Tabla 2. Análisis químico correspondiente a "aceitunas verdes aliñadas"**

Ac.L: Acidez libre (gramos de ácido láctico/100mL de salmuera)

Ac.C: Acidez combinada (mequivalentes/litro de ácido clorhídrico consumido en la valoración de las sales orgánicas liberadas)

libre y acidez combinada (tabla 2), se podría pensar que los enzimas responsables de estos cambios de textura, podrían proceder en parte del desarrollo de microorganismos, ya que coincide este brusco descenso de la textura del tercero al quinto mes con una gran subida de la acidez libre y descenso del pH. Sin embargo, existen una serie de razones que no apoyan el hecho de que realmente sean mayoritariamente de microorganismos y que son las siguientes:

a) La textura va disminuyendo con el tiempo de conservación de forma acusada a 30°C, llegando hasta un 65% de la inicial, a los 9 meses, siendo las bajadas más pronunciadas desde el tercero al quinto mes, y del sexto al noveno mes, mientras que ni el pH ni la acidez libre cambian prácticamente a partir de los cinco meses.

b) En los frascos almacenados a 5°C se produce, a los 5 meses, un descenso de textura de 20% aproximadamente, que resulta bastante pronunciado y con poca diferencia respecto a las conservadas a 30°C (alrededor de un 35%) e incluso no existen diferencias significativas entre algunos de los frascos de 30°C y 5°C, pese a que la acidez y el pH son muy distintos entre sí.

c) Entre los frascos conservados a 30°C durante 5 meses, no existen diferencias significativas de textura (excepto en el frasco 5) a pesar de que, como ya se comentó al principio, el pH baja y la acidez libre sube de forma distinta en algunos de los frascos (tabla 2). En los frascos 1, 2, 5 y 6, el pH medio desciende desde 3,50 hasta 3,26 (0,24 unidades) y la acidez libre media se eleva desde 0,76 a 0,87 (0,11 unidades); en el resto de los frascos el pH medio varía desde 3,84 a 3,26 (0,58 unidades, el doble que el lote anterior) y la acidez sube desde 0,50 a 0,87 (0,37 unidades). A pesar de ello la textura disminuye casi por igual en todos los frascos.

Como resumen de la experiencia en aceitunas verdes, resulta un hecho claramente definido: a partir de cinco meses hay disminución de textura, con

diferencias significativas entre 30 y 5°C. Los factores que pueden estar influyendo pueden ser: a) la presencia de microorganismos productores de enzimas; b) la presencia de enzimas endógenos, del propio fruto y/o de los componentes de los aliños. Los datos reseñados no apoyan, en principio, que sean microorganismos productores de ácido láctico. Respecto a los enzimas endógenos del fruto pueden existir con toda probabilidad, ya que está comprobada su existencia en aceitunas (Fernández-Bolaños et al., 1955).

### 3.2 Aceitunas color cambiante y moradas (conservadas en salmuera)

*El planteamiento de esta experiencia, a la vista de los resultados alcanzados en 3.1, comprende los siguientes puntos:*

- a) Esclarecer la posible influencia de microorganismos: para ello se verá el curso de la conservación con y sin la adición de un antiséptico fuerte (mertiolato).*
- b) Estudiar la influencia del estado de madurez del fruto: se ensayarán dos estados de madurez, color cambiante y morado*
- c) Establecer la posible influencia de los componentes de los aliños.*

Los frutos en estudio están previamente conservados en salmuera. Sus características químicas en el fermentador, antes de ser deshuesados y clasificados por el tamaño y color son:

<u>pH</u>	<u>Acidez libre</u>	<u>Acidez combinada</u>	<u>%NaCl</u>
4,44	0,42	58,88	4,52

Estas aceitunas, al estar en contacto con salmuera, han experimentado una cierta fermentación, lo que implica una menor disponibilidad de materia fermentable y un medio más desfavorable para el desarrollo microbiano. A pesar de todo, se utilizarán algunos frascos a los cuales se les adiciona un antiséptico fuerte, como el mertiolato, para evitar el desarrollo de microorganismos.

También se utilizan algunos frascos control, a los cuales no se les adicionan los componentes de los aliños, sino únicamente una salmuera acidificada con vinagre, al igual que el resto.

Los frutos, una vez clasificados, (separando color cambiante y morados) se aliñan según la misma fórmula tipo ya comentada y, para que estén distribuidos de una forma homogénea, se han realizado pesadas individuales para cada frasco de 1/2 galón, con un volumen total de 1700 mL de salmuera y 1Kg de aceitunas deshuesadas.

En total, y para cada estado de madurez, se han preparado:

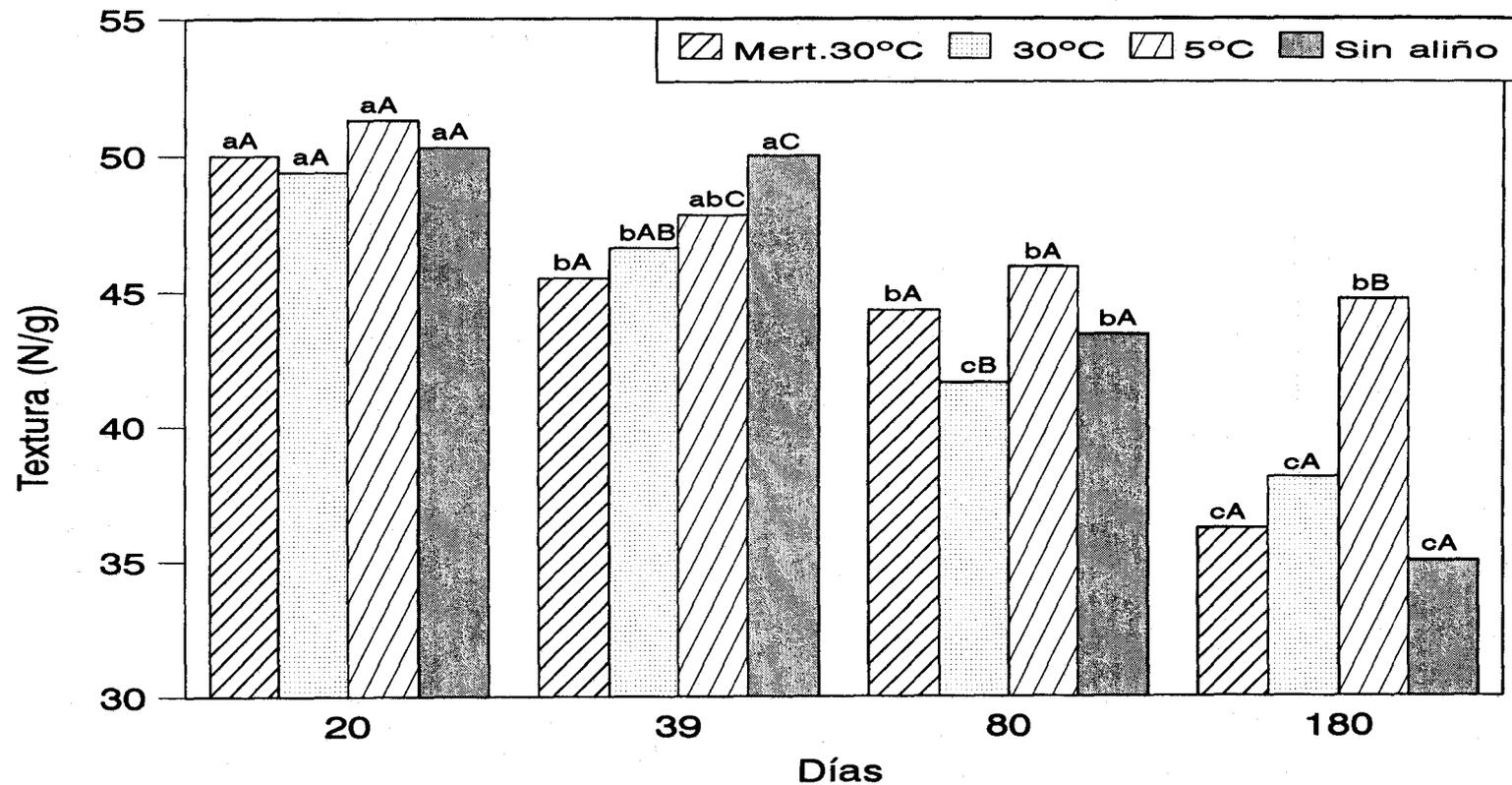
- 2 frascos conservados a 30°C, con mertiolato (0,05%)
- 2 frascos conservados a 30°C, sin mertiolato
- 2 frascos conservados a 5°C
- 2 frascos sin aliño

Al tratarse de aceitunas más maduras se han acortado los períodos de toma de muestra a 22, 36, 80 y 180 días.

En la presentación de resultados aparecen los valores medios de las determinaciones de textura y de los análisis realizados, ya que existe muy poca diferencia en los replicados.

### **3.2.1. Aceitunas color cambiante**

En la fig. 5 se recogen los resultados sobre los cambios en la textura. Durante los primeros 20 días se mantiene sin afectarse en todos los casos, es decir, con y sin aliño, con y sin mertiolato e incubados a 30°C y 5°C, según la experiencia planteada en 3.2; pero a los 39 días de conservación, mientras que los frascos sin aliño mantienen su textura inicial, los que lo contienen comienzan a afectarse sin existir



**Fig. 5. Evolución de la textura en aceitunas color cambiante aliñadas**

\* Textura inicial: 50,3 N/g

\* Valores de textura con la misma letra minúscula no son diferentes significativamente con el tiempo, según el test de ANOVA ( $P=0,05$ ).

Valores de textura con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente para un mismo período de tiempo, según el test de ANOVA ( $P=0,05$ ).

diferencias significativas entre llevar o no mertiolato.

En las muestras tomadas a los 80 y 180 días de conservación se observa que la textura continúa disminuyendo, siendo ese descenso muy suave en las aceitunas almacenadas a 5°C, como ya sucedía en la experiencia anterior, y continúan sin existir diferencias entre utilizar o no mertiolato bajando, con respecto a la textura inicial, un 28% a los 180 días (6 meses) para las conservadas a 30°C. Las aceitunas envasadas sin aliño experimenta una gran disminución de textura a los 80 días que continúa hasta los 180 días.

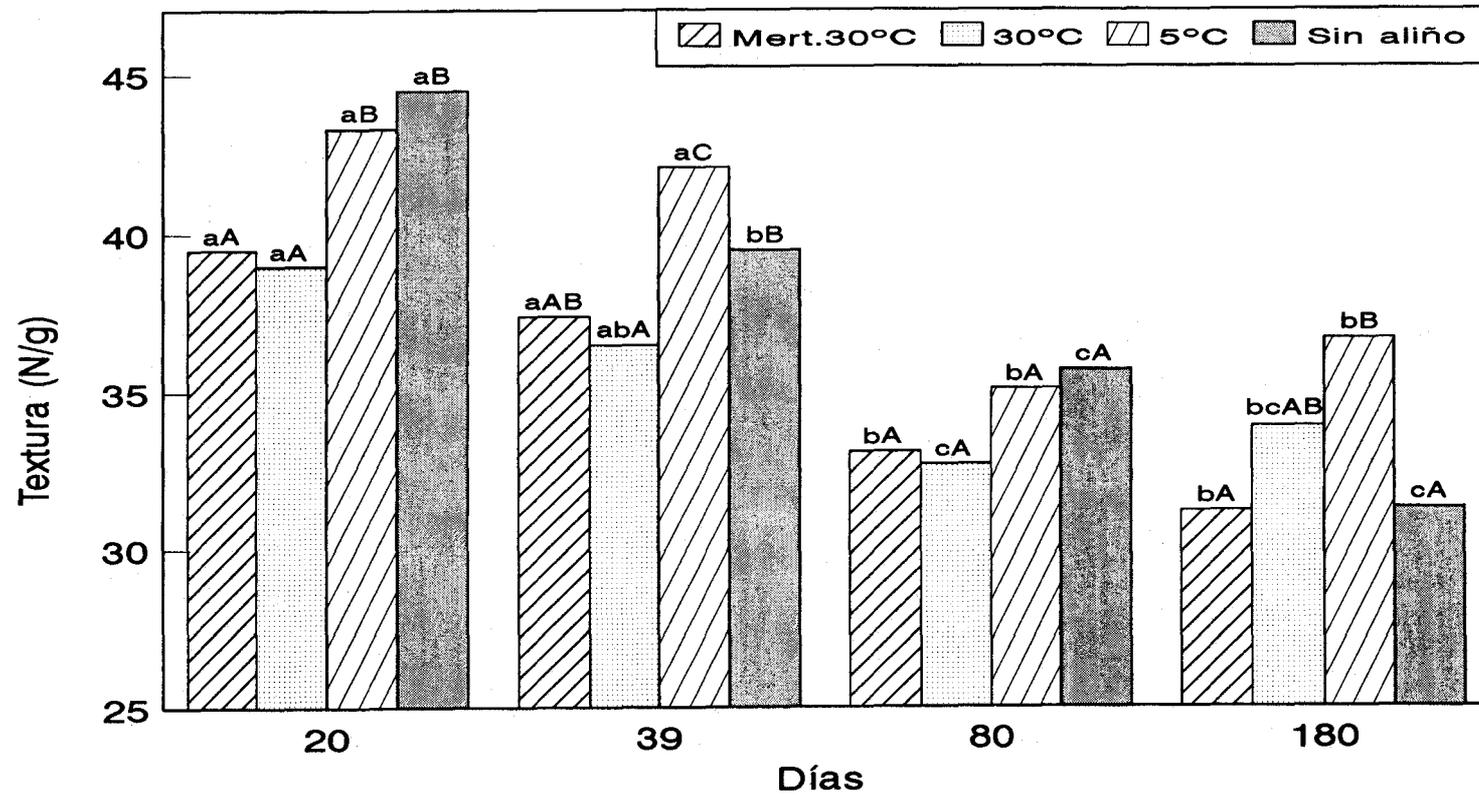
De todo lo reseñado se concluye que el mertiolato no influye a efectos de textura y que esta está influenciada por los enzimas de los aliños y por los propios del fruto ya que son conocidos en la aceituna, en fruto color cambiante, la existencia de enzimas endógenos (glicosidasas), así como una serie de asociados a la pared (celulasas, poligalacturonasas y glicosidasas)(Heredia et al. 1992, Fernández-Bolaños et al.,1995).

*Como resumen de este estudio se puede indicar:*

- a) Las aceitunas color cambiante, con y sin mertiolato, mantienen textura análoga, hecho que indica que no hay acción de microorganismos.*
- b) Con y sin aliño, no hay diferencia a los 20 días. Después, la presencia de aliño determina cambios de textura respecto a los que no lo tienen.*

### **3.2.2. Aceitunas moradas**

A diferencia de lo que ocurre con las aceitunas color cambiante, en las moradas hay disminución de textura a los 20 días en las conservadas a 30°C, con y sin mertiolato, existiendo diferencias significativas con las muestra sin aliño y con las almacenadas a 5°C ( Fig. 6 ).



**Fig. 6. Evolución de la textura en aceitunas moradas aliñadas**

\* Textura inicial: 44,1 N/g

\* Valores de textura con la misma letra minúscula no son diferentes significativamente con el tiempo, según el test de ANOVA (P=0,05).

Valores de textura con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente para un mismo período de tiempo, según el test de ANOVA (P=0,05).

A los 39 días de conservación la textura a 30°C sigue disminuyendo, siendo la bajada algo más acusada a los 80 días, con un 25% respecto a la inicial, y a partir de aquí se mantiene prácticamente con idénticos valores a los 180 días, sin existir diferencias en los frascos con y sin mertiolato, lo que muestra la evidencia de que los componentes de los aliños están afectando a la textura del fruto. Las aceitunas que han sido envasadas sin aliño, siguen una evolución con el tiempo similar a los de color cambiante, aunque en estas últimas la disminución comienza a los 39 días de almacenamiento.

La experiencia refleja que, al igual que en color cambiante, no existe diferencia de textura por efecto del mertiolato.

En definitiva, se puede resumir *que se reproducen las conclusiones indicadas en color cambiante, con la diferencia de que se acelera el proceso.*

### **3.2.3. Análisis químico.**

En las tablas 3 y 4 aparecen los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del pH, acidez libre y acidez combinada, para color cambiante y morada, respectivamente.

En las aceitunas envasadas sin aliño, se observa que el comportamiento para ambos tipos es idéntico, bajando el pH muy suavemente desde 4,0 a los 20 días de conservación hasta 3,70 a los 180 días, sin que la acidez libre cambie. El descenso de pH se explica por la disminución de la acidez combinada, disminuyendo su efecto tampón por la dilución de la salmuera. Por lo tanto, en estas aceitunas envasadas sin aliño parece que los enzimas responsables de los cambios de textura son los endógenos del propio fruto.

En una experiencia posterior, que se comentará más adelante (Apartado 5),

Frascos*	Tiempo de conservación											
	20 días			39 días			80 días			180 días		
	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C
30°C-M	4.04	0.49	35.7	3.91	0.50	29.4	3.79	0.50	25.5	3.76	0.52	23.7
30°C	4.00	0.53	35.5	3.98	0.55	29.3	3.77	0.51	23.7	3.72	0.46	22.0
5°C	3.98	0.49	35.2	3.97	0.49	29.2	3.92	0.49	27.8	3.93	0.58	26.2
Sin Aliño	4.01	0.49	27.5	3.81	0.48	20.8	3.69	0.49	19.8	3.70	0.49	17.2

**Tabla 3. Análisis químico correspondiente a "aceitunas color cambiante aliñadas"**

\*Valores promedios correspondientes a las determinaciones de dos frascos.

Ac.L: Acidez libre ( gr de ácido láctico / 100mL de salmuera)

Ac.C: Acidez combinada ( mequivalentes/ litro de ácido clorhídrico consumidos en la valoración de las sales orgánicas liberadas)

Frascos*	Tiempo de conservación											
	20 días			39 días			80 días			180 días		
	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C	pH	Ac.L	Ac.C
30°C-M	3.90	0.53	34.1	3.84	0.55	28.8	3.84	0.52	28.4	3.71	0.54	24.7
30°C	3.94	0.60	34.1	3.86	0.57	29.9	3.82	0.50	27.2	3.68	0.64	23.4
5°C	3.96	0.56	33.2	---	---	---	3.83	0.52	25.6	3.85	0.57	22.3
Sin aliño	3.96	0.47	25.4	3.85	0.49	22.6	3.69	0.49	19.15	3.68	0.53	18.9

**Tabla 4. Análisis químico correspondiente a "aceitunas moradas aliñadas"**

\* Valores promedios correspondientes a las determinaciones de dos frascos.

Ac.L: Acidez libre (gr de ácido láctico/100 mL de salmuera)

Ac.C: Acidez combinada (mequivalentes /litro de ácido clorhídrico consumido en la valoración de las sales orgánicas liberadas)

se confirma que la evolución de la textura y de los análisis químicos se reproducen casi de forma idéntica utilizando las mismas aceitunas maduras conservadas en salmuera y envasadas sin aliño, con un desfase de 2 meses, lo cual muestra que los enzimas endógenos de las aceitunas son los responsables de los cambios de textura.

Para el resto de frascos envasados con el aliño, a 30°C o a 5°C, la evolución de los parámetros químicos es muy parecida a la que no contienen aliño. Su mayor diferencia es el valor más elevado de acidez combinada, más alta en el caso de envasar con el aliño, debido sin duda, al aporte de los de las sales orgánicas presentes en estos ingredientes (ajo, limón etc) y que van a ayudar al efecto tampón, con lo cual la evolución del pH con el tiempo, sin cambios en acidez libre, es más suave que en los frascos sin aliño.

A la vista de estos parámetros, se puede decir que uno de los principales responsables de los cambios de textura son los enzimas procedentes de los componentes de los aliños (ajo, limón, etc) capaces de solubilizarse en el medio y actuar sobre las aceitunas.

### **3.3 Influencia del estado de maduración**

Si comparamos los valores de textura con el estado de maduración en las tres experiencias realizadas (tabla 1 y figuras 5 y 6), se observa que la textura inicial en aceitunas verdes es casi el doble de la de color cambiante y ésta, a su vez, algo superior a la de las moradas. También se comprueba que en estas últimas la textura sufre una disminución de un 25% respecto a la inicial a los 2,5 meses de conservación para mantenerse hasta los 6 meses, prácticamente constante, mientras que en las verdes, no ocurre una disminución análoga hasta los 5 meses, para ir posteriormente disminuyendo hasta alcanzar, a los 9 meses, valores de textura similares a los otros dos estados de maduración a los 6 meses. Todo ello indica que los enzimas responsables de estas pérdidas de textura, actúan en todos los estados de

maduración, diferenciándose sólo en el tiempo. Cuando el grado de maduración del fruto es mayor, la influencia de los enzimas, sobre la textura se aprecia mucho antes.

*Como conclusión, las causas de esta mayor facilidad de cambio de textura se explican:*

- a) por el mayor aporte de enzimas endógenos*
- b) por el aporte de los enzimas de los aliños*
- c) porque la pared está cambiando, facilitando su accesibilidad a los enzimas.*

*Al ser más avanzado el estado de maduración, la pared celular es más susceptible a la acción enzimática. Es un hecho totalmente comprobado por nuestro Grupo de investigación que a medida que avanza la maduración de la aceituna, hay una disminución de peso molecular en polisacáridos, lo que determina una más fácil accesibilidad.*

#### **4. ESTUDIO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.**

En este apartado se estudian los enzimas hidrolíticos presentes en los principales constituyentes de los aliños empleados (ajo, limón) que pueden ser responsables de los cambios de textura del fruto. Basados en la amplia experiencia que existe en el Instituto de la Grasa sobre la acción de estos enzimas en aceitunas (Castillo et al.1978, Heredia et al. 1992,1993) se han estudiado celulasas, poligalacturonasas y glicosidasas.

#### **4.1 Condiciones óptimas para las medidas de celulasas, poligalacturonasas y glicosidasas.**

La actividad enzimática está condicionada por diferentes factores, tales como, pH, temperatura, tiempo de actuación, concentración de sustrato, etc. Por ello, resulta primordial conocer cuales son las condiciones óptimas para el desarrollo de las reacciones catalizadas por los enzimas que se desean estudiar.

Las medidas de las actividades, tanto de celulasas como PGasas, se han realizado por métodos viscosimétricos, utilizándose como sustrato un derivado soluble de celulosa, la carboximetilcelulosa (CMC) para la celulasa y la pectina de limón para la PGasa.

Aunque en los ensayos se han seguido las condiciones previamente establecidas para los enzimas de aceitunas (Heredia et al. 1992, Fernández-Bolaños et al. 1995) y que se recogen en el apartado de Materiales y Métodos, para determinar cuál es la concentración de sustrato más adecuada para las medidas de actividad, se han realizado ensayos con cantidades crecientes de sustrato utilizando un extracto de ajo como fuente de enzima.

Para que se cumpla la ecuación de Michaelis-Menten, la relación entre viscosidad intrínseca  $[\eta]^{-3,66}$  y tiempo de incubación debe ser lineal y la pendiente de la recta tiene que disminuir a medida que aumenta la concentración de sustrato.

Para las celulasas (Fig. 7) , se comprueba que existe linealidad a partir de 2 y hasta 24 horas de incubación, para todas las concentraciones de sustrato ensayadas. Sin embargo, la segunda condición de la ecuación de Michaelis-Menten sólo se cumple concentraciones de CMC entre 0,65 y 0,75%.

Esto mismo se comprueba si se expresa la actividad en Unidades de actividad

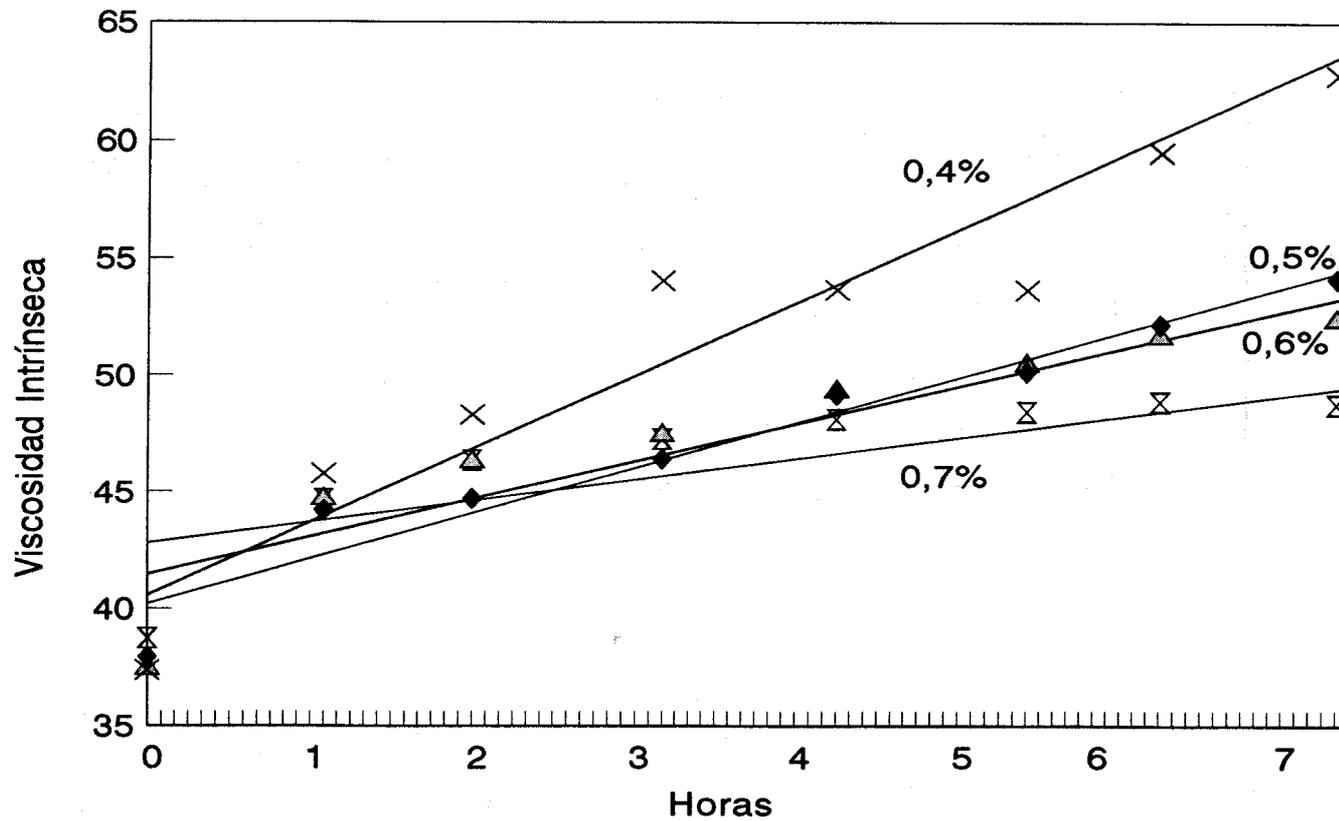


Fig. 7. Actividad de poligalacturonasa de ajo expresada como viscosidad intrínseca  $\eta^{-3,66}$ , en función del tiempo

relativa (B) por hora (UB/h) al transformar la viscosidad intrínseca (apartado 5.1. de Materiales y Métodos). Los valores de UB/h aumentan con la concentración de sustrato (Cs) hasta mantenerse constante para concentraciones de 0,65 y 0,75%.

Es por todo ello por lo que se pueden elegir las concentraciones de 0,65 ó 0,75% aunque, con objeto de que el enzima posea sustrato suficiente para poder actuar siempre se elige la más alta, en este caso 0,75%. También se han ensayado algunas concentraciones superiores aunque no resultaron útiles desde el punto de vista práctico.

Para la PGasa (Fig. 8) la relación entre  $[\eta]^{-3,66}$  y el tiempo es lineal par concentraciones de sustrato de 0,4 a 0,7%, desde 1 hora hasta las 7 horas de incubación, disminuyendo la pendiente de la recta a medida que aumenta la concentración de sustrato.

Para las medidas de las actividades de glicosidasas ( $\alpha$ -, y  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -arabinosidasa,  $\beta$ -glucosidasa) se han utilizado las condiciones de pH, concentración de sustrato, etc, previamente establecidas para aceituna (Heredia et al., 1992), habiéndose comprobado que las actividades enzimáticas presentes en las muestras objeto de estudio están dentro de su rango de análisis y existiendo relación lineal entre velocidad de reacción y concentración de enzima, al menos hasta los 30 minutos de incubación. También se ha establecido que las temperaturas óptimas de actuación para la  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa es de 55°C y para la  $\alpha$ -manosidasa y la  $\beta$ -glucosidasa de 40°C.

#### **4.2. Preparación del extracto enzimático a partir de la salmuera que contiene el aliño.**

Teniendo en cuenta la dilución en que se encuentran los enzimas presentes en una salmuera de aceitunas aliñadas, la concentración de dicha salmuera (4% deNaCl)

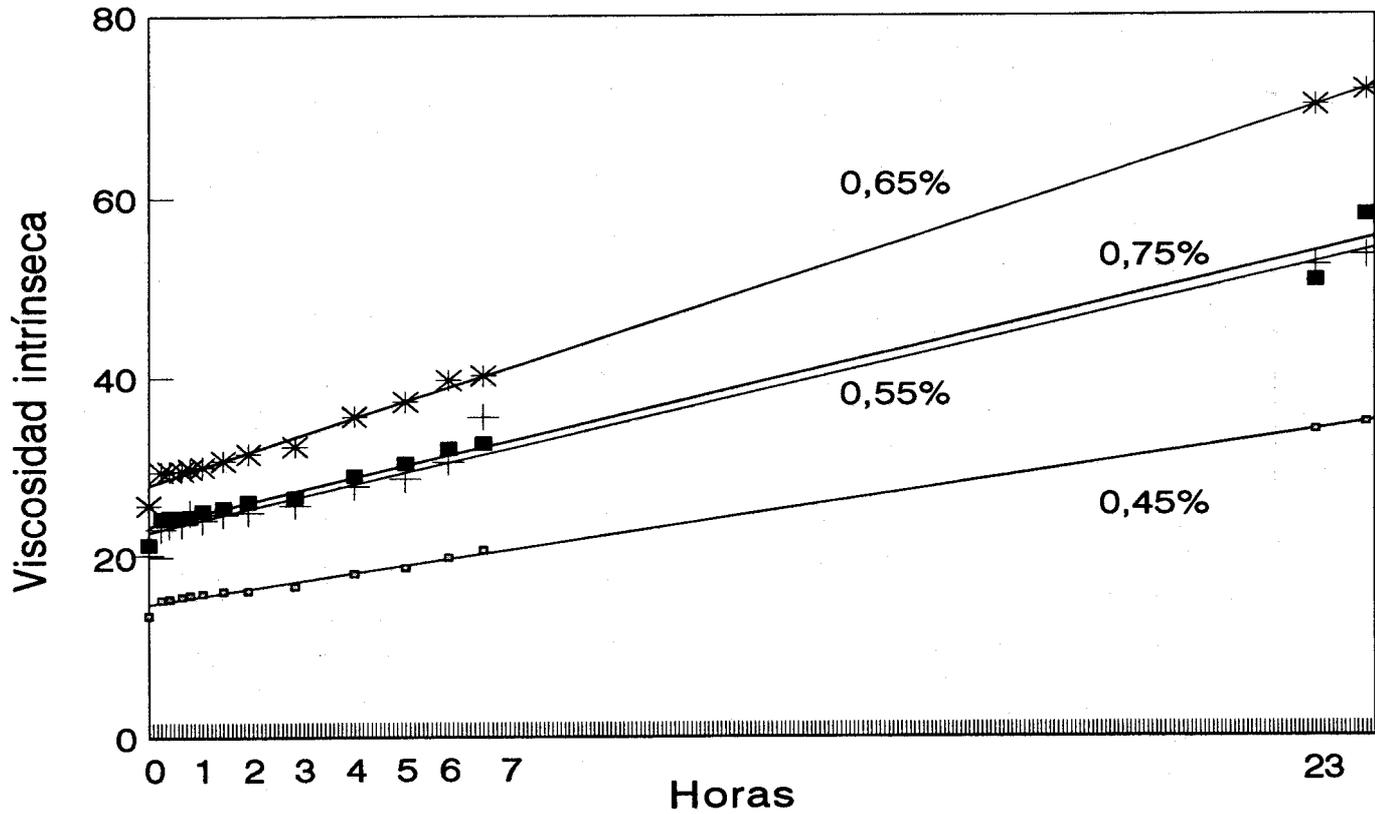


Fig. 8. Actividad de celulasa de ajo expresada como viscosidad intrínseca  $\eta^{-3,66}$ , en función del tiempo

y su elevada acidez, debido al vinagre, ha sido necesario utilizar una técnica que permita, además de concentrar los enzimas, poder trabajar en el tampón adecuado. Por ello, se han empleado los concentradores "Macrosep" que son unos tubos de centrífuga provistos de membranas de ultrafiltración con un corte de peso molecular 10.000, que concentran y desalan en una misma operación de centrifugación, permitiendo que el solvente y moléculas de bajo peso molecular pasen a través de la membrana y las biomoléculas mayores de 10.000 queden retenidas.

Este sistema ha permitido intercambiar el tampón cuantas veces sea necesario y ensayar los enzimas en el tampón que se desee.

#### **4.3. Aporte de los enzimas de ajo y limón a las salmueras.**

*Se va a estudiar la presencia y actuación de los enzimas de los aliños sobre la pared celular y su capacidad para salir al medio y permanecer activas a lo largo de la conservación.*

Para este estudio se han planteado dos experiencias, la primera para ver si realmente salen al medio y la segunda para comprobar su comportamiento con el tiempo.

En una primera experiencia, se han ensayado las actividades de celulasas, PGasas y glicosidasas presentes en los extractos concentrados, obtenidos a partir de las salmueras de dos frascos de 1/2 galón (tras 21 días de conservación), preparados con una salmuera del 4% y 116 mL de vinagre, de 6° de acidez, por frasco, a los que se le añade ajo, limón y el resto de los componentes de la fórmula del aliño, uno de ellos con mertiolato (Frasco 1) y otro sin él (Frasco 2). Las actividades, se han comparado con las de salmueras preparadas de forma idéntica, con (Frasco 3) y sin mertiolato (Frasco 4), pero con la única diferencia de no llevar ajo como componente de los aliños.

Los resultados obtenidos (Tabla 5) indican que para la celulasa y PGasa no existen diferencias entre las actividades encontradas en las salmueras de los frascos con y sin mertiolato. También se observa que las actividades determinadas son semejantes tanto en los extractos con ajo (Fracos 1 y 2) como sin él (Fracos 3 y 4), tras 21 días de conservación a 30°C, lo cual indica que no es el ajo el responsable principal de las actividades y que la mayor parte proviene de otros componentes de los aliños, fundamentalmente el limón.

Otro hecho que apoya definitivamente lo expuesto anteriormente es el siguiente: en las salmueras de aliño se encuentran actividades de 5600 y 15000 UB/50 g de ajo, para celulasas y PGasas, respectivamente; sin embargo en un extracto de ajo las actividades son mucho más bajas: 478 y 8190 para Celulasas y PGasas, respectivamente. Se deduce claramente que la mayor parte de la actividad de celulasa no corresponde al ajo. Respecto a la PGasa, la actividad del extracto sigue siendo igual con ajo como sin él (puede ocurrir que no sean capaces de salir al medio, o que se encuentren inhibidas por las condiciones de pH y sal) y por tanto, la actividad de PGasa tampoco se debe al ajo.

Tras realizar ensayos con sustratos correspondientes a distintos tipos de glicosidasas, sólo se ha detectado actividad de  $\alpha$ -galactosidasa, en los extractos concentrados de salmuera de las distintas preparaciones a los 21 días de conservación. Si se analizan las actividades obtenidas (Tabla5) se observa que las de los frascos 1 y 2 con todos los componentes de los aliños son superiores a los 3 y 4 sin ajo, con lo que se comprueba que casi toda la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa proviene del ajo.

En la segunda experiencia, se ha determinado la actividad de celulasas, PGasas y glicosidasas de forma similar a la anterior, a partir de los extractos concentrados de salmuera pero tomando muestras sucesivas en cortos períodos de tiempo a lo largo de la conservación, con objeto de comprobar su facilidad de salida al medio. Para ello, se han preparado 4 frascos de 1/2 galón, con salmuera al 4%

Componentes de los aliños				
	Ajo-limón	Limón	Ajo triturado	Ajo
1 día	20.6	71.7	35.7	10.6
7 día	49.5	51.7	72.5	38.5
14 días	71.1	83.0	80.1	71.8

**Tabla 5. Actividades de *celulasa* ( unidades de actividad relativa (UB/mL) presentes en la salmuera preparadas con los distintos componentes de los aliños y, su evolución con el tiempo.**

Cada valor representa la media de dos determinaciones. CV:10%

- Frasco 1: 45 g de limón
- Frasco 2: 50 g de ajo troceado
- Frasco 3: 50 g de ajo triturado
- Frasco 4: 50 g de ajo troceado y 45 g de limón

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos, de forma que aparecen las actividades de los tres enzimas ensayados en todos los extractos concentrados, en un mayor o menor grado, desde el primer día de su preparación.

Analizando la evolución de los enzimas con el tiempo en cada uno de los extractos se puede observar:

a) la actividad de **celulasa** (tabla 5) para los frascos con ajo y ajo triturado va aumentando progresivamente desde el primero hasta el día 14, siendo el aumento más brusco durante los siete primeros días. Cuando el ajo está triturado, los enzimas salen al medio rápidamente, mientras que cuando los trozos son mayores encuentran más resistencia llegando, sin embargo al cabo de los 14 días, a no existir prácticamente diferencias entre las actividades de ambas preparaciones. En definitiva, las celulasas salen al medio con más facilidad cuando el ajo está triturado y más lentamente cuando está troceado.

Si se analizan los resultados en los extractos concentrados de ajo-limón y se compara con los del ajo y del limón por separado, se encuentra que ya en el primer día de su preparación aparece en el extracto de limón una actividad 7 veces superior al del ajo y 3,5 veces superior al del ajo-limón, lo cual puede resultar contradictorio, puesto que teóricamente en el extracto ajo-limón debería estar la actividad correspondiente a los enzimas del ajo y a los del limón: pero esto no se cumple tampoco a lo largo del tiempo de conservación. Por lo tanto, debe existir un componente del ajo o del limón con capacidad de inhibir a las celulasas del limón o del ajo, respectivamente.

Planteado de esta forma, y poniéndose en dos casos extremos, si se considera que el ajo actúa en un 100%, la celulasa del limón quedaría inhibida, por algún compuesto existente en el medio, en un 86%, 78% y 100%, en los días 1, 7 y 14, respectivamente. El otro extremo es la posibilidad de que no sean las celulasas del ajo sino las procedentes del limón las que actúen en un 100% en el frasco ajo-limón, en cuyo caso los enzimas del ajo quedarían inhibidos en un 100%, por alguna sustancia procedente o no del limón, en las tres medidas ensayadas, lo que tampoco resulta coherente, teniendo en cuenta que en las preparaciones con ajo aparece la actividad desde el primer día y va aumentando con el tiempo de conservación.

b) La actividad de **poligalacturonasa** (tabla 6) va aumentando progresivamente tanto en las preparaciones de ajo como en las de limón, indicativo de que van saliendo al medio, poco a poco, hasta llegar a un máximo a los 14 días. (para las de ajo triturado casi toda las PGasas salen al medio en 7 días para posteriormente disminuir notablemente).

Análogamente a lo que ocurre con las celulasas, en las preparaciones de ajo-limón la actividad de PGasas no es la que cabría esperar considerando la suma de la actividad del ajo y del limón. Aunque desde el primer día la actividad de ajo-limón es similar a la del limón, el ajo también posee actividad. Por tanto, si se hace un planteamiento análogo al anterior, considerando que el ajo actúa en un 100%, las PGasas del limón quedarían inhibidas un 56%, a los 7 días un 55% y a los 14 días un 76%. La otra posibilidad extrema, que la actividad del frasco ajo-limón fuera debida en un 100% al limón implicaría, además de que el ajo estuviera inhibido en un 100%, que las PGasas del limón también presentarían cierto grado de inhibición, lo que resulta ciertamente extraño.

c) La actividad de  **$\alpha$ -galactosidasa** (tabla 7) es muy superior en el extracto

Componentes de los aliños				
	Ajo-limón	Limón	Ajo triturado	Ajo
1 día	70.8	69.4	44.8	40.2
7 días	137.6	326.1	225.1	49.8
14 días	160.0	365.3	95.7	73.0

**Tabla 6. Actividades de *poligalacturonasas* (unidades de actividad relativas (UB/mL) presentes en las salmueras preparadas con los distintos componentes de los aliños y su evolución con el tiempo.**

Cada valor representa la media de dos determinaciones, CV:10%

Componentes de los aliños				
	Ajo-Limón	Limón	Ajo triturado	Ajo
1 día	0.81	0.043	2.4	0.81
7 día	0.91	---	2.7	1.21
14 día	0.39	---	1.5	0.77

**Tabla 7. Actividades de  $\alpha$ -galactosidasa ( $\eta$ -Kat/mL) presentes en las salmueras preparadas con los distintos componentes de las aliños y su evolución con el tiempo.**

Cada valor representa la media de dos determinaciones. CV:10%

de ajo triturado que en el resto, ya desde el primer día de su preparación, presentando más dificultad para acceder al medio cuando el ajo está en trozos. En la preparación con limón prácticamente no se detecta actividad, (sólo hay indicios en el primer día, y se puede considerar nula en comparación con la obtenida en los otros extractos). Por tanto, se considera que la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa, en las preparaciones ajo-limón no es debido al limón, sino a los enzimas procedentes del ajo. Este hecho queda corroborado si se tiene en cuenta, además, que las actividades de los extractos ajo-limón son similares a los del ajo.

También resulta de interés resaltar que en las preparaciones con ajo, ajo-limón y ajo triturado, el máximo de actividad de  $\alpha$ -galactosidasa aparece a los 7 días de su preparación, aunque ya desde el primer día se encuentra en el medio una actividad que representa casi el 70% para la del ajo y un 90%, aproximadamente, para el ajo triturado y ajo-limón, de lo que se llega a obtener a los 7 días. Posteriormente, a los 14 días, la  $\alpha$ -galactosidasa se inactiva.

## **5. INFLUENCIA DEL AJO Y DEL LIMÓN EN LAS PÉRDIDAS DE TEXTURA DE ACEITUNAS ALIÑADAS.**

*Esta experiencia se ha planteado para comprobar el efecto de los enzimas, una vez salidos al medio, sobre la textura de aceitunas. También se ha investigado cual de los dos componentes, ajo o limón, es el principal responsable del aporte de los enzimas causantes de las pérdidas de textura.*

El estudio se ha realizado con las aceitunas moradas conservadas en salmuera, las mismas que una experiencia anterior (apartado 3.2.3), pero con dos meses de diferencia, habiéndose comprobado que no ha cambiado la textura.

Se ha realizado un envasado con limón, otro con ajo y un tercero con una

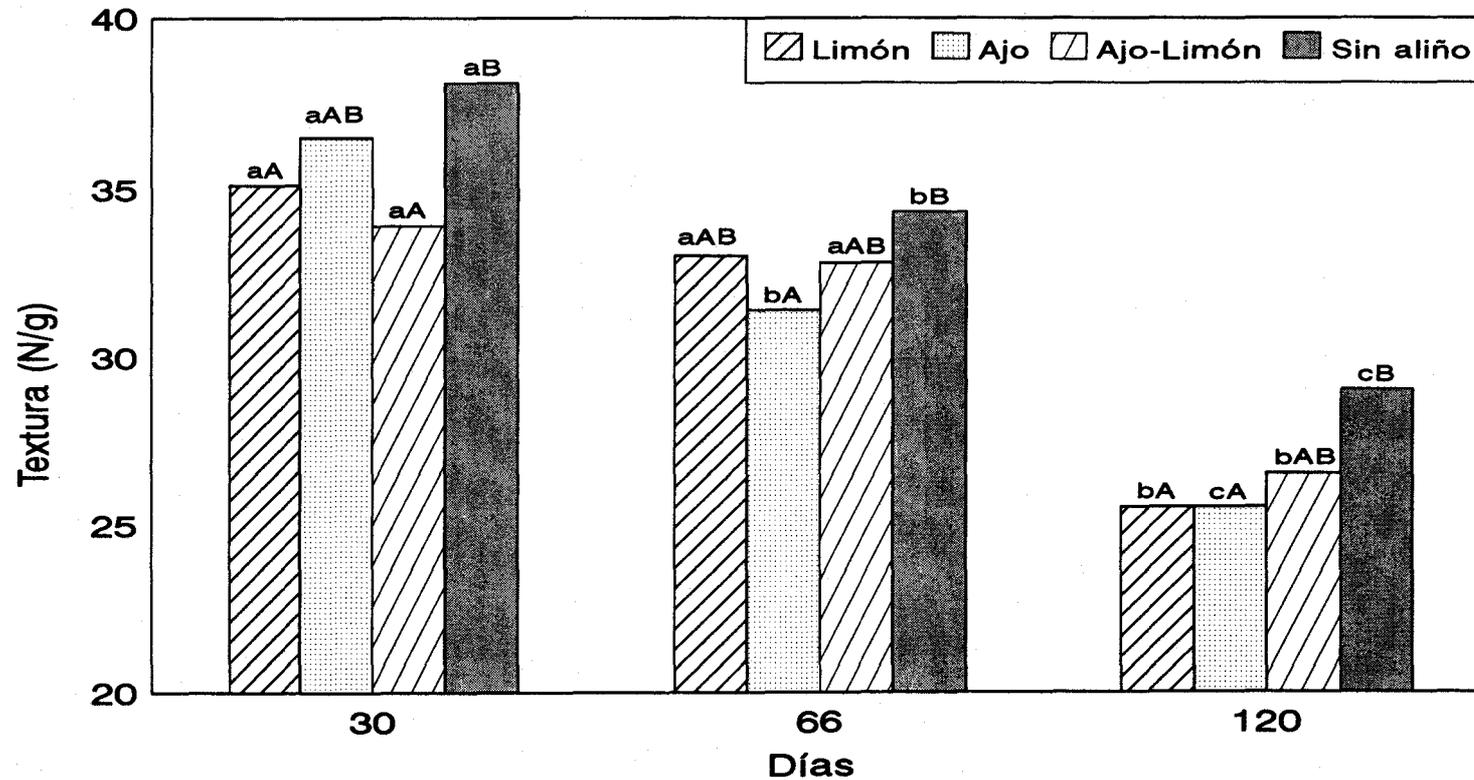
mezcla de ajo y limón, todos en la misma proporción que la utilizada en las experiencias anteriores. También se emplea un control sin aliño, envasando las aceitunas únicamente con una salmuera acidificada con vinagre.

En la figura 9 se representan los resultados de la evolución de la textura con el tiempo para las aceitunas conservadas, en todos los casos, a 30°C . Se puede observar cómo, en el caso de las envasadas sin aliño, la evolución de la textura y de los parámetros químicos son casi idénticos a la que tenía lugar en una experiencia anterior con las aceitunas moradas, siendo posiblemente los enzimas endógenos del propio fruto, que se activan en estas condiciones de pH, sal y temperatura, los responsables de estos cambios de textura, como ya se comentó anteriormente.

Por otro lado, a los 30 días de la preparación de los aliños, aunque no se encuentran diferencias significativas entre los valores de textura de los distintos blancos aliñados (ajo, limón o ajo-limón) si existen diferencias estadísticamente significativas con la textura de las aceitunas envasadas sin aliño, que es indicativo de que tanto el ajo como el limón poseen enzimas que provocan pérdida de textura en las aceitunas.

Posteriormente, al cabo de 66 días de conservación, aunque ya no se aprecian diferencias entre la textura de aceitunas aliñadas y no aliñadas, se observa que las aliñadas exclusivamente con ajo sufren una disminución de textura con el tiempo más acusada que las aliñadas con ajo-limón o sólo con limón. Esto apoya los estudios realizados anteriormente sobre las actividades enzimáticas de los componentes de los aliños (Tabla 8), siendo las actividades de los extractos procedentes del limón y del ajo-limón más altas al comienzo, sobre todo las PGasas (Tabla 6), que las preparadas exclusivamente con ajo, para posteriormente igualarse mucho, como las celulasas (Tabla 5), y seguir liberándose poco a poco los enzimas del ajo.

Al igual que la textura, la evolución de los parámetros químicos (Tabla 9) es



**Fig. 9. Efecto del ajo y del limón sobre la textura de aceitunas moradas y aliñadas**

\* Textura inicial 43,9 N/g

\* Valores de textura con la misma letra minúscula no son diferentes significativamente con el tiempo, según el test de ANOVA ( $P=0,05$ ).

Valores de textura con la misma letra mayúscula no son diferentes significativamente para un mismo período de tiempo, según el test de ANOVA ( $P=0,05$ ).

Frascos	Enzimas		
	Celulasas (UB/mL)	PG-asas (UB/mL)	$\alpha$ -galactosidasa ( $\eta$ -Kat/mL)
1	3.29 $\pm$ 0.24	7.20 $\pm$ 0.23	0.079 $\pm$ 0.003
2-Mert.	3.31 $\pm$ 0.58	9.14 $\pm$ 0.18	0.033 $\pm$ 0.001
3 *	3.35 $\pm$ 0.56	8.88 $\pm$ 0.14	0.024 $\pm$ 0.003
4-Mert.*	3.30 $\pm$ 0.31	9.77 $\pm$ 0.71	0.017 $\pm$ 0.001

**Tabla 8. Actividades enzimáticas en los extractos concentrados de salmueras en las preparaciones de los aliños, con y sin ajo.**

Cada valor representa la media de dos determinaciones , CV: 10%

\*Sin ajo en su elaboración

casi idéntica a los de la experiencia anterior realizada con aceitunas moradas (Tabla 4), hasta los 66 días en las aceitunas aliñadas y hasta los 120 días en las no aliñadas.

## **6. INFLUENCIA DE LA SAL EN LA EXTRACCIÓN DE LOS ENZIMAS Y pH ÓPTIMO DE ACTUACIÓN.**

Puesto que tanto el ajo como el limón son los componentes mayoritarios de la fórmula de aliño utilizada a lo largo de este trabajo y en vista de que se han detectado actividades enzimáticas en las salmueras de estas preparaciones, resulta de gran interés realizar una caracterización de estos enzimas, estudiando los efectos de la sal en la extracción y el del pH al final de la mezcla de reacción.

Se estudia por separado la incidencia de estos dos parámetros, distinguiendo a su vez entre ajo y limón.

### **6.1. Estudio de celulasa, poligalacturonasa y glicosidasas en ajo**

Los extractos enzimáticos de ajo se han preparado en la proporción de 10 g de ajo y 25 mL de tampón acético/acetato 0,05 M, pH 5,5, resultando en el extracto un pH final de 5,75 unidades.

#### **6.1.1. Efecto de la sal.**

Los ensayos con **celulasas** se han realizado con dos extractos de distinto origen, en un intervalo de concentración de NaCl del 0 al 7%, para un pH de extracción de 5,5 unidades.

Los resultados se muestran en la figura 10, en la que se aprecian dos

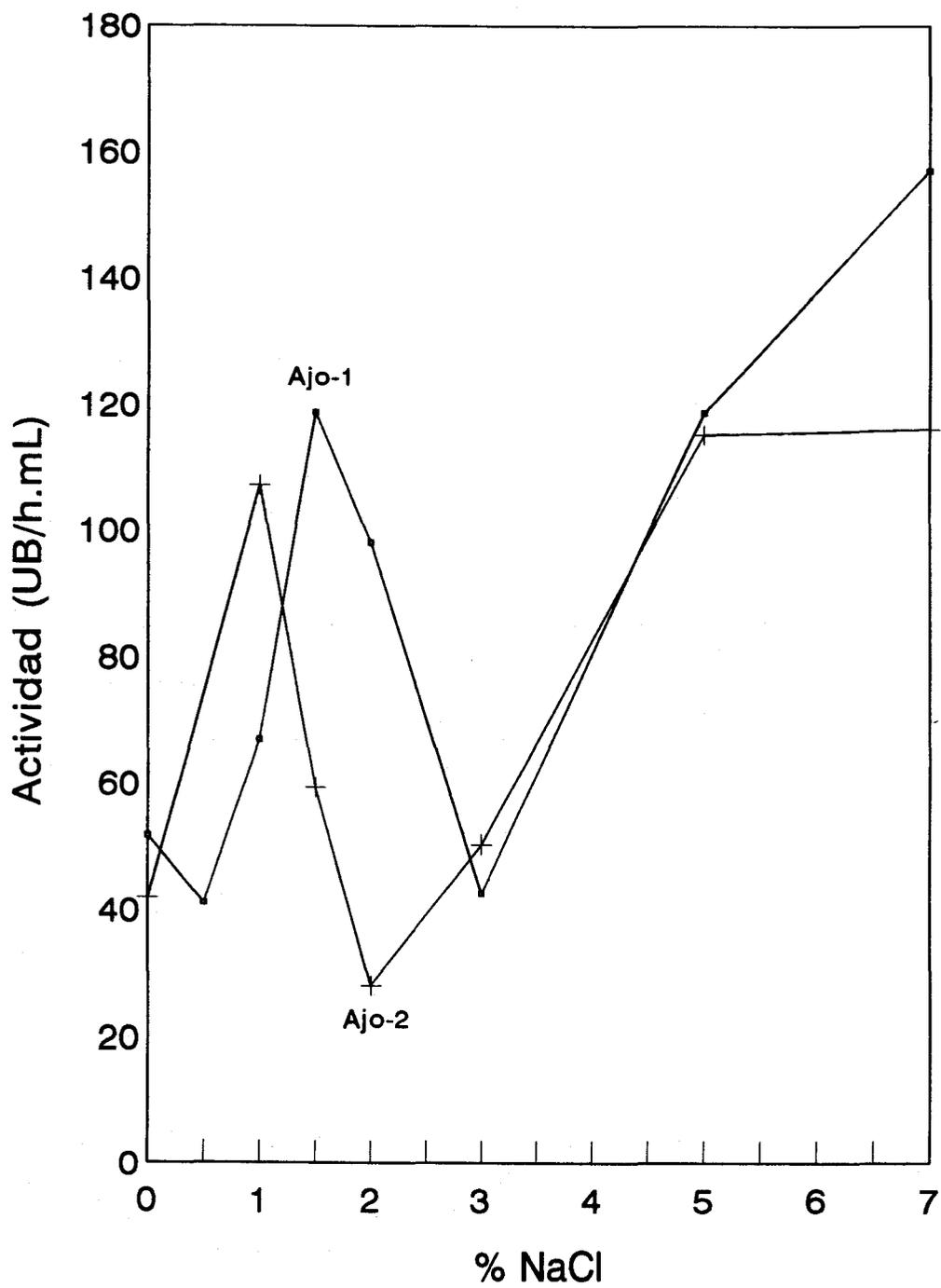


Fig. 10. Efecto de la sal en celulasa de ajo

máximos de actividad, a concentraciones de NaCl de 1-1,5% y 5-7%, respectivamente. También aparece un efecto inhibitor de la sal a valores entre el 2-3%.

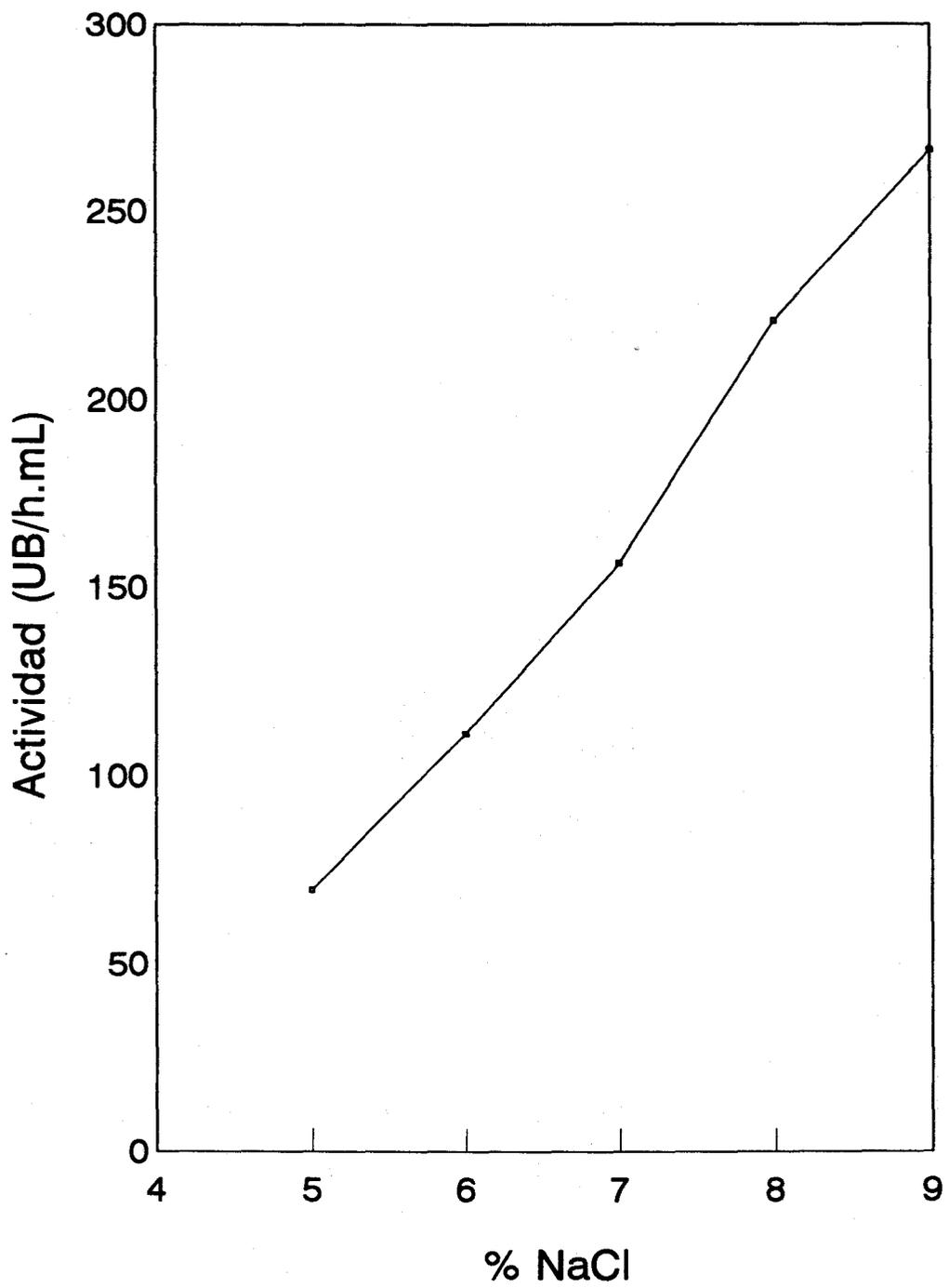
La **poligalacturonasa** se ha ensayado en un intervalo de concentración de NaCl de 4-9%; no se reseñan datos entre 0 y 4% debido a problemas de gelificación de la mezcla enzima-sustrato como consecuencia de la desesterificación de la pectina por pectinmetilesterasa, pese a que el extracto enzimático se ha incubado a 40°C durante un período de 48 horas, que en otros productos consigue inactivar este enzima (Bell et al., 1950).

Las actividades se muestran en la figura 11 observándose que va aumentando hasta valores del 9% de NaCl en la extracción, análogamente a lo que ocurre en las celulasas en el intervalo de 5-7% de NaCl estudiado.

En cuanto a las **glicosidasas**, la  **$\alpha$ -galactosidasa** (Fig. 12), que presenta en el ajo una actividad 15 veces superior al resto de glicosidasas, aumenta de forma brusca hasta una concentración de NaCl del 2%, y a partir de aquí de forma más suave hasta el 7%.

La  **$\beta$ -galactosidasa** (Fig. 13) presenta una ligera subida de actividad al utilizar entre el 1-2% de NaCl y a continuación permanece prácticamente constante con el aumento de concentración de sal.

La  **$\alpha$ -arabinosidasa** y la  **$\beta$ -glucosidasa** (Fig. 14) presentan una mayor actividad en ausencia de sal, produciéndose una notable disminución a partir de concentraciones tan bajas como 0,5% de sal.



**Fig. 11. Efecto de la sal en poligalacturonasa de ajo**

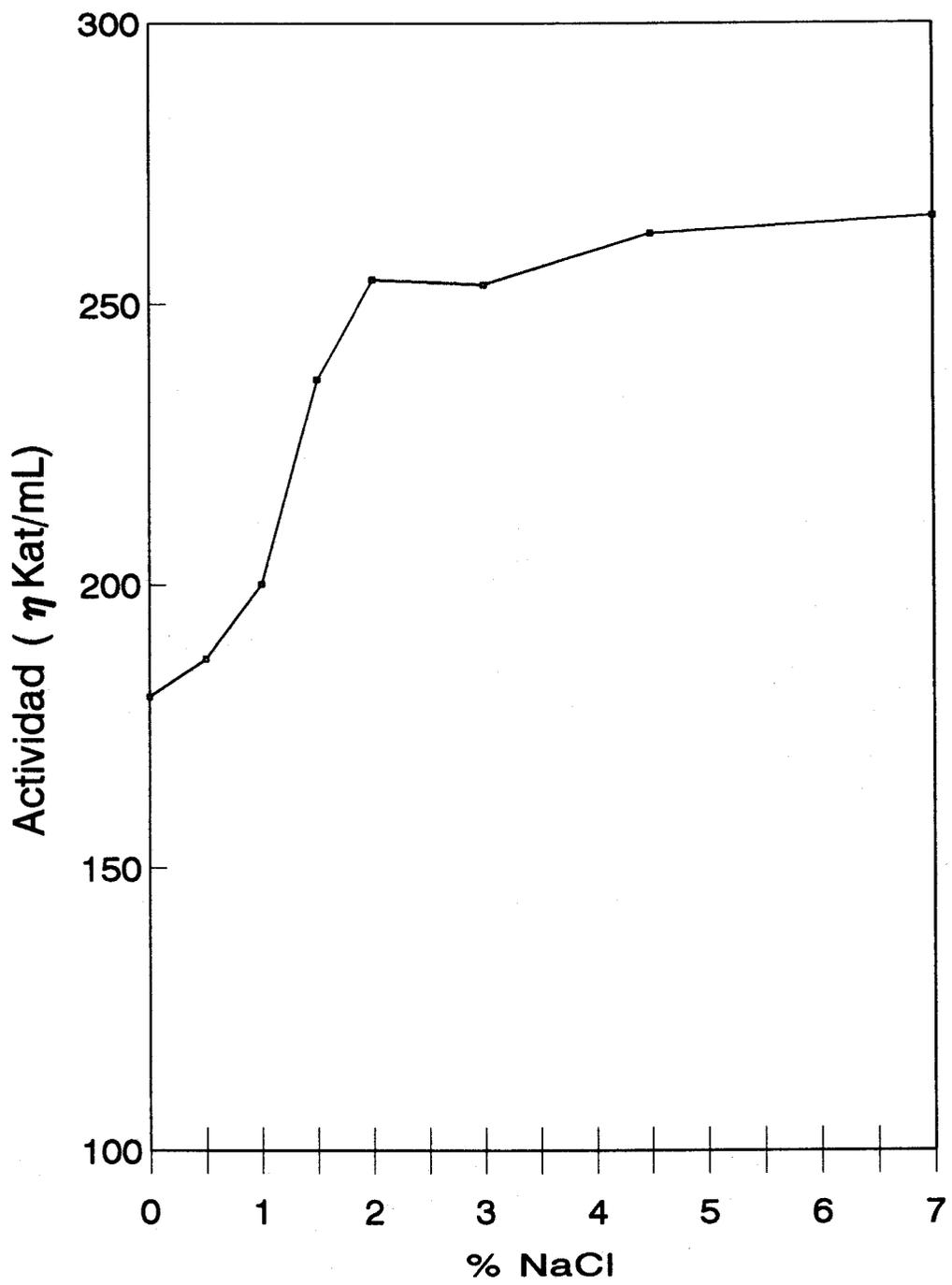


Fig. 12. Efecto de la sal en  $\alpha$ -galactosidasa de ajo

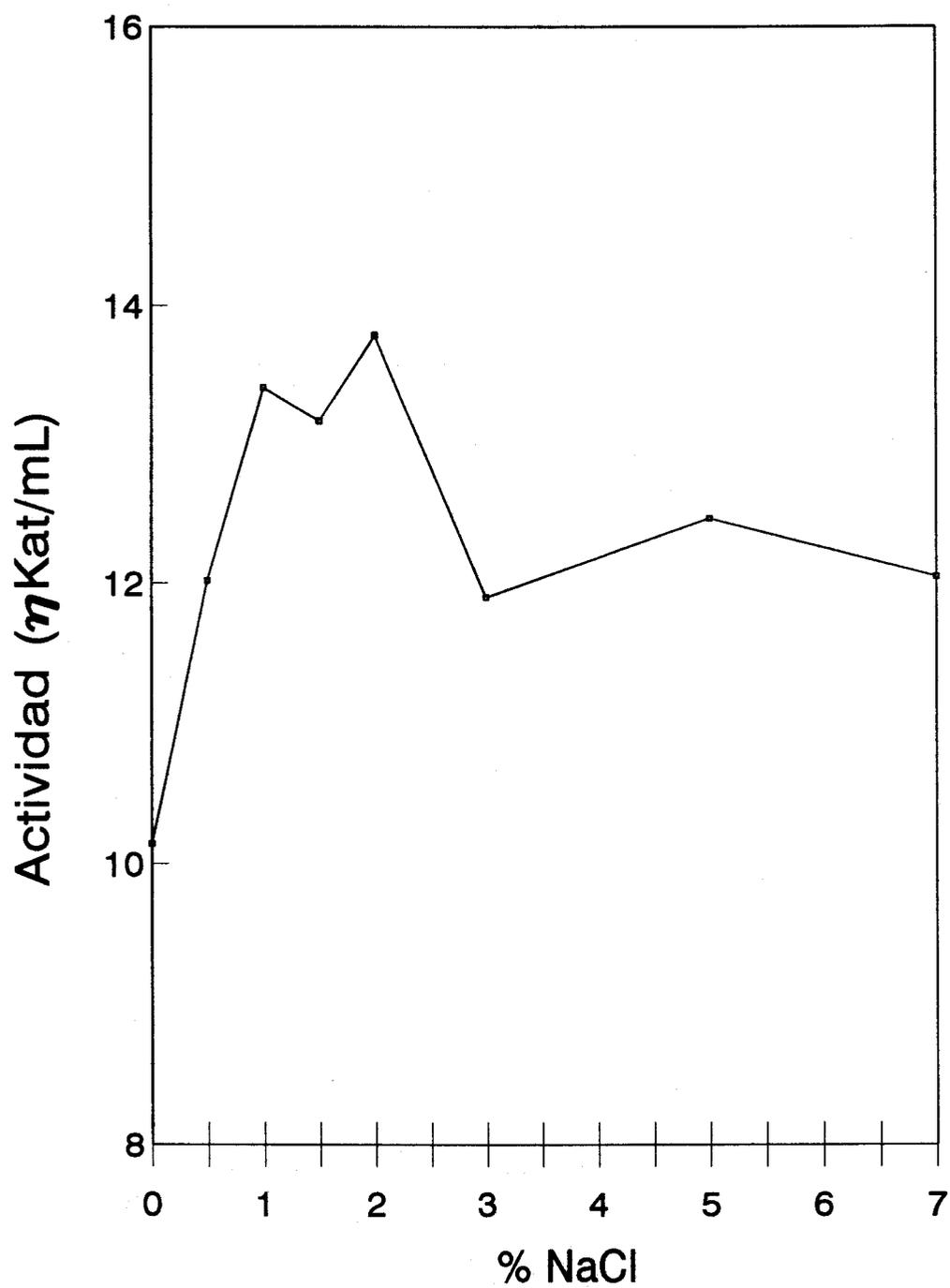


Fig. 13. Efecto de la sal en  $\beta$ -galactosidasa de ajo

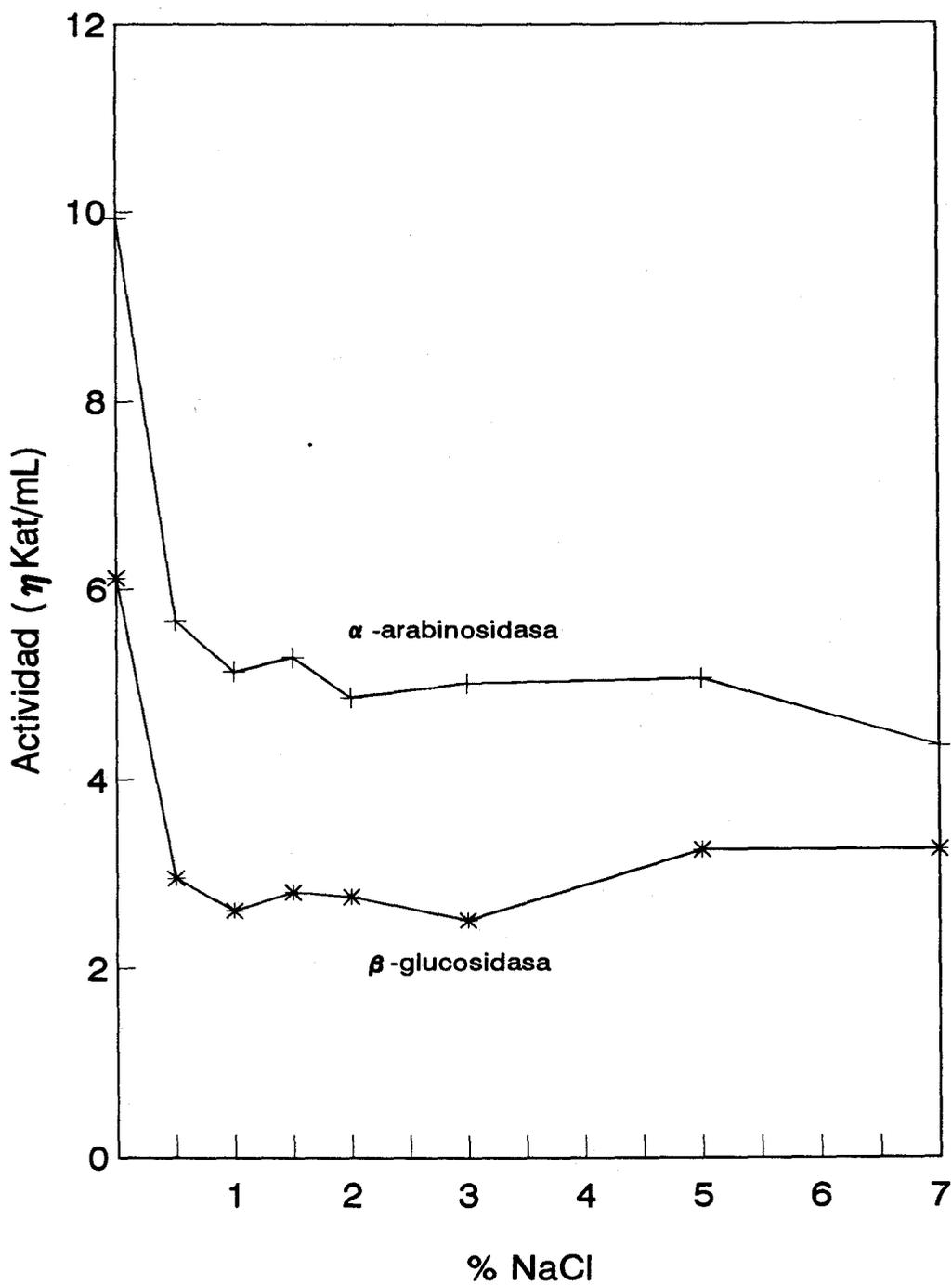


Fig. 14. Efecto de la sal en glicosidasas de ajo

### 6.1.2. Efecto del pH.

Los sustratos se han preparado con un tampón cítrico 0,1 M/fosfato 0,2 M, para que en la mezcla enzima-sustrato resulte un pH final entre 3,5 y 7 unidades.

Puesto que hay notable actividad de todos los grupos de enzimas para una concentración de NaCl del 7%, los estudios de pH se han realizado a partir de los extractos preparados con esta concentración de sal, añadida en el momento de la extracción.

Las **celulasas** (Fig. 15) presentan un máximo de actividad a pH 7,0 y un mínimo a pH 5,5.

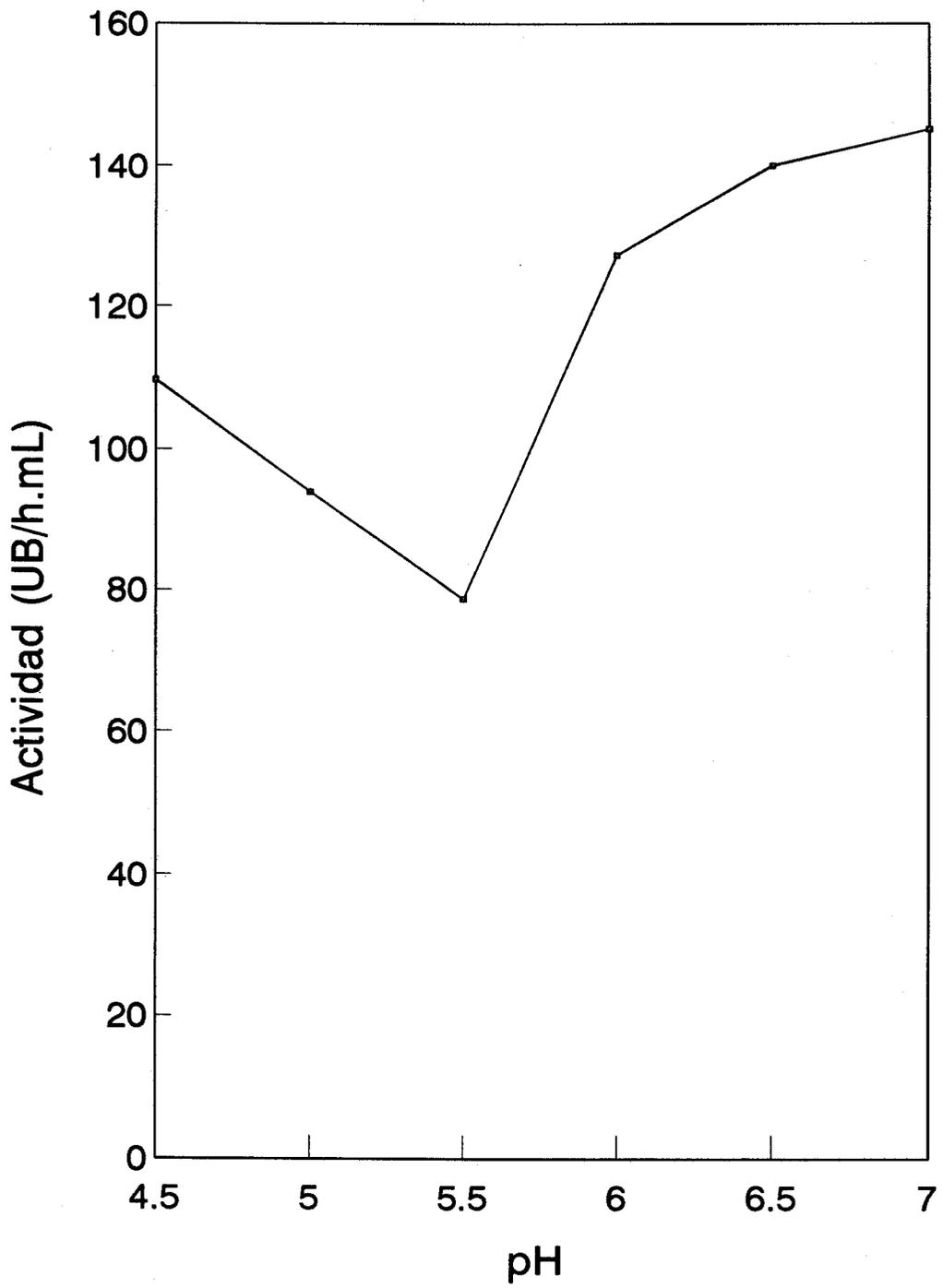
Las **poligalacturonasas** (Fig. 16), a diferencia de las celulasas, presentan un máximo a pH entre 5,5 y 6,0, seguida de una disminución brusca de actividad para valores de pH más altos. Este máximo coincide además, con el pH óptimo de actuación encontrado para las PGasas de la aceituna (Castillo et al. 1978).

La actividad de  **$\alpha$ -galactosidasa** (Fig. 17) también es máxima para valores de pH de 6,0, presentando además otro máximo algo más pequeño a pH 4,0.

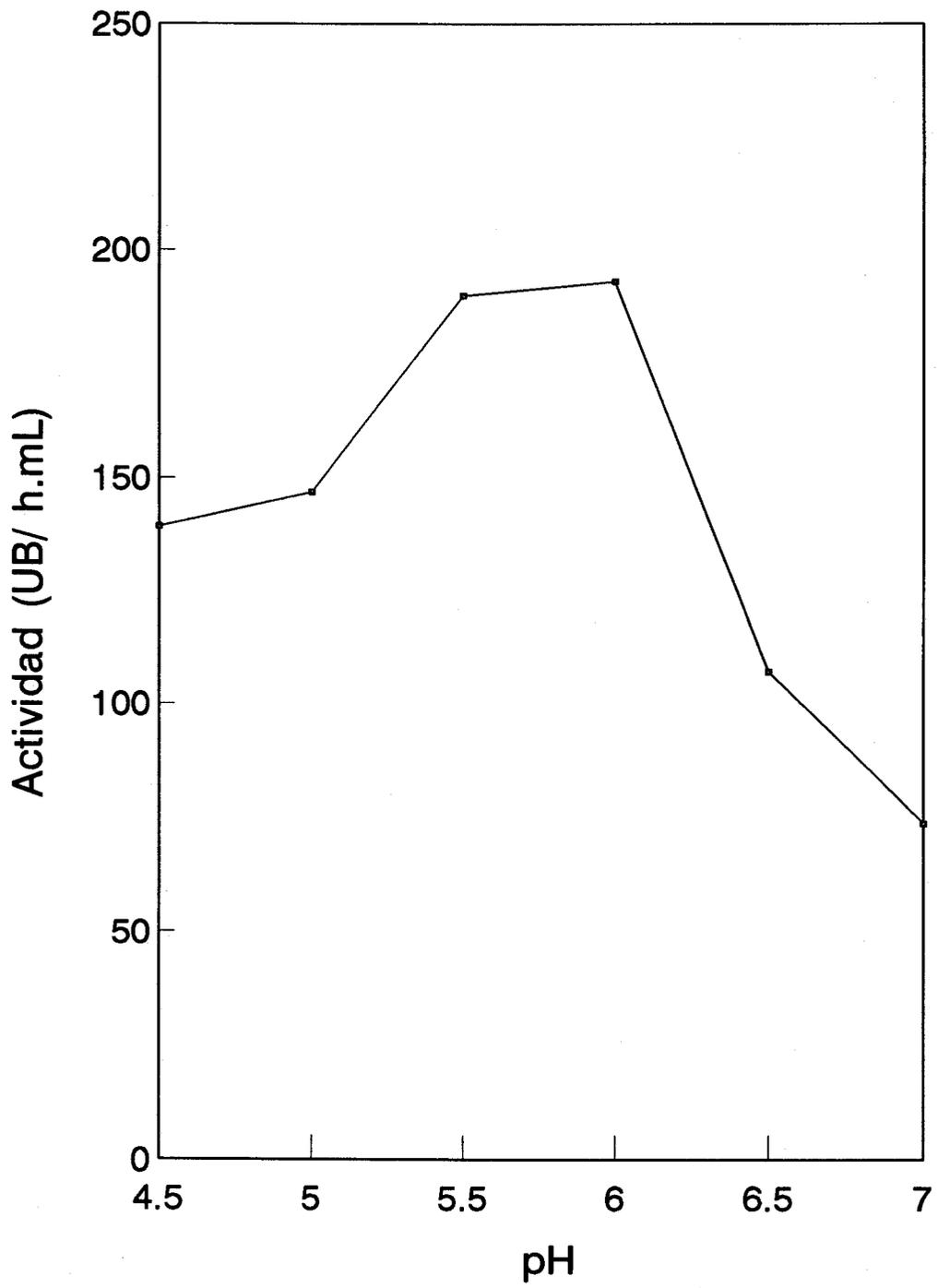
La  **$\beta$ -galactosidasa** (Fig. 18) y la  **$\alpha$ -arabinosidasa** (Fig. 19) presentan un máximo a pH 4,0 mientras que la  **$\beta$ -glucosidasa** (Fig. 19) lo presenta a valores de pH de 4,5 unidades. Todos estos pH óptimos de las glicosidasas coinciden con los de las aceitunas, cuyas actividades son máximas a pH comprendidos entre 4,3 y 5,3 (Heredia et al. 1993).

### 6.2. Estudio de celulasas, poligalacturonasas y glicosidasas en limón.

Para la determinación de las actividades enzimáticas en limón se han



**Fig. 15. Efecto del pH en celulasa de ajo**



**Fig. 16. Efecto del pH en poligalacturonasa de ajo**

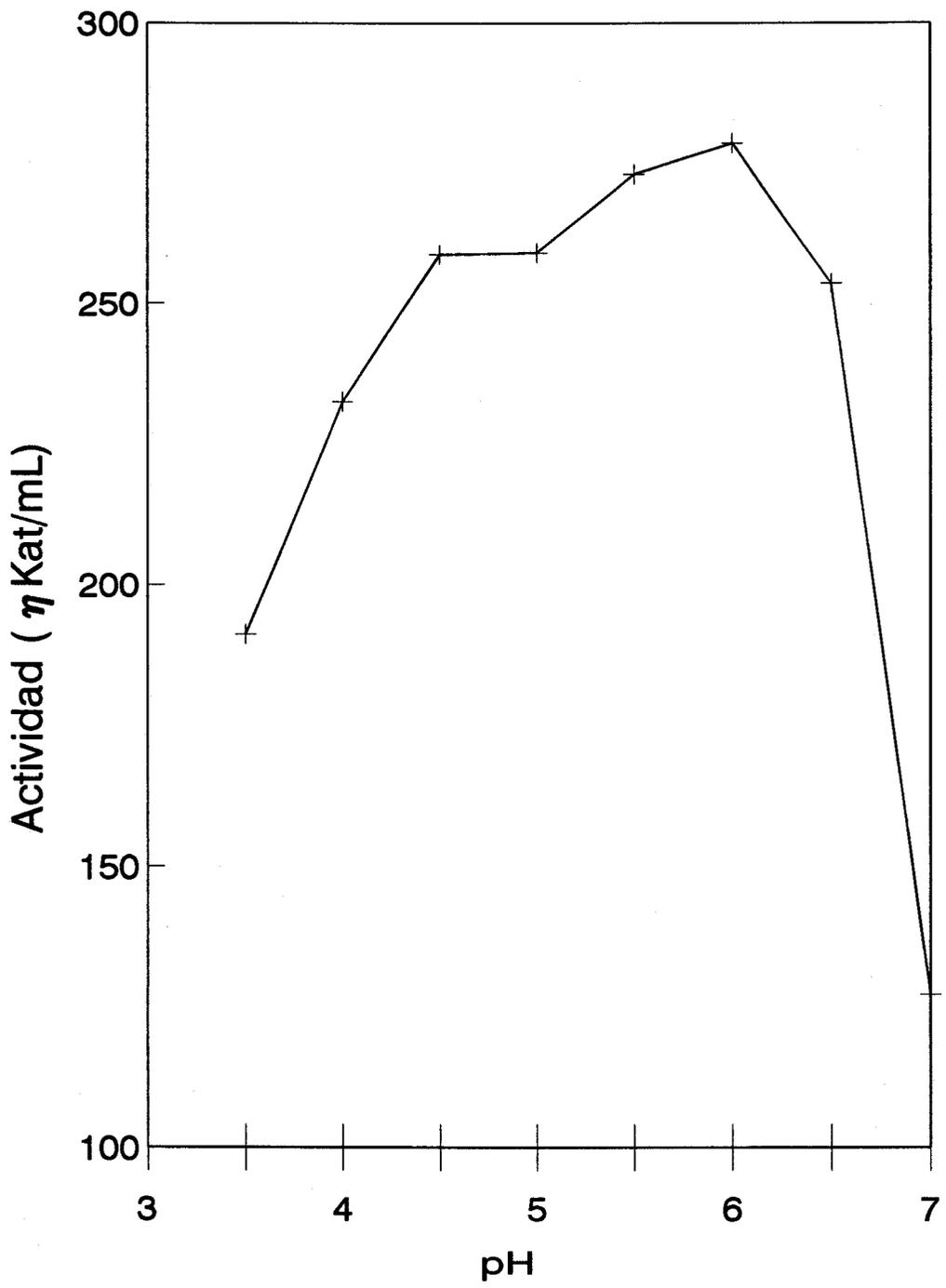


Fig. 17. Efecto del pH en  $\alpha$ -galactosidasa de ajo

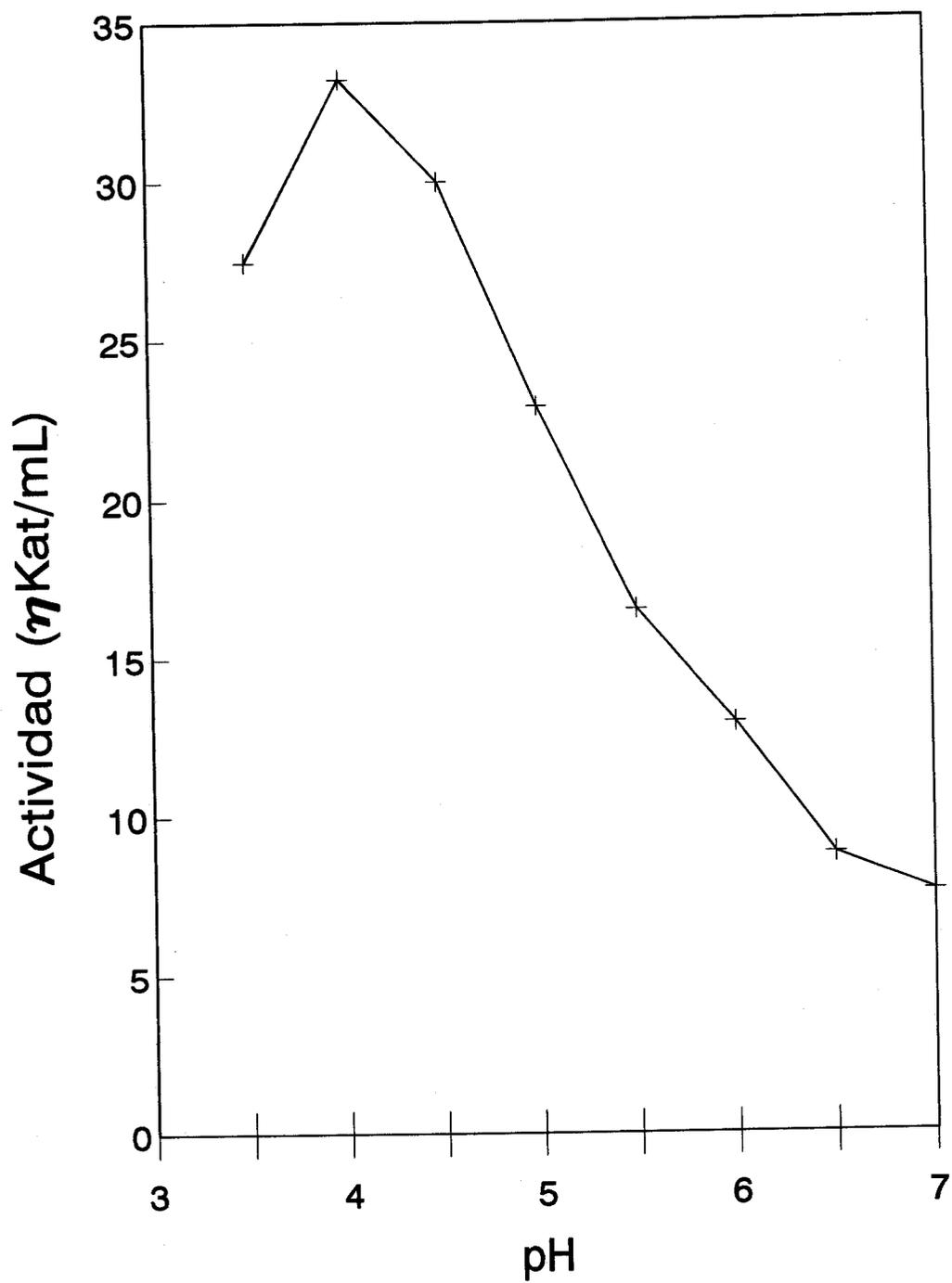


Fig. 18. Efecto del pH en  $\beta$ -galactosidasa de ajo

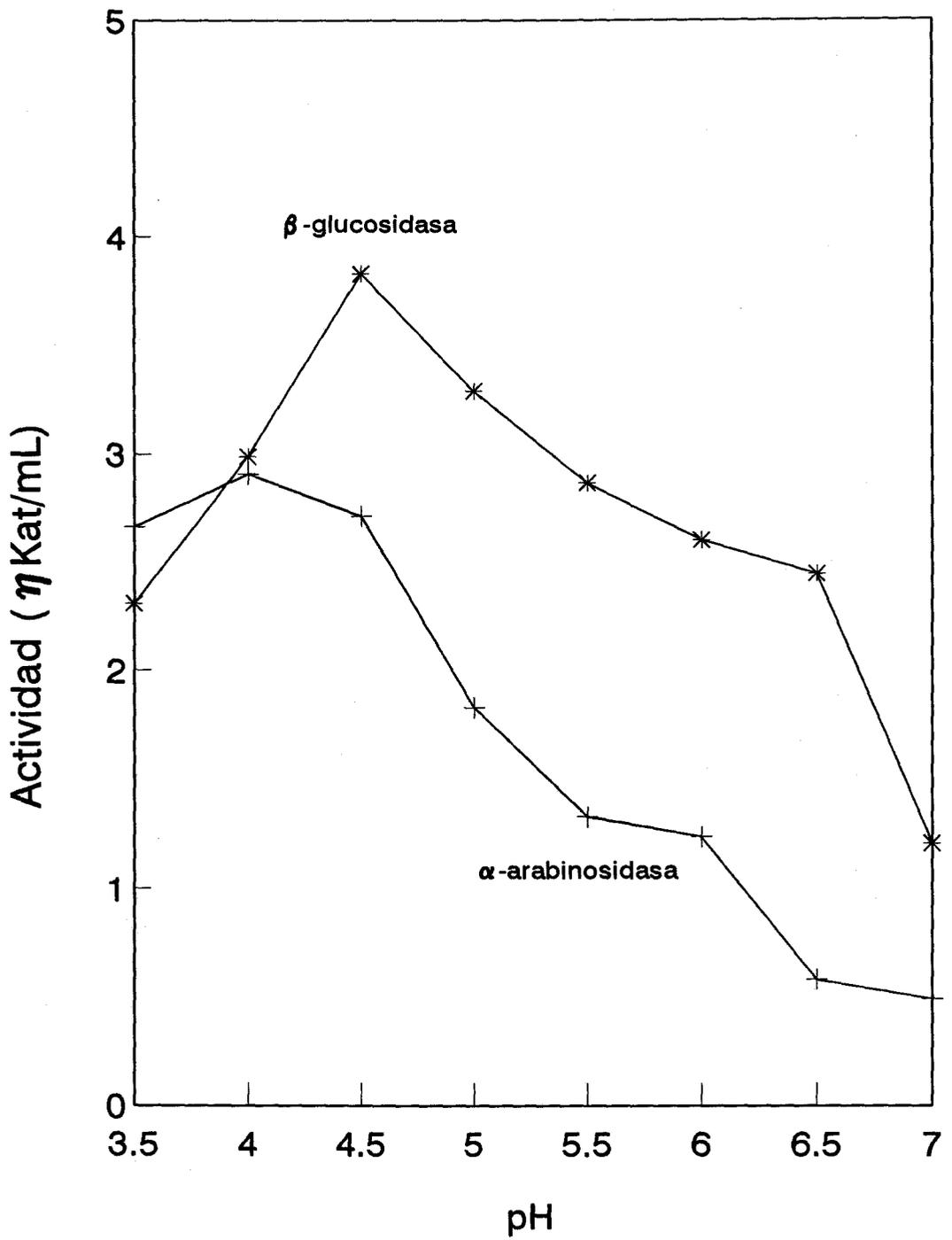


Fig. 19. Efecto del pH en glicosidasas de ajo

preparado extractos enzimáticos de limón con la peculiaridad de que se han estudiado tanto en la pulpa como en la cáscara de dicho fruto. Para ello se han preparado extractos de pulpa (20 g/50 mL de H<sub>2</sub>O) y de cáscara (10 g/50 mL de H<sub>2</sub>O).

En la preparación de los extractos de pulpa aparecieron problemas de gelificación debido al pH de extracción (del orden de 2,5 y 3) y, por consiguiente, las extracciones se han realizado con H<sub>2</sub>O desionizada, a pH a 5,5 (por adición de KOH 1M) (Burn, 1990).

Los ensayos se han llevado a cabo con dos extractos de limón de distinto origen, con el fin de comprobar si las actividades obtenidas son realmente debidas al limón o si varían de un tipo de limón a otro. Los resultados obtenidos han sido similares en todos los casos.

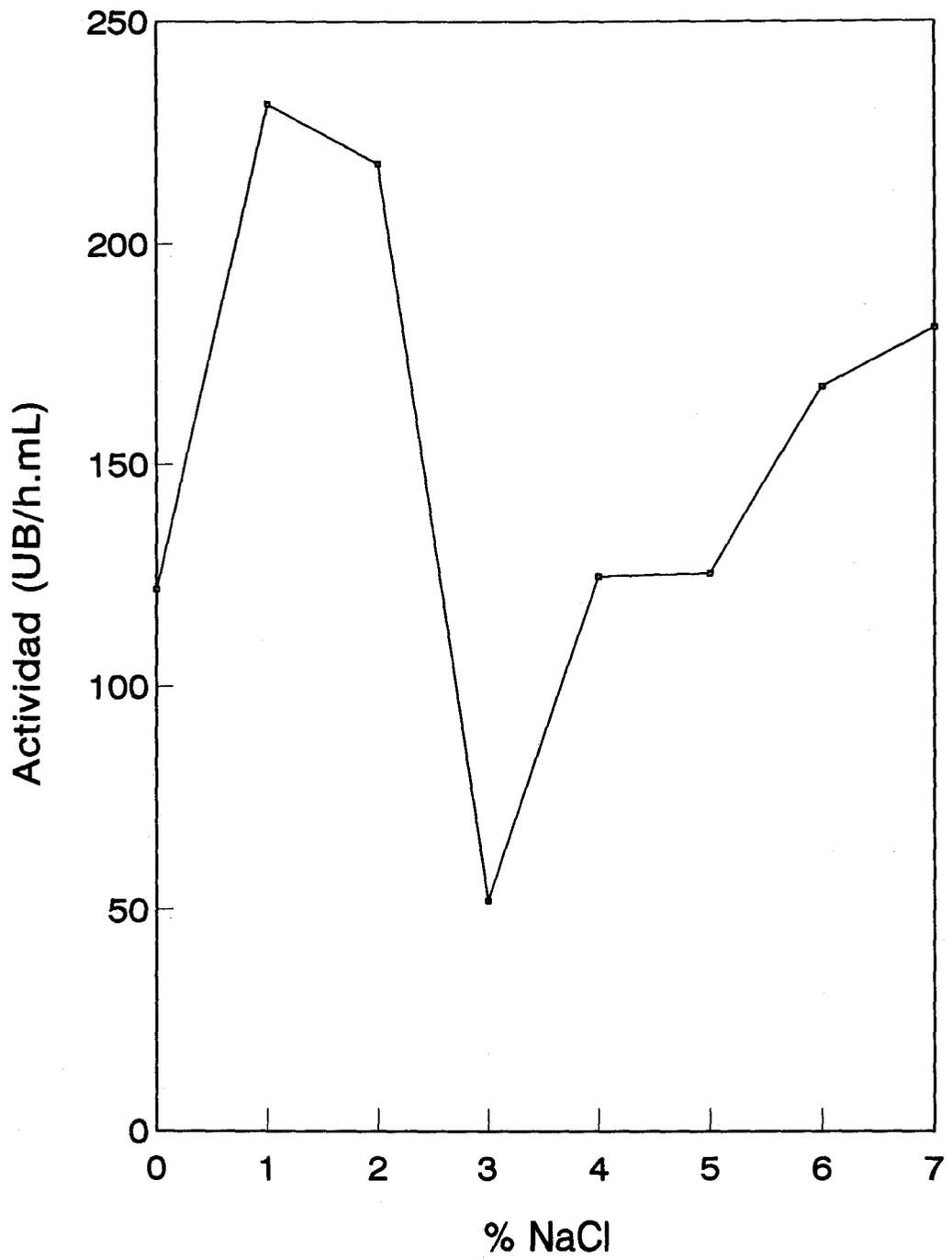
### **6.2.1. Estudio de enzimas de la pulpa de limón.**

#### **6.2.1.1. Efecto de la sal.**

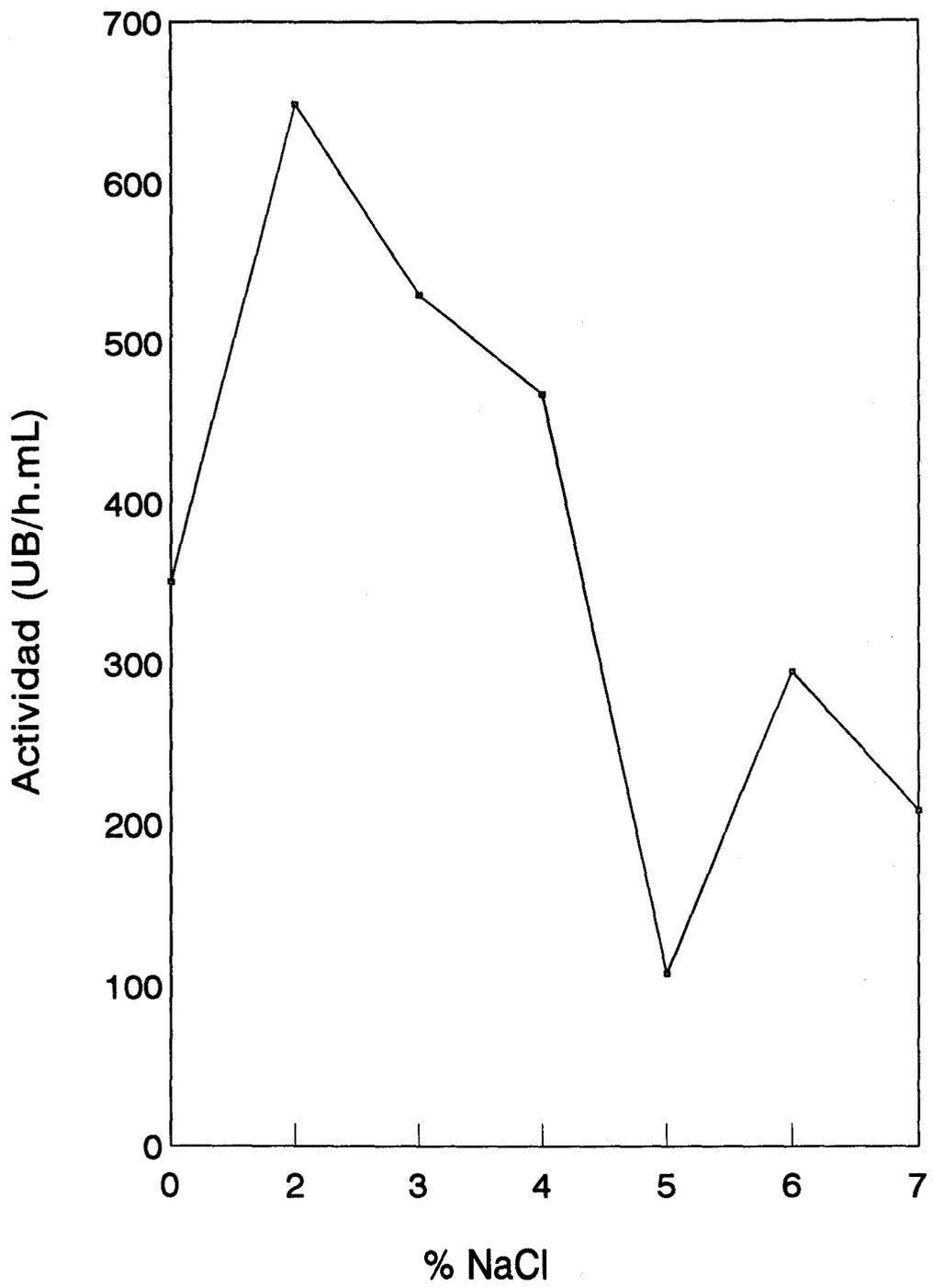
La actividad de celulasas de la pulpa de limón - en las condiciones de extracción ensayadas, pH 5,5 y concentraciones de NaCl de 0 a 7% - aparecen recogidas en la figura 20. Se pueden apreciar, como ocurría en el ajo, dos máximos, (1% y 7% de sal), siendo el segundo algo inferior. Igualmente, se observa una actividad mínima para una concentración de NaCl del 3%.

La poligalacturonasa (Fig. 21) presenta un máximo de actividad a concentración de NaCl del 2%, seguidamente disminuye hasta una concentración del 5% y posteriormente experimenta una ligera subida con un 6% de sal.

De las glicosidasas ensayadas sólo se han detectado en la pulpa de limón la  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa, que son las mismas que se encuentran en el jugo de las vesículas de una variedad de naranjas de Valencia (Burn, 1990), aunque las de la



**Fig. 20. Efecto de la sal en celulasa de pulpa de limón**



**Fig. 21. Efecto de la sal en poligalacturonasa de pulpa de limón**

pulpa de limón son unas 100 veces más activas.

La  $\alpha$ -galactosidasa (Fig. 22) procedente de los dos extractos de limón ensayados, presenta un máximo de actividad a concentraciones de 2-4% de NaCl, el primero y de 1% en el segundo, para posteriormente inactivarse a mayores concentraciones.

La  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 23) presenta una evolución fluctuante. Manifiesta su actividad a concentraciones 0,5-1% de sal, disminuye seguidamente a concentraciones superiores, aunque se recupera levemente a 4-5% para inactivarse finalmente con 7% de sal.

#### 6.2.1.2. Efecto del pH.

Las experiencias se han realizado en una concentración de 20 g de pulpa en 25 mL de H<sub>2</sub>O, con una concentración de NaCl del 1%. El pH final de la mezcla enzima-sustrato varía desde 3,5 hasta 7,0.

Para cada enzima se han realizado dos experiencias paralelas que difieren en la procedencia de los limones utilizados. Los resultados obtenidos muestran unos perfiles de actividad muy parecidos para ambas experiencias.

La actividad de **celulasa** (Fig. 24) es muy alta a pHs muy bajos, observándose un mínimo a pH entre 5,2-5,7 y una posterior subida por encima de 6,0 unidades.

El desarrollo de actividad de **poligalacturonasa** (Fig. 25) es muy similar al comentado para celulasa, aunque se produce un mínimo más pronunciado a un pH de 4,6 y una subida más suave a partir de 5,0 unidades.

Los estudios de actividad de las **glicosidasas** de la pulpa de limón se han

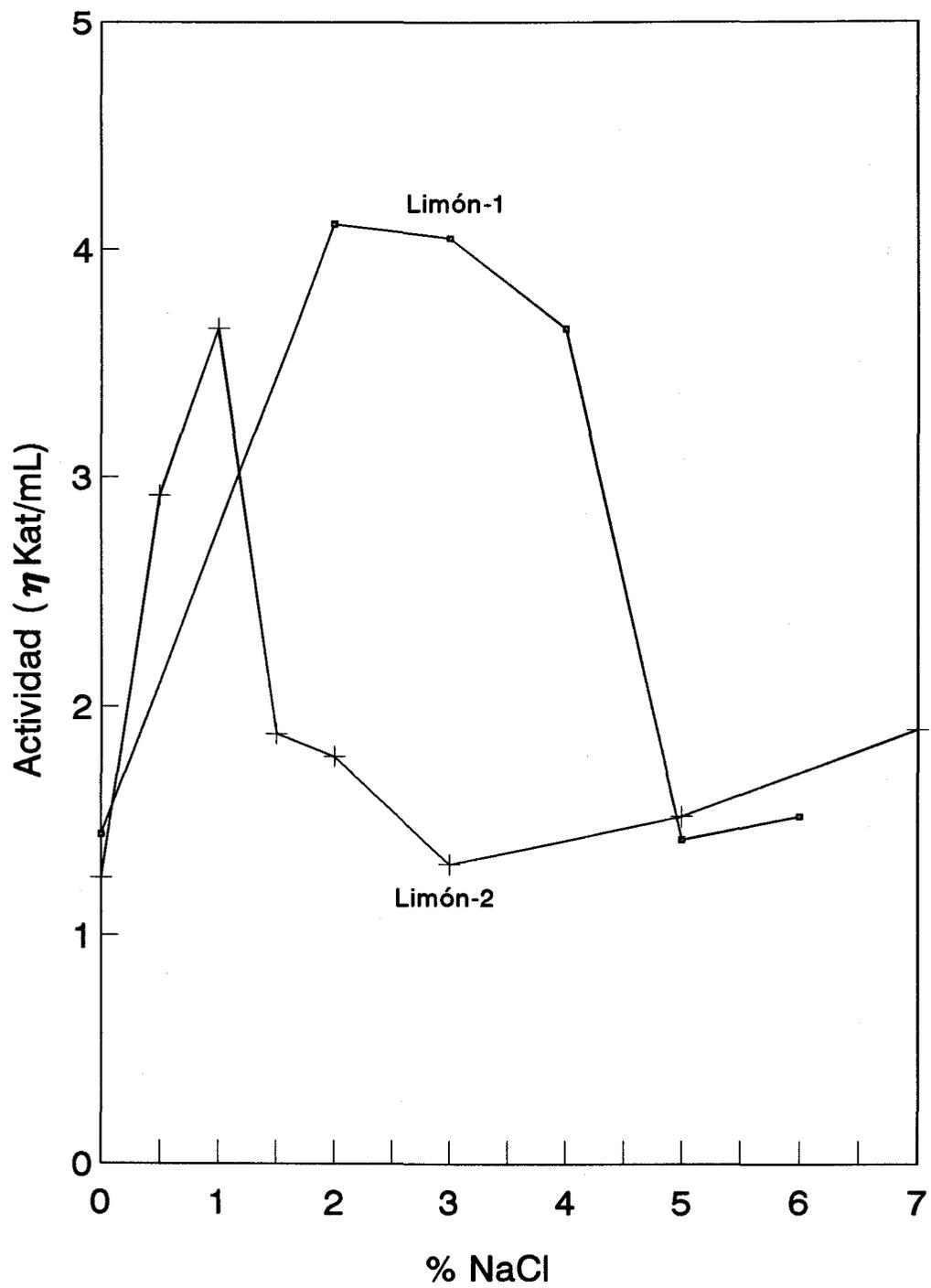


Fig. 22. Efecto de la sal en  $\alpha$ -galactosidasa de pulpa de limón

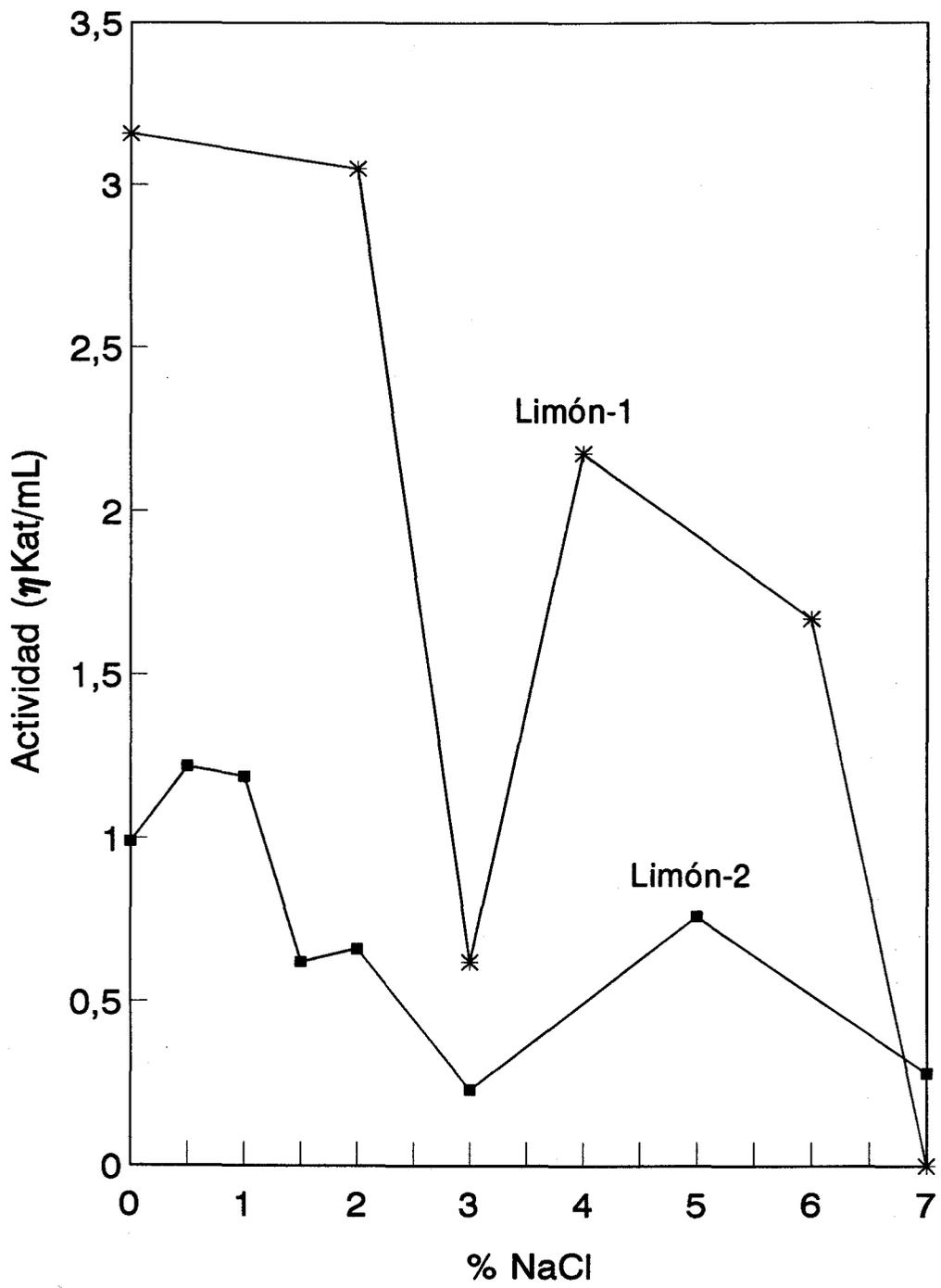


Fig. 23. Efecto de la sal en  $\beta$ -galactosidasa de pulpa de limón

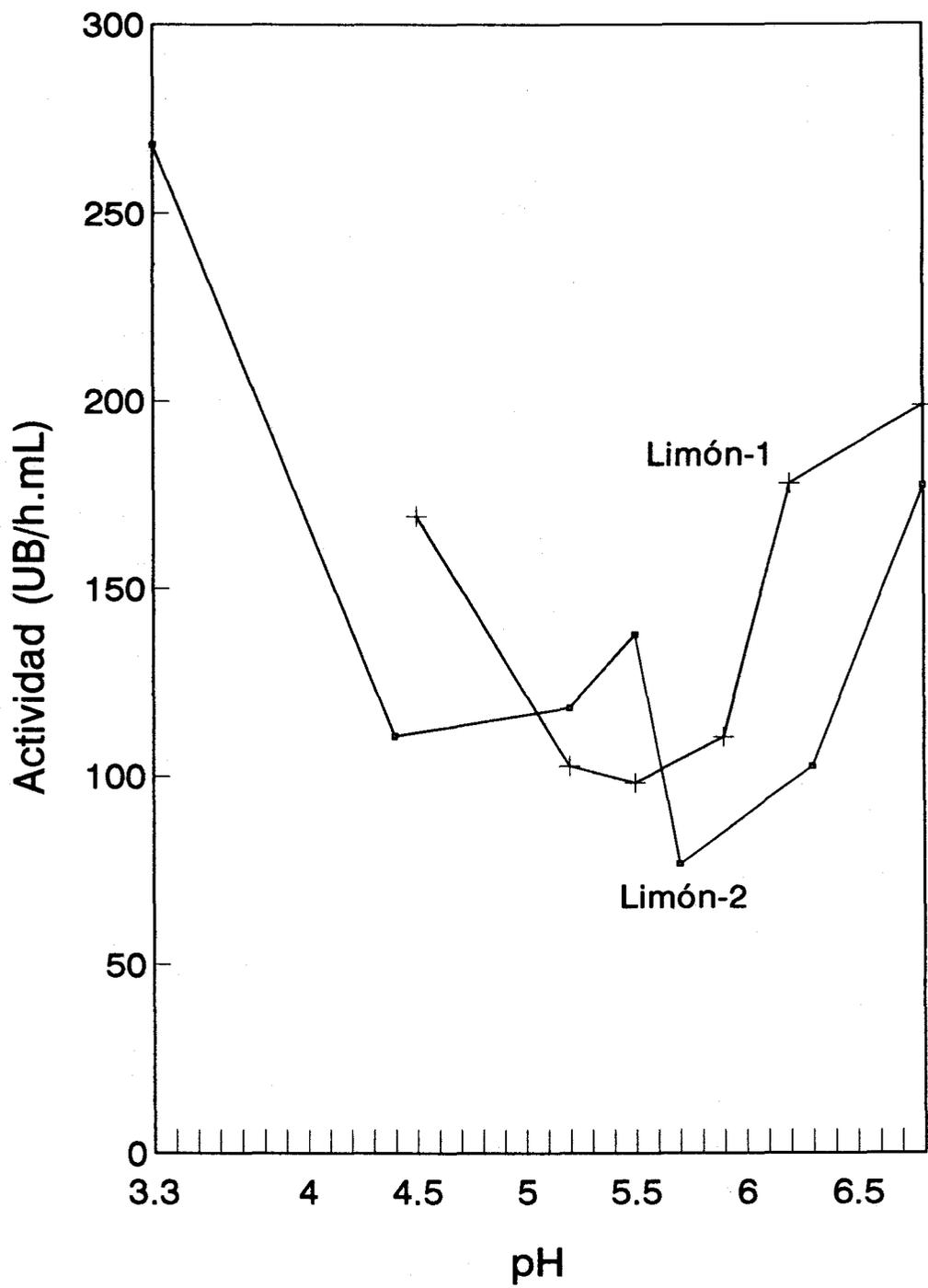


Fig. 24. Efecto del pH en celulasa de pulpa de limón

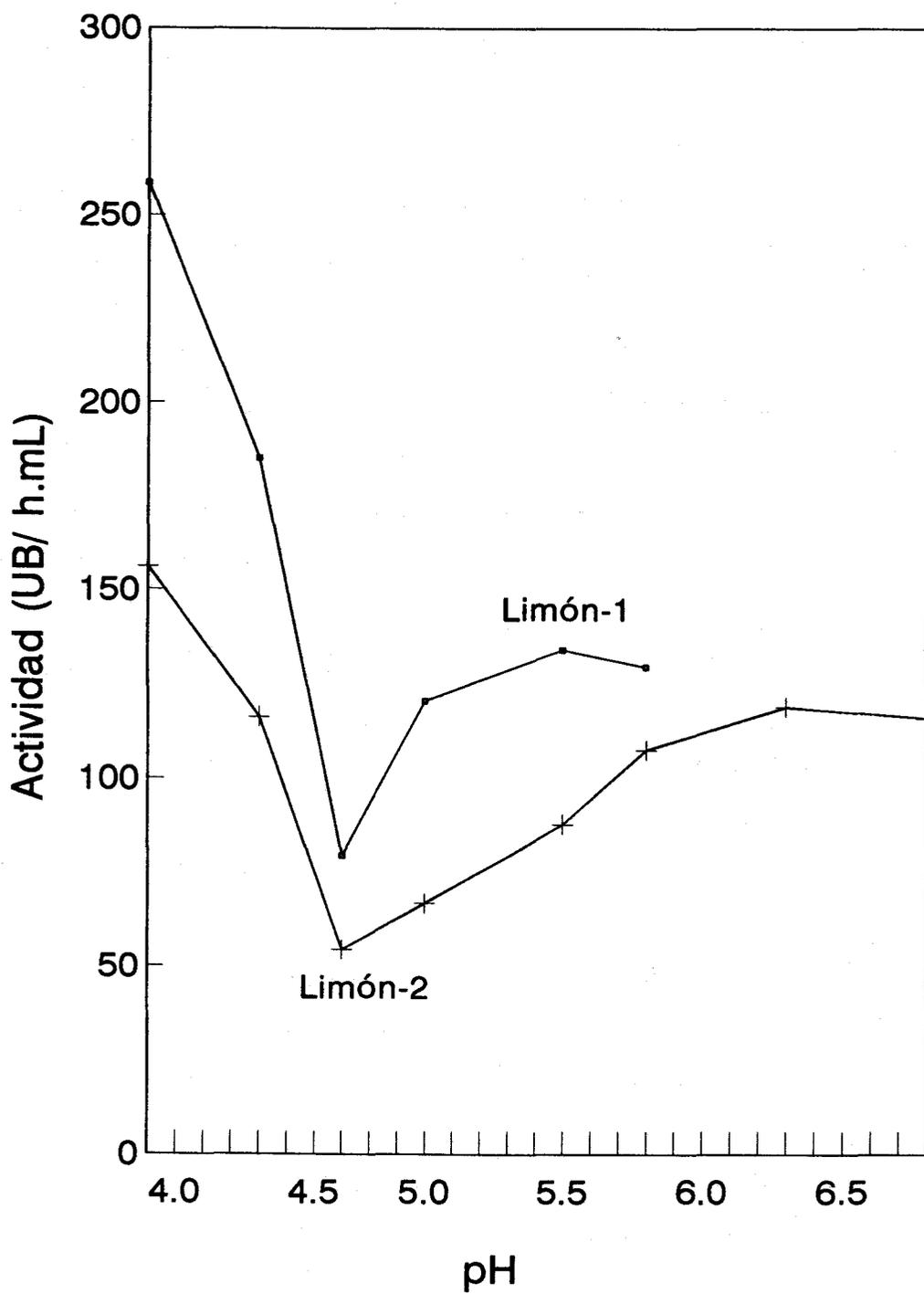


Fig. 25. Efecto del pH en poligalacturonasa de pulpa de limón

realizado desde pH 2,5 hasta 7. La  $\alpha$ -galactosidasa (Fig. 26) posee un máximo de actividad a pH 4,5-5,0, que coincide con los óptimos de  $\alpha$ -gal I y  $\alpha$ -gal II purificadas de la pulpa de naranjas (Burns, 1990). También se detecta un segundo pico de actividad a pH 6,0, para ser totalmente inactiva a valores de pH de 3,0 y de 6,5. La  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 27) aumenta mucho su actividad en el paso de pH 3,0 a 3,5, observándose un máximo a pH 4,0, que coincide con el óptimo de la  $\beta$ -gal II aislada de la pulpa de naranja (Burns, 1990). Al seguir aumentando el pH, se producen dos perfiles de actividad distintos, dependiendo del limón utilizado en los ensayos; mientras que en uno se inactiva sólo parcialmente hasta valores de 5,5, en el otro se inactiva totalmente, apareciendo en ambos un segundo máximo a pH de 6,5.

## 6.2.2. Estudio de enzimas de la cáscara de limón.

### 6.2.2.1. Efecto de la sal.

Los máximos de actividad de celulasas (a 1,5% y 7% de sal, respectivamente), procedentes de la cáscara de limón (Fig. 28), son idénticos a los que se obtienen para los de la pulpa, e incluso para los del ajo. Igualmente, existe un mínimo de actividad, para concentraciones de sal del 3%, con la diferencia respecto a las de pulpa o las del ajo, de que las actividades son muy superiores a cuando no se utiliza NaCl en la extracción.

Por los problemas de gelificación en la mezcla enzima-sustrato, ya reseñados, no se ha determinado la actividad de PGasa.

Los perfiles de actividad de glicosidasas, en función de las distintas concentraciones de sal ensayadas (0-7%), se muestran en las figuras 29 y 30. Se puede comprobar que la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa se va incrementando a medida que lo hace la concentración de NaCl, observándose una subida brusca hasta concentraciones del 2-3%, que se continúa de forma mucho más suave hasta el 7%,

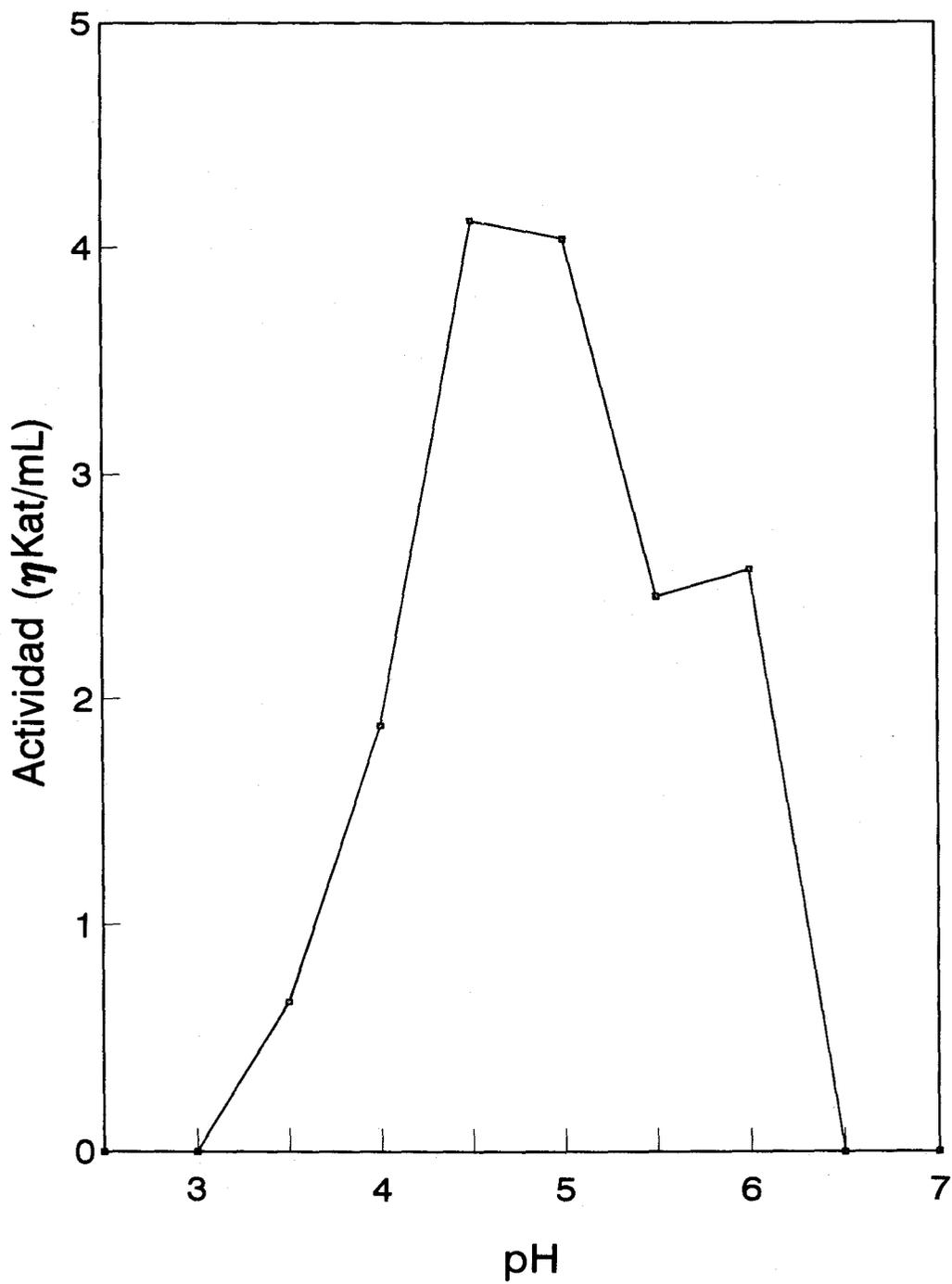


Fig. 26. Efecto del pH en  $\alpha$ -galactosidasa de pulpa de limón

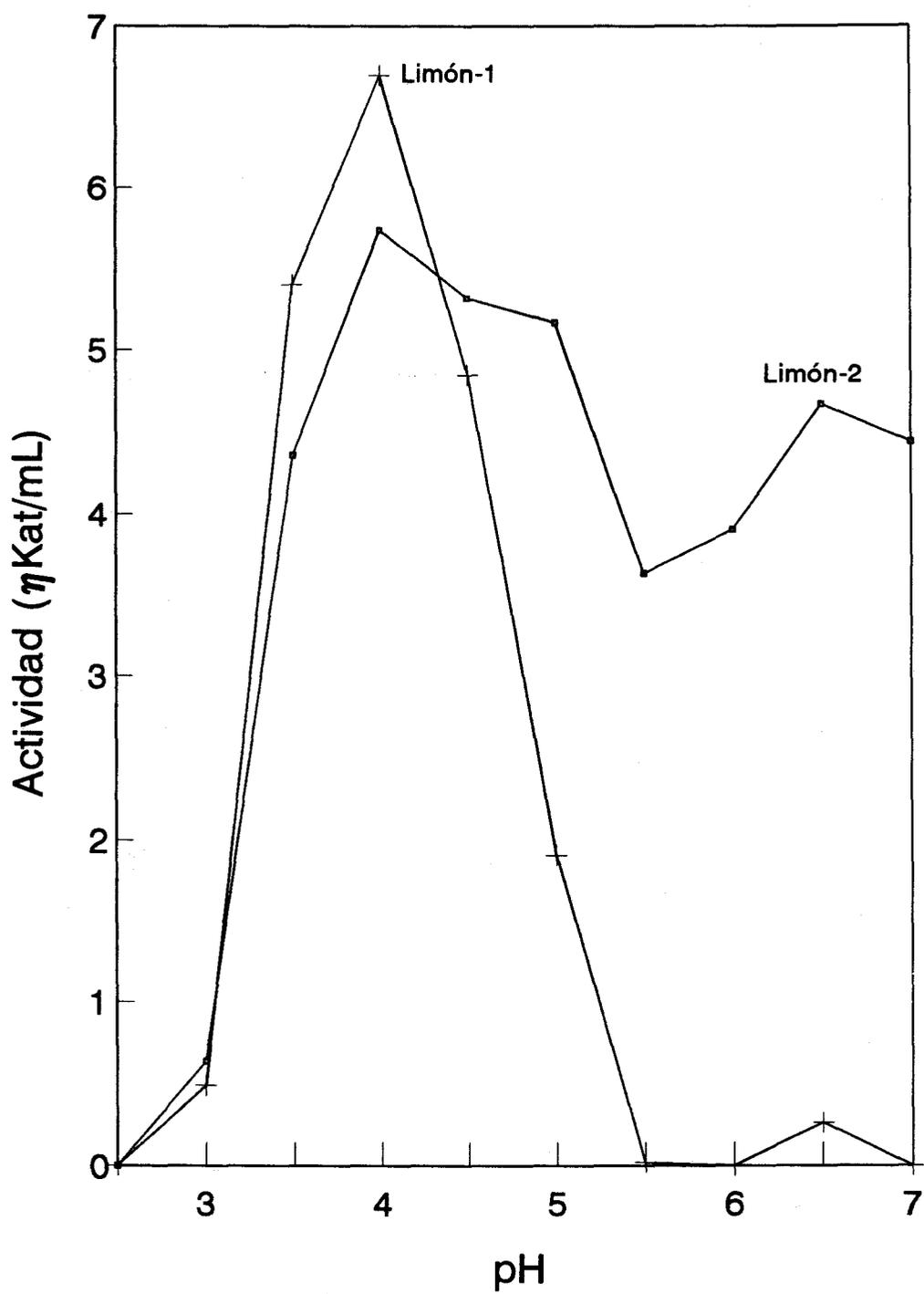
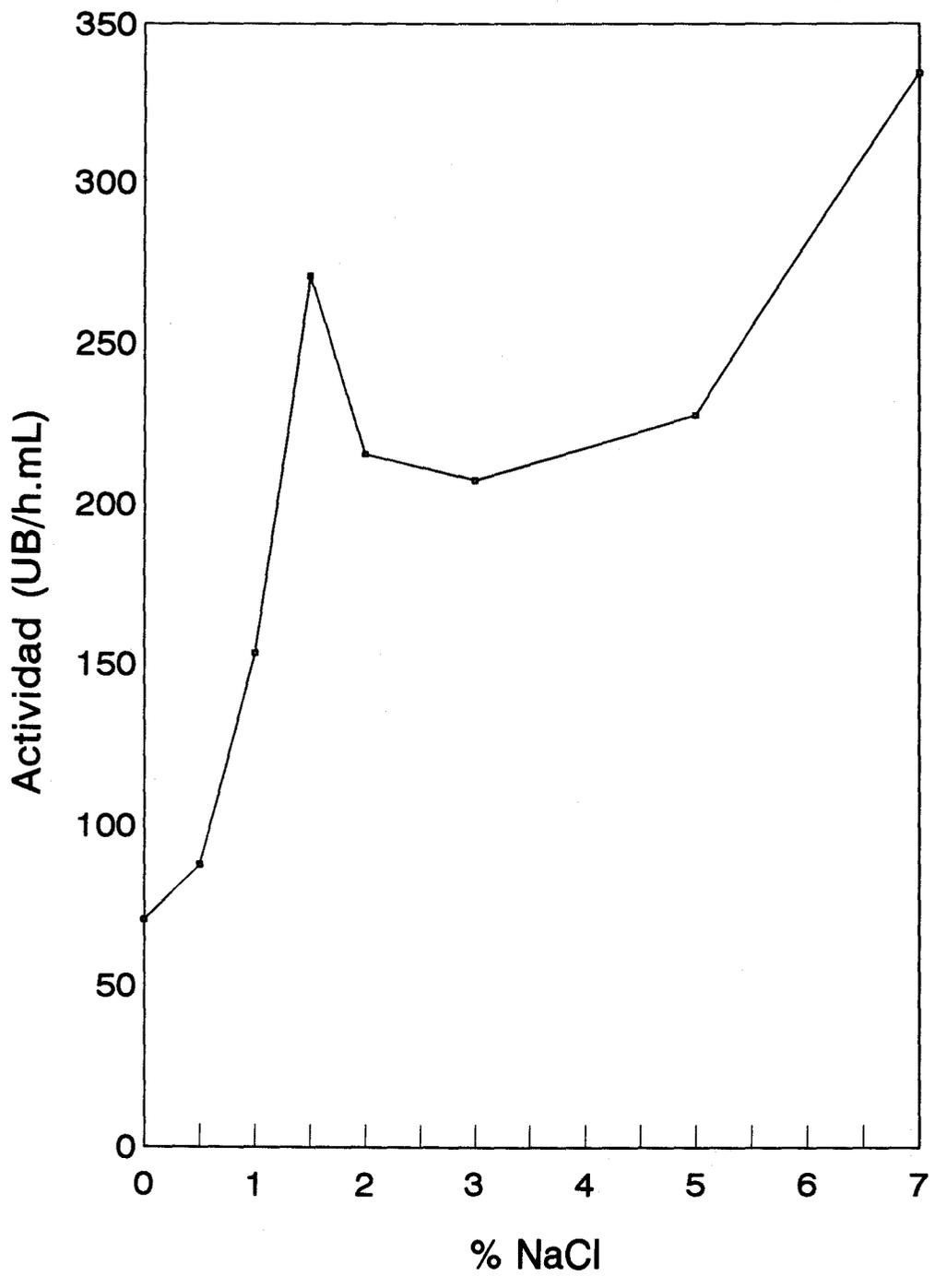


Fig. 27. Efecto del pH en  $\beta$ -galactosidasa de pulpa de limón



**Fig. 28. Efecto de la sal en celulosa de cáscara de limón**

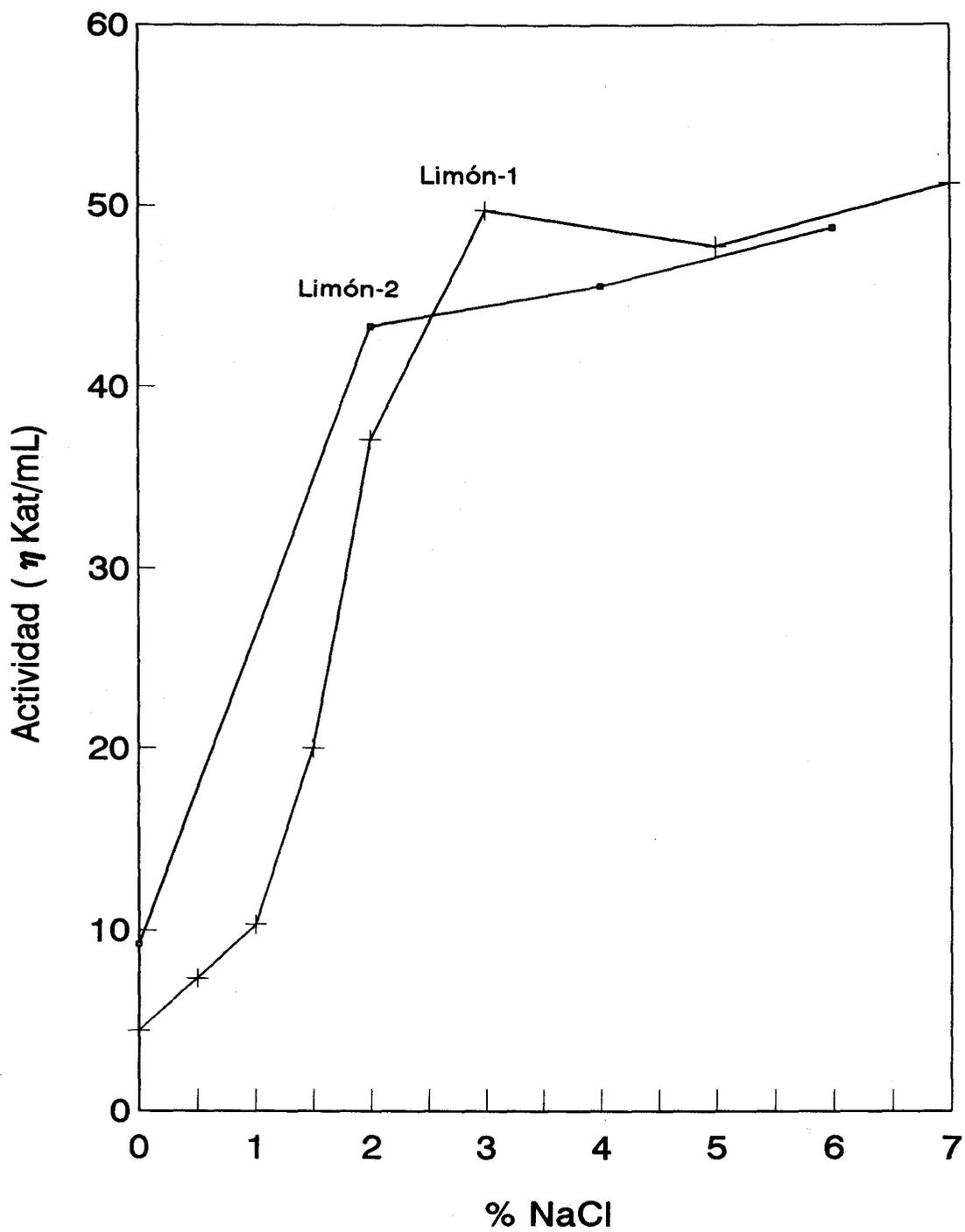


Fig. 29. Efecto de la sal en  $\alpha$ -galactosidasa de cáscara de limón

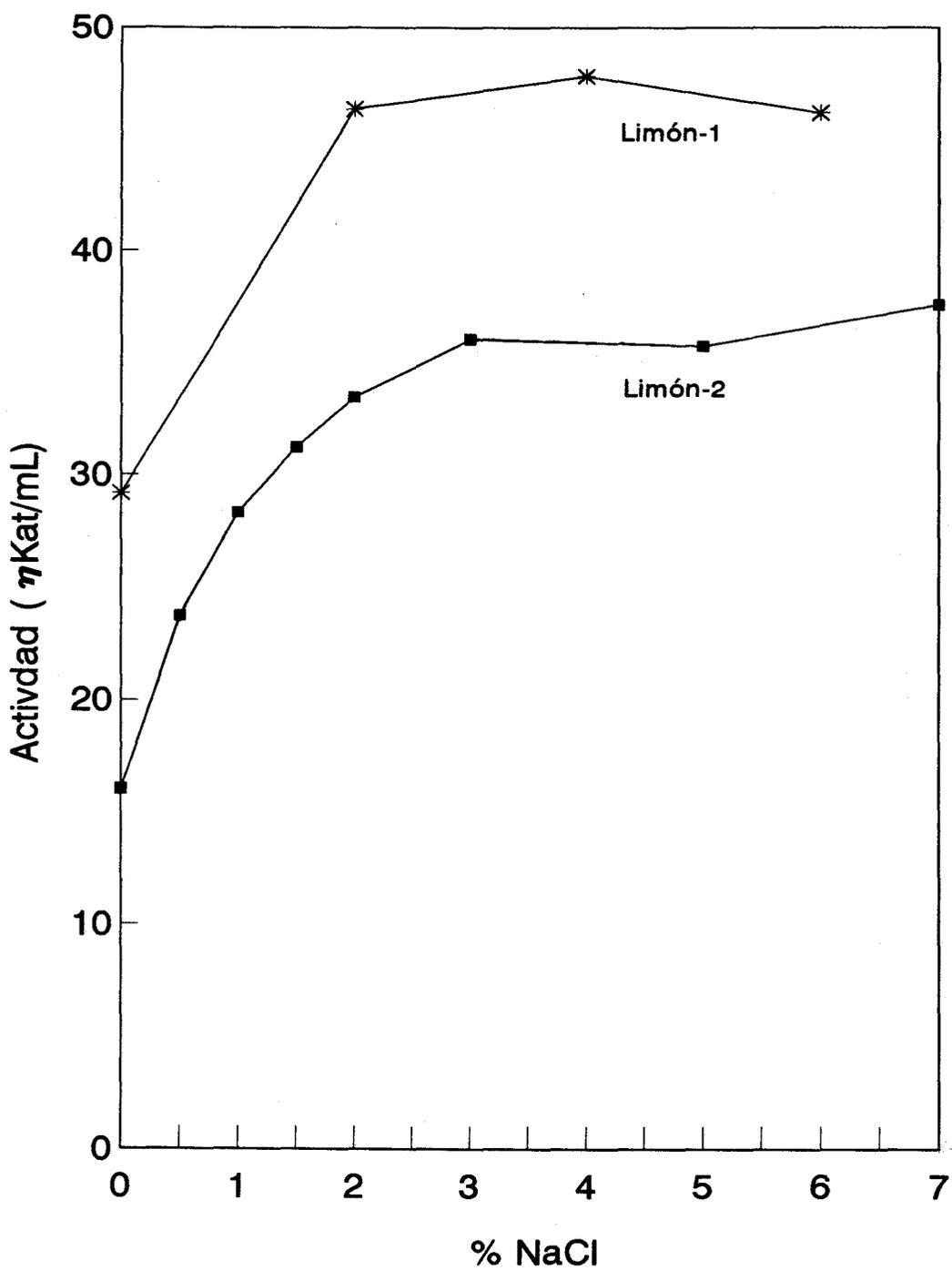


Fig. 30. Efecto de la sal en  $\beta$ -galactosidasa de cáscara de limón

coincidiendo su perfil de actividad con el obtenido para las  $\alpha$ -galactosidasas del ajo y siendo algo diferente que el de la pulpa de limón.

La extracción de la  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 30) también se favorece con la adición de sal, aunque en este caso la subida de actividad tiene lugar de forma mucho más suave hasta concentraciones del 2% permaneciendo, además, prácticamente constante a partir de esta concentración.

#### 6.2.2.2. Efecto del pH.

Los ensayos se han realizado utilizando 10 g de cáscara de limón en 25 mL de H<sub>2</sub>O, ajustando el pH a 5,5 con KOH 1 M, tras la adición de NaCl del 7%. Con objeto de estudiar el efecto del pH en la mezcla final, en el intervalo de 2,5 a 7,0 unidades, se han preparado los correspondientes sustratos próximos a esos valores de pH.

La actividad de celulasa es muy alta a bajos valores de pH (Fig. 31), de forma análoga a la de la pulpa de limón, produciéndose un brusco descenso en la misma a pH por encima de 3,0 unidades.

La actividad de  $\alpha$ -galactosidasa (Fig. 32), va aumentando a medida que lo hace el pH, apreciándose un máximo a pH 6,5, y siendo su perfil de actuación prácticamente idéntico al que se obtenía para la  $\alpha$ -galactosidasa del ajo.

La  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 33) presenta un máximo de actividad a pH 4,5, mucho más próximo al de la pulpa de limón que al del ajo, e incluso al obtenido para la  $\beta$ -galactosidasa de aceituna (Heredia et al 1993).

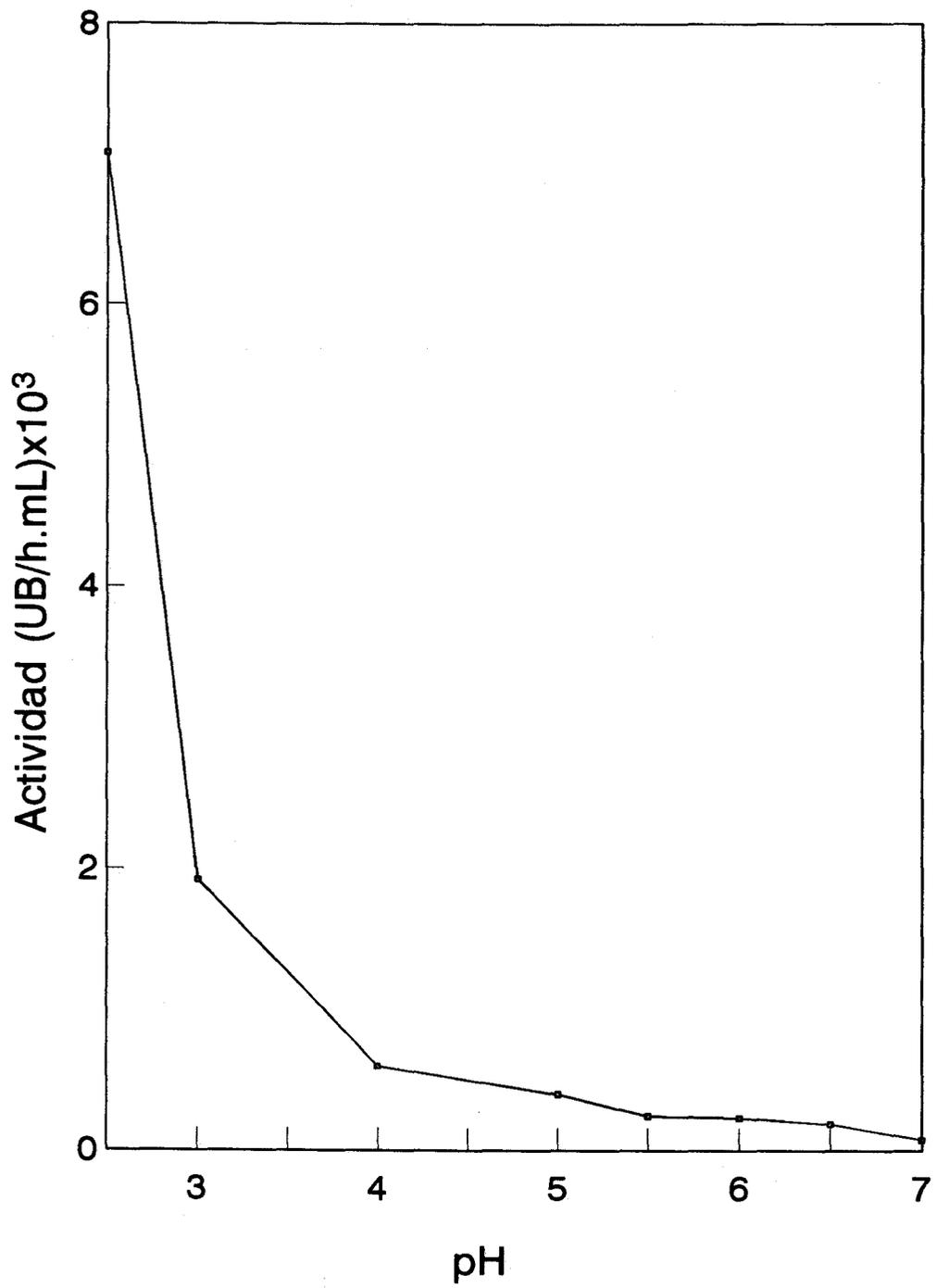


Fig. 31. Efecto del pH en celulasa de cáscara de limón

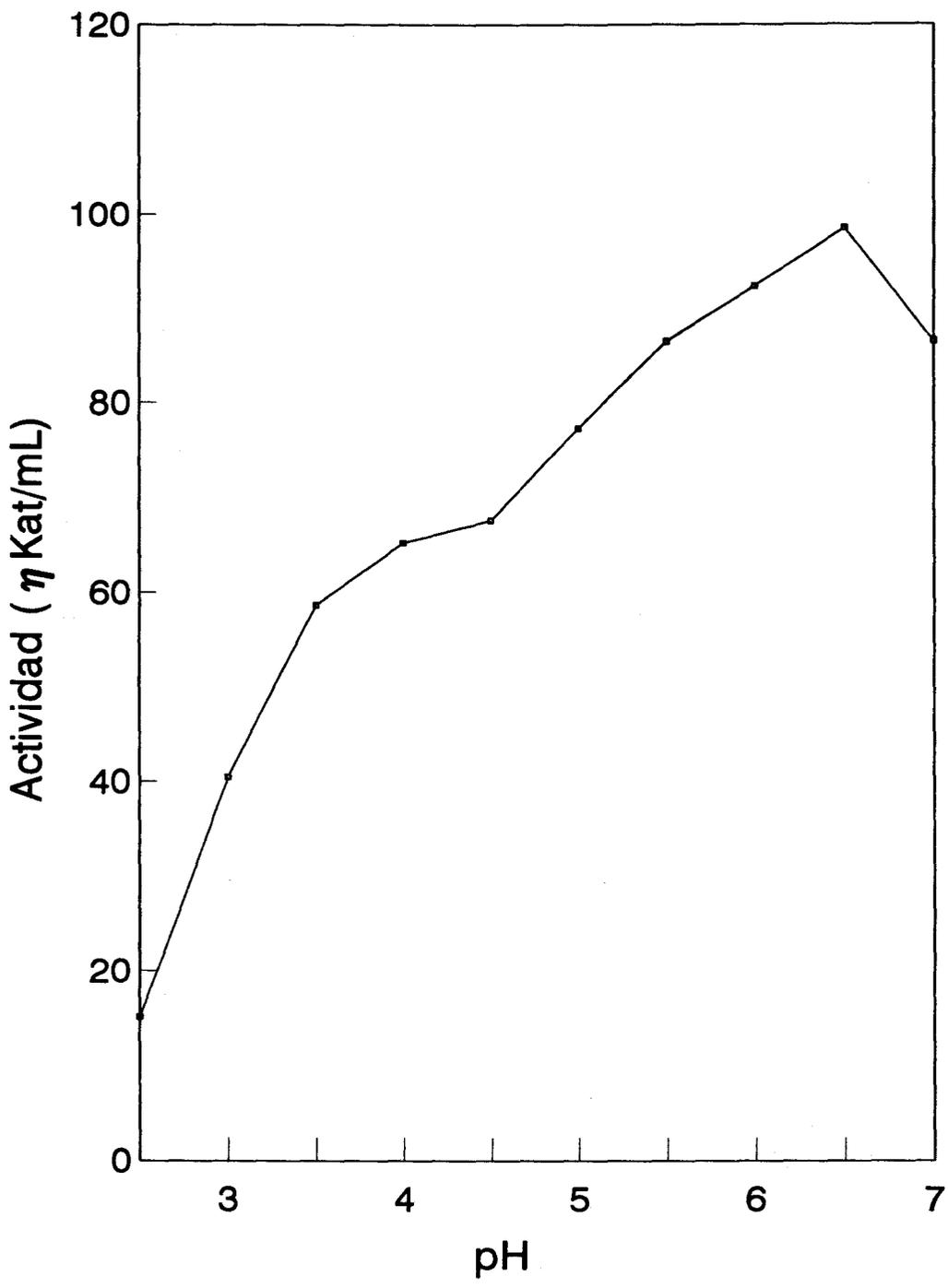


Fig. 32. Efecto del pH en  $\alpha$ -galactosidasa de cáscara de limón

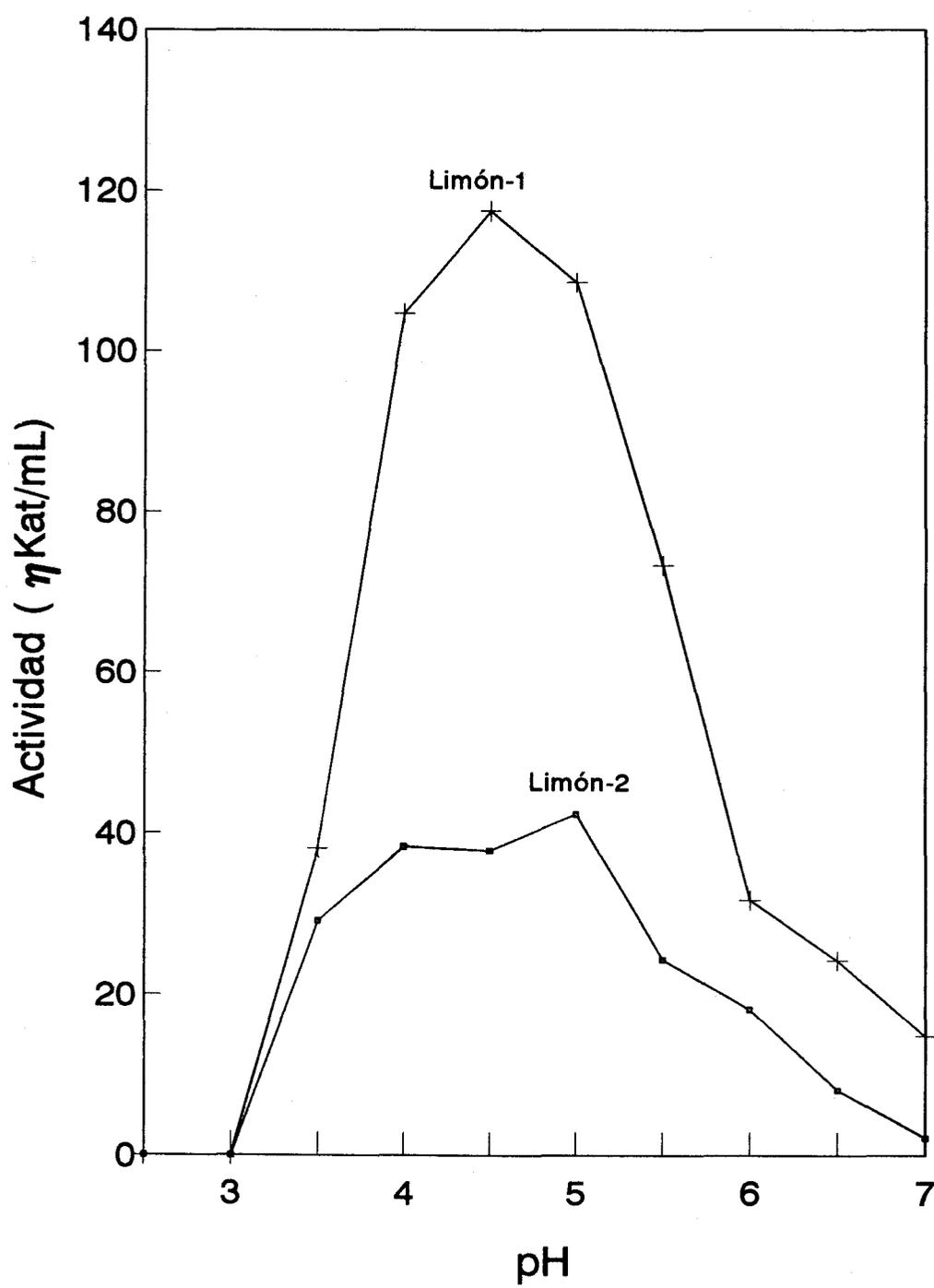


Fig. 33. Efecto del pH en  $\beta$ -galactosidasa de cáscara de limón

### 6.3. Resumen de la caracterización de estos enzimas.

En relación al efecto de la sal sobre la extracción y actuación de estos enzimas hay que destacar algunos aspectos que son comunes a algunos de los enzimas tanto del ajo como del limón y que pueden tener importancia en su efecto sobre las aceitunas aliñadas.

En general, la sal puede producir una drástica disminución de actividad a medida que aumenta su concentración o, lo que es lo mismo, a medida que aumenta la fuerza iónica del medio (Heredia et al. 1993), pero a su vez también puede favorecer la extracción de aquellos enzimas que están iónicamente enlazados a la pared celular (Fernández-Bolaños et al. 1995).

Del estudio realizado se puede concluir que después de producirse una cierta estimulación, más o menos notable de la actividad a concentraciones bajas de sal con casi todos los enzimas ensayados (1- 2% para la celulasa de ajo, cáscara y pulpa de limón, para la PGasa de pulpa de limón y para  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas del ajo y de la cáscara de limón), se produce una drástica disminución de actividad al ir aumentando la fuerza iónica, destacando la que se produce con la celulasa del ajo, de la cáscara y de la pulpa de limón, o con la  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa de pulpa de limón, que llegan a un mínimo con el 3% de sal, o la que se produce con la PGasa de la pulpa de limón con un mínimo al 5% de NaCl. La excepción a esta actuación la constituyen las  $\alpha$ -arabinosidasa y  $\beta$ -glucosidasa de ajo que se inactivan, incluso a partir del 0,5% de NaCl.

También se concluye que si se sigue aumentando la concentración de NaCl la actividad permanece más o menos constante, como por ejemplo las  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas del ajo, cáscara y pulpa de limón, o se favorecen enormemente caso de las celulasas y PGasas de ajo, cáscara y pulpa de limón, con lo que se está favoreciendo, sin duda, la extracción de todos aquellos enzimas más fuertemente enlazados a la pared.

Con todo ello, el NaCl que se utiliza en aceitunas aliñadas a una concentración que oscila entre un 2-9%, favorece la solubilización de estos enzimas procedentes de los componentes de los aliños y, en muchos casos, su actuación sobre la pared celular de las aceitunas.

En cuanto al pH de actuación de todos estos enzimas hay que destacar como norma general que las actividades de celulasas y PGasas del ajo, cáscara y pulpa de limón son más altas a pH muy ácidos, excepto para la PGasa del ajo cuyo óptimo de actuación se encuentra entre 5,5-6,0 unidades. En las glicosidasas detectadas coinciden prácticamente sus óptimos de actuación con el de las glicosidasas de aceitunas, encontrándose sus máximos entre 4,0-4,5 unidades en todos los casos, además de aparecer un segundo pico a pH 6,0-6,5 algo más pronunciado en la  $\alpha$ -galactosidasa de ajo y cáscara de limón y algo menos a la  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa de la pulpa de limón.

Los valores de pH que se suelen encontrar en las aceitunas aliñadas, que varían entre un 3,0 y 4,0 unidades, favorecen cualquier actuación de todos estos enzimas.

## **7. ESTUDIO DE PARED CELULAR**

De los tres estados de maduración de la aceituna, se ha seleccionado el fruto verde aliñado, porque en él se aprecian, con el tiempo de conservación, notables variaciones de textura entre 5 y 30°C.

Dado que las variaciones de textura están íntimamente relacionadas con los cambios de polisacáridos de la PC, en este apartado se hace un estudio de dichos cambios con objeto de complementar las investigaciones realizadas.

En la tabla 10 se recogen los azúcares neutros y ácidos urónicos cuantificados en las distintas fracciones de polisacáridos. Inicialmente, y como se ha indicado anteriormente, es lógico suponer que en los frutos conservados a 5°C las distintas reacciones enzimáticas se desarrollan con mucha más lentitud que en los conservados a 30°C, esto viene corroborado por el hecho de que los frutos conservados a 5°C poseen una textura de 93 N/g mientras que los conservados a 30 es de 58 N/g.

Analizando los datos se observa, en primer lugar, que el material de pared (suma de las distintas fracciones) de los frutos a 5°C tiene aproximadamente 4 mg/fruto más que conservados a 30°C, lo que indica que durante la conservación a esta temperatura se produce una cierta solubilización de polisacáridos que representa aproximadamente un 17% de los que se encuentran en los frutos a 5°C. La solubilización, por otra parte, es mayoritariamente de azúcares neutros, ya que se pierden aproximadamente tres veces más azúcares neutros que ácidos urónicos.

Analizando las distintas fracciones de polisacáridos (tabla 10), puede comprobarse que la de los polisacáridos solubles en carbonato es la que más carbohidratos pierde (disminuye casi por igual en ácidos urónicos y azúcares neutros) y la soluble en imidazol está ganando tanto azúcares neutros como ácidos urónicos. La fracción de polisacáridos solubles en KOH al 4% pierde fundamentalmente azúcares neutros, mientras que la soluble en KOH del 24% no cambia durante la conservación.

*Por tanto se puede concluir que durante la conservación existe una cierta solubilización de azúcares neutros de polisacáridos solubles en carbonato y KOH del 4% junto con un cierto trasvase de polisacáridos a la fracción soluble en imidazol.*

Analizando las cantidades de los distintos azúcares individuales que constituyen estas fracciones (tabla 11) se ven los siguientes cambios:

- a) Se produce una pérdida sustancial de glucosa de la fracción de polisacáridos

	5°C			30°C			BALANCE		
IMI	0.80	1.69	2.49	1.24	2.45	3.69	0.44	0.76	1.20
CAR	2.55	6.13	8.68	0.90	4.40	5.30	-1.65	-1.73	-3.38
KOH 1M	3.36	0.14	3.50	1.95	0.02	1.97	-1.41	-0.12	1.53
KOH 4M	6.07	0.00	6.07	6.28	0.00	6.28	0.11	0.00	0.11
TOTAL 1	12.78	7.96	20.74	10.37	6.87	17.24	-2.62	-1.09	-3.71
CEL	---	---	11.21	---	---	6.25	-4.96	---	---
TOTAL 2	---	---	31.95	---	---	23.49	8.46	---	---

**Tabla 10. Composición en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg azúcares/fruto) de las distintas fracciones de polisacáridos obtenidos a partir de la pared celular de las aceitunas verdes aliñadas. Balance de azúcares entre las conservadas a 5 y 30°C para cada fracción.**

		Ur	Glc	Gal	Man	Xil	Ar	Fuc	Ra	Ur/ra
IMI	5°C	1640	94	82	66	90	422	---	50	33
	30°C	2450	74	121	35	79	823	---	105	23
CAR	5°C	6130	---	211	---	150	1908	---	286	21
	30°C	4400	29	89	9	48	657	---	87	51
KOH 1M	5°C	140	536	---	---	1609	594	199	---	---
	30°C	18	323	9	52	833	467	---	79	---
KOH 4M	5°C	---	1570	670	948	1892	843	---	143	---
	30°C	---	1816	789	927	1520	1113	---	122	---

**Tabla 11. Composición glicosídica de las distintas fracciones de polisacáridos para aceitunas verdes aliñadas, conservadas a 5°C y 30°C.**

solubles en KOH del 4% (del orden de 0,2 mg/fruto). A juzgar por la composición de esta fracción (presencia de xilosa, galactosa y fucosa) es muy probable que la pérdidas de glucosa se deban a la solubilización de xiloglucanas; esto se corrobora por el hecho de que en esta misma fracción también se pierden cantidades apreciables de fucosa, xilosa y galactosa. Además, se puede afirmar que la solubilización de xiloglucanas se produce a la salmuera de conservación, puesto que no aparecen en ninguna otra fracción de polisacáridos.

b) La xilosa se pierde en parte como constituyente de las xiloglucanas indicadas en a), pero también se da una importante solubilización de xilanas puesto que en total se pierden aproximadamente 0,8 mg/fruto de xilosa de la cual sólo 0,2 como máximo podrían formar parte de xiloglucanas (se pierden 0,2 mg/fruto de glucosa). La solubilización de estas xilanas es probablemente también la causante de la disminución de arabinosa. Al igual que ocurre con las xiloglucanas, la solubilización de arabinoxilanas debe ser a las salmueras de conservación porque los azúcares que la constituyen no se recuperan en ninguna otra fracción.

c) Cuantitativamente, las pérdidas más importantes que se producen en la fracción de polisacáridos solubles en carbonato son la de ácidos urónicos (1,7 mg/fruto) y arabinosa (1,2 mg/fruto). Se puede concluir, por tanto, que de esta fracción se pierden fundamentalmente polisacáridos pécticos ricos en arabinosa.

d) Observando que la relación ácidos urónicos/ramnosa en los frutos conservados a 5°C es de 21, mientras que en los conservados a 30°C es de 51, se deduce que la solubilización que tiene lugar durante la conservación a 30°C es preferencialmente de las zonas ramificadas de los polisacáridos pécticos, dato que es compatible con el hecho de que estén acompañados de importantes cantidades de arabinanas como cadenas laterales. Una parte de estos polisacáridos (0,9 mg/fruto de ácidos urónicos y 0,8 mg/fruto de arabinosa) se pierden en las salmueras, dado que no se recuperan en ninguna otra fracción, mientras que otra parte (0,8 mg de ácidos urónicos y 0,4 mg/fruto de arabinosa) se recupera en la fracción soluble en

imidazol.

e) El cambio fundamental que ocurre en la fracción de polisacáridos solubles en imidazol, es la incorporación de polisacáridos pécticos ricos en arabinosa procedentes de la fracción de los solubles en carbonato. El hecho de que la relación ácidos urónicos/ramnosa disminuya desde 33 a 23 confirma el hecho de que se están incorporando polisacáridos pécticos, con mayor proporción de ramnogalacturonanas.

*Se puede concluir, por tanto, que como consecuencia del proceso de conservación de la aceituna aliñada, a 5°C y 30°C se degradan principalmente xiloglucanas y xilanas como polisacáridos neutros y polisacáridos pécticos ricos en arabinosa.*

La degradación de xiloglucanas se produce hasta oligosacáridos que difunden a las salmueras de conservación. Está claro que en este tipo de degradación deben intervenir glicosidasas solas, o en unión de endoglucanasa, puesto que esta última por sí sola no podría degradar en tal extensión estos polisacáridos, ya que la endoglucanasa sólo es capaz de romper enlaces glicosídicos entre glucosas no sustituidas.

La degradación que sufren las arabinoxilanas es muy interesante puesto que de los enzimas que podrían ser responsables de su degradación, xilanasas, xilosidasa y arabinosidasa, sólo esta última se ha encontrado presente en la aceituna, mientras que las otras dos no se encuentran ni en esta ni en ninguno de los aliños utilizados. La acción de la arabinosidasa en solitario, sin embargo, podría degradar las unidades de arabinosa que están presentes como sustituyentes de la xilosa; esto cambiaría drásticamente la capacidad de estos polisacáridos de formar puentes de hidrógeno con la celulosa y, por lo tanto, en contra de lo sugerido anteriormente, es posible que desaparezcan de la fracción soluble en KOH del 4%, no por solubilización en la salmuera sino por unión a las fibrillas de celulosa. Este tipo de intercambio de xilanas entre polisacáridos solubles en KOH y la fracción de celulosa se ha observado

anteriormente al analizar los cambios que tienen lugar durante la fermentación láctica de aceituna de mesa aderezada (Jiménez et al, 1995).

La degradación de polisacáridos pécticos puede ser el resultado de la acción de las PGasas, no obstante, la acción de éstas debería liberar preferencialmente homogalacturonanas y, de acuerdo con nuestros resultados, en este caso está liberando preferencialmente ramnogalacturonanas, por lo que es posible que además de la acción de PGasas exista algún otro tipo de mecanismo de actuación. Por último, algunos autores (Deveau et al, 1993) han demostrado que la acción de  $\beta$ -galactosidasa sobre polisacáridos pécticos modifica su conformación e impide que puedan formar agregados macromoleculares lo que eventualmente podría llevar a su solubilización; sin embargo en la aceituna aliñada no se observa una disminución importante de galactosa en estos polisacáridos pécticos porque, si bien es cierto que existe una disminución de galactosa en la fracción de polisacáridos solubles en carbonato, ésta se recupera en la fracción soluble en imidazol.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Durante la conservación de aceitunas verdes aliñadas se originan cambios de textura, observándose diferencias significativas entre las mantenidas a 5 y 30°C.
2. Las aceitunas en estado color cambiante y moradas experimentan disminución de su textura, debida fundamentalmente a los componentes de los aliños.
3. Los enzimas responsables de las pérdidas de textura actúan en los tres estados de maduración: a medida que el fruto está más maduro, la acción de los enzimas se aprecia antes por la mayor accesibilidad de la pared celular.
4. En las salmueras de aceitunas aliñadas se han detectado actividades de celulasa, poligalacturonasa y  $\alpha$ -galactosidasa.
5. Los enzimas procedentes de ajo y limón -componentes mayoritarios del aliño- son capaces de salir al medio y actuar sobre las aceitunas, modificando su textura.
6. Las concentraciones de NaCl y los valores de pH de las aceitunas aliñadas favorecen la actuación de los enzimas procedentes de los componentes de los aliños.
7. Los principales cambios que tienen lugar en la pared celular de aceitunas verdes aliñadas, conservadas a 5 y 30°C, son una degradación de polisacáridos hemicelulósicos xilanas y xiloglucanas y de polisacáridos pécticos ricos en arabinosa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Albersheim, P., Bauer, W.D., Keegstra, K., Talmadge, K. W. (1972). The structure of the walls of suspension- cultured sycamore cells. En: *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharide*. Loewus F. (ed). Academic Press. New York. pp. 117-147.

Aspinall, G.O. (1983). Classification of polysaccharides. *The Polysaccharides* 2. Aspinall GO (ed). Academic Press. New York. pp. 1-9.

Awad, M. y Young, R.E. (1979). "Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectin methyl esterase in avocado fruits in relation to respiration and ethylene production". *Plant Physiol.*, 64, 306-308.

Bauer, D., Talmadge, K.W., Keegstra, K. , Albersheim, P.(1973). "The structure of plant cell walls II. The hemicellulose of the walls of suspension cultured sycamore cells". *Plant Physiol.*, 51, 174-187.

Bell, T.A., Etchells, J.L., Jones, I.D. (1950). "Softening of comercial salt-stock in relation to polygalacturonase activity". *Food Technol.*, 4, 157.

Bertin, C., Rouau, X., Thibault, J.F. (1988). "Structure and properties of sugar beet fibres". *J. Sci. Food Agric.*, 44, 15-29.

Bartley, J.M., Knee, M. (1982). "The chemistry of textural changes in fruit during storage" *Food Sci.*, 9, 47-58.

Brady, C.J. (1987). "Fruit ripening". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38, 158-178.

Borbolla y Alcalá, J.M. (1972). "Estudio sobre preparación de distintos tipos de aceitunas verdes aderezadas con especial atención a su conservación". En informe privado.

Borbolla y Alcalá, J.M. (1977). "Aceitunas estilo sevillano con distintos sabores". En informe privado.

Brenes, M., García, P., Garrido, A. (1994). "Influence of salts and pH on the firmness of olives in acid conditions". *J. Food Quality* 17, 335-346.

Brett, C., Waldron, K. (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. Serie: Topics in Plant Physiology 2. Black M. y Chapman J. (eds). Unwin Hyman, Boston, pp. 4-51.

Brillouet, J.M., Mercier, C. (1981). "Fractionation of wheat bran carbohydrates". *J. Sci. Food Agric.*, 32, 243-251.

Buescher, R.W., Hudson, J.M. (1984). "Softening of cucumber pickles by Cx-cellulase and its inhibition of calcium". *J. Food Sci.*, 49, 954-955.

Buescher, R.W., Hudson, J.M., Adams, J.R. (1979). "Inhibition of polygalacturonase softening of cucumber pickles by calcium chloride.- *J. Food Sci.* 44, 1786-1787.

Buescher, R. W., Hudson, J. M., Adams, J. R. (1981). "Utilization of calcium to reduce pectinolytic softening of cucumber pickles in low salt conditions". *Lebensm. Wiss.v Technol.* 14, 65-67.

Burns, J.K. (1990). " $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities in juice vesicles of stored Valencia oranges". *Phytochemistry*, vol 29, n° 8, pp. 2425-2429.

Cassab, G.I., Varner, J.E.(1988). "Cell wall proteins". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 321-353.

Castillo Gómez, J., Mínguez Mosquera, M.I., Fernández Díez, M.J. (1978).

"Presencia de poligalacturonasa (PGasa) y su relación con el ablandamiento en algunos productos empleados en la industria del aderezo (pimientos y aceitunas)". *Grasas y Aceites*, vol 29, n° 2, pp. 97-101.

Consejo Oleícola Internacional. (1980). Norma cualitativa unificada aplicable a las aceitunas de mesa en el comercio internacional. T/OT/Doc. 1.5. Madrid.

Costilow, R.N., Gates, K., Lacy, M.L. (1980). "Molds in brined cucumbers: cause of softening during air purging of fermentations". *Appl. Exper. Microbiol.* 40, 417-423.

Dababneh, B.F.A., Al-Delainy, K.S. (1984). "Inhibition of *St. aureus* by garlic extract". *Lebensm. Wiss. Technol.* 17, 29-31.

Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P., Delmer, D.P. (1980). The primary cell walls of flowering plants. En: *The Biochemistry of Plant*. 1. Tolbert NE (ed). Academic Press. New York. pp. 92-162.

De Veau, E.J., Gross, K.C., Huber, D.J. y Watada, A.E. (1993). "Degradation and solubilization of pectin by  $\beta$ -galactosidase purified from avocado mesocarp". *Physiol. Plant.*, 87, 279-285.

Düsterhoft, E.M., Voragen, A.G.J. (1991). "Non-starch polysaccharides from sunflower (*Helianthus annuus*) meal and palm kernel (*Elaeis guineensis*) meal-preparation of cell wall material and extraction of polysaccharide fractions". *J. Sci. Food Agric.*, 55, 411-422.

Englyst, H.N. y Cumming, J.H. (1984). "Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-chromatography of constituent sugars as alditol acetates". *Analyst*, 109, 937-942.

Fernández, M.J. (1985). *Biotechnology de la Aceituna de Mesa*. Publicaciones CSIC. Sevilla-Madrid, pp 55-123.

Fernández, M.J. y Vidal, A. (1968). "Determinaciones de textura en aceitunas. Las pruebas de compresión-cizallamiento". *Grasas y Aceites*, 19, 199-204.

Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Guillén, R., Castro, A., Durán, C. (1992). "Evolution of endoglucanase activity in olives during ripening and storage and its relationship with cellulolytic microorganisms". *Z. Lebensm Unters Forsch*, 195, 451-454.

Fernández-Bolaños, J., Rodriguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A. (1995). "Activity of cell wall associated enzymes in ripening olive fruit". *Physiol. Plant*. 93, 651-658.

Fleming, H. P, Thompson, R. L., Bell, T. A., Hontz, L. H. (1978). "Controlled fermentation of sliced cucumbers" *J. Food Sci.*, 43, 888-891.

Fry S.C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Wilkins M (ed). Longman Scientific and Technical, London.

Garrido, A. (1991). *Elaboración de Aceitunas de Mesa*. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO nº 81. Roma.

Garrido, M.D., Jordano, R., Martínez, P., Jodral, M. y Pozo, R. "Contaminación fúngica de especias comerciales". *Alimentaria*, Enero-Febrero 1988 pp. 81-84.

Ghaunoum, H.A. (1989). "Studies on the anticandidal mode of activ of *Allium stativus* (garlic)". *J. General Microbiol.*, 134, 2917-2924.

Gil-Serrano, A., Mateos-Matos, I., Tejero-Mateo, M.P. (1986). "Acidic xylan from olive pulp". *Phytochemistry*, 25, 2653-2654.

Giovannoni, J.J., Della Penna, D., Bernnet, A.B., Fischer, R.L. (1989). *Plant Cell* 1, 53.

Gross, K.C. y Sams, C.E. (1984). "Changes in cell wall neutral sugars composition during ripening: a species survey". *Phytochemistry*, 23, 2457-2461.

Gross, K.C., Watada, D.E., Kang, M.S., Kim, S.D., Kim, K.S., Lee, S.W. (1986). "Biochemical changes associated with the ripening of hot pepper fruit". *Physiol. Plant*, 66, 32-36.

Hainrihar, G. (1991). "Spice oleoresinas: production, benefits and application". *Food Ingredients*, 4, 52-57.

Hatfield, R.D. (1993). Cell wall polysaccharide interactions and degradability. En: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD and Ralph J (eds). ASA/CSSA/SSSA. Madison, Wisconsin, USA. pp. 285-313.

Hayashi, T., Baba, K., Ogawa, K. (1994). "Macromolecular complexes of xyloglucan and cellulose obtained by annealing". *Plant Cell Physiol.*, 35, 219-223.

Heredia, A., Fdez-Bolaños, J., Guillen, R. (1991). "Identification of endoglucanases in olives (*Olea europaea arolensis*)". *Z. Lebensm. Unters Forsch* 193, 554-557.

Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J. (1992). "Olive fruits glycosidase factors affecting their extraction" *Z. Lebensm. Unter Forsch*, 194, 561-565.

Heredia, A., Guillén, R., Jimenez, A., Fdez-Bolaños, J. (1993). "Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit". *Z. Lebensm. Unters Forsch* 196, 147-151.

Huber, D.J. (1983a). "The role of cell wall hydrolases in fruit softening". *Hortic. Rev.*, 5, 169-219.

Huber, D.J. (1983b). "Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit". *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 108, 405-409.

Huber, D.J. (1984). "Strawberry fruit softening: the potential role of polyuronides and hemicelluloses" *J. Food Sci.*, 49, 1310-1315.

Huber, D.J. y O'Donoghue, E.M. (1993). "Polyuronide in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening". *Plant Physiol.*, 102, 473-480.

Hudson, J.M., Buescher, R.W. (1985). "Pectic substances and firmness of cucumber pickles as influenced by CaCl<sub>2</sub>, NaCl and brine storage". *J. Food Biochem.*, 9, 211-229.

Huystee, R.B., Zheng, X., Wan, L., Esnault, R. (1992). "Peroxidase, a cell wall enzyme". Sixth Cell Wall Meeting. Sassen MMA, Derksen JWM, Emons AMC and Wolters-Arts AMC (eds). University Press. Nijmegen. p. 239.

ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológicas. Editorial Acribia, Zaragoza (1983).

Jiménez, A., Guillén, R., Sánchez, C., Fernández-Bolaños, J. y Heredia, A. (1995). "Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during

*Spanish green olive processing*". J. Agric. Food Chem. En prensa.

Jiménez Araujo, A.J. (1993). Tesis Doctoral. " Modificación de la PC de aceitunas (Variedades Hojiblanca y Manzanilla) durante su elaboración". Universidad de Sevilla.

Juven, B.J., Lindner, P., Weisslowicz, H. (1985). "Pectin degradation in plant material by Leuconostoc mesenteroides". J. Appl. Bact., 58, 533-538.

Koller, A., O'Neill, M.A., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1991). "A comparison of the polysaccharides extracted from dried and non-dried walls of suspension-cultured sycamore cells". Phytochemistry, 30, 3903-3908.

Labavitch, J.M. (1981). "Cell wall turnover in plant development". Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 385-406.

Lorences, E.P. y Fry, S.C. (1993). "Xyloglucan oligosaccharides acting as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase, promote the depolymerisation of xyloglucan". Physiol. Plantarum, 88, 105-112.

Mabusela, W.T., Stephen, A.M., Botha, M.C. (1990). "Carbohydrate polymers from *Aloe ferox* leaves". Phytochemistry, 29, 3555-3558.

Manzi, A.E., Ancibor, E., Cerezo, A.S. (1990). "Cell-wall carbohydrates of the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*". Plant Physiol., 92, 931-938.

March, L., Ríos, A. (1989). El libro del aceite y la aceituna. Alianza Editorial S.A.

Martínez, P., Jodral, M., Garrido, M.D., Jordano, R. y Pozo, R. "Identificación de Aspergillus Flavus toxigénico en especias comerciales".

Alimentaria. Enero-Febrero 1988. pp. 85-86.

McCann, M.C., Wells, B., Roberts, K. (1992). Complexity in the spatial localization and length distribution of plant cell-wall matrix polysaccharides". *J. Microscopy*, 166, 123-136.

McCollum, T.G., Huber, D.J., Cantiffle, D.J. (1989). "Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit ripening". *Physiol. Plant.*, 86, 303-308.

McFeeters, R.F., Bell, T.A., Fleming, H.P. (1980). "An endopolygalacturonase in cucumber fruit". *J. Food Biochem.*, 4, 1-16.

McFeeters, R.F., Fleming, H.P. (1991). "pH effect on calcium inhibition of softening of cucumber mesocarp tissue". *J. Food Sci.*, 56, 730-732.

McNeill, M., Darvill, A. G., Fry, S.C. Albersheim, P. (1984). "Structure and function of the primary cell walls of plants". *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 625-663.

Meurer, P., Gieschner, K. (1992). "Occurrence and effect of indigenous and eventual microbial enzymes in lactic acid fermented vegetables". *Acta Alimentaria*, 21, 171-188.

Mínguez Mosquera, M.I. (1982). "Evolución de los constituyentes pécticos y de los enzimas pectinolíticos durante el proceso de maduración y almacenamiento de la aceituna Hojiblanca" *Grasas y Aceites*, 33, 327-333.

Mínguez, M.I., Castillo, J., Fdez, M.J. (1978). "Assays of calcium ion captation and its relationship with texture in ripe black olives". *Grasas y Aceites*, 29, 417-422.

Naohara, J., Manabe, M. (1994). "Molecular mass and solubility changes in pectins during storage of Satsuma mandarin fruits (*Citrus unshiu* Marc.)". J. Food Sci., vol 59, n° 3, pp. 578-581.

O'Donoghue, E.M., Huber, D.J. (1992). "Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assesment of the role of Cx-cellulase". Physiol. Plant., 86, 33-42.

Paull, R.E. y Chen, N.J. (1983). "Postharvest variation in cell wall degrading enzymes of papaya during fruit ripening". Plant. Physiol., 72, 382-385.

Ranwala, A.P., Suetmatsu, C. y Masuda, H. (1992). "The role of  $\beta$ -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening". Plant Physiol., 100, 1318-1325.

Redgwell, R.J., Fry, S.C. (1993). "Xyloglucan transglycosylase activity increases during kiwifruit ripening". Plant. Physiol., 103, 1399-1406.

Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Venta de las Aceitunas de Mesa. (1983). B.O.E. n° 108, 6 Mayo, pp 12619-12625. Madrid.

Ryden, P., Selvendran, R.R. (1990). "Cell wall polisacarides and glycoproteins of parenchymatous tissues of runner bean (*Phaseolus coccineus*)". Biochem. J., 269, 393-402.

Saeman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L., Millet, M.A. (1954). "Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography". TAPPY 37, 336-343.

Sakellaris, G., Nikolaropoulos, S., Evangelopoulos, A. E. (1988). "Polygalacturonase biosynthesis by Lactobacillus plantarum". *J. Appl. Bact.* 65, 397-404.

Salmeron, J. (1988). Alteración de los alimentos por los mohos. Métodos de control. En: *Mohos en los Alimentos. Asociación de Científicos y Tecnólogos de los Alimentos de Andalucía* (eds), pp. 21-28.

Saraza, M.R., Gonzalez, T. y Salas, J. "Condimentos y especias, estado actual en el control de calidad". *Alimentación, equipos y tecnología. Enero-Febrero 1993.* pp. 85-89.

Selvendran, R.R. y Riden, P. (1990). Isolation and analysis of plant cell walls. En: *Methods in Plant Biochemistry. Vol 2. Carbohydrates.* Dey PM (ed). Academic Press. New York. pp. 549-579.

Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications.* Academic Press, Inc. San Diego, California.

Smith, C.J.S., Watson, C.F., Mouris, P.C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Schuch, W., Harding, S., Grierson, D. (1990). "Inheritance and effect of ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes". *Plant. Mol. Biol.* 14, 369-376.

Southgate, D.A.T. (1990). *Determination of Food Carbohydrates.* Elsevier Applied. Science. London and New York.

Stephen A.M. (1983). Other plant polysaccharides. En: *The Polyssaccharides.* Aspinall GO (ed), vol. 2, pp. 97-193. Academic Press. New York.

Stevens, B.J.H., Selvendran, R.R. (1980). "The isolation and analysis of cell wall material from the alcohol-insoluble residue of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). J. Sci. Food Agric., 31, 1257-1267.

Stoddart, R.W. (1984). The biosynthesis of polysaccharides. Sidney. Croom Held Lyd.

Taiz, L. (1984). "Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties". Ann. Rev. Plant. Physiol., 98, 357-368.

Tong, C.B. y Gross, K.C. (1988). "Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening". Plant., 155, 64-67.

Van Buren J.P. (1979). "The chemistry of texture in fruits and vegetables" J. Texture Studies, 10, 1-23.

Van Buren, J.P., Kean, W.P., Wilkison, M. (1988). "Influence of salts and pH on the firmness of cooked snap beans in relation to the properties of pectin". J. Texture Studies, 19, 15-25.

Vaughn, R.H., Stevenson, K.E., Dave, B.A., Park, H.C. (1972). "Fermenting yeasts associated with softening and gas-pocket formation in olives". Appl. Microbiol., 23, 316-320.

Von Campe, G. (1990). Esencias cítricas desterpenadas. En: Dragoco report. Informaciones sobre sabores 1, pp. 3-17.

Walter, W. M. Jr., Fleming, A.P., Trigiano, R.N. (1985). "Comparison of the microstructure of firm and stem-end softened cucumber pickles preserved by brine fermentation". Food microstructure, Vol 4. pp. 163-172. AMF o'Hara (Chicago).

Wilson, J.R. (1993). "Organization of forage plant tissues". En: Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD and Ralph J (eds). Madison, Wisconsin, USA. pp. 1-32.

York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M.; Stevenson, T.T., Albersheim, P. (1986). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. En: Methods in Enzymology. Vol 18. Plant Molecular Biology. Weissbach A. y Weissbach H. (eds). Academic Press. Orlando, Florida. pp.3-40.

Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H., Nakagaw, S. (1987). "Antifungal activity of ajoene derived from garlic". Applied and Envirom Microbiol 53, 615-617.