



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA, AMBIENTAL Y DE LOS
MATERIALES

TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS
DEL FRUTO Y LAS CONDICIONES DE
PREPARACIÓN DE LA PASTA DE ACEITUNA,
EN EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA
VIRGEN**

PRESENTADA POR:
ABIR SADKAOUI

DIRIGIDA POR:
DR. D. GABRIEL BELTRÁN MAZA
DR. D. ANTONIO JIMÉNEZ MÁRQUEZ
DR. D. RAFAEL PACHECO REYES

JAÉN, 24 DE MARZO DE 2017

ISBN 978-84-9159-115-3



UNIVERSIDAD DE JAÉN

INFLUENCE OF FRUIT CHARACTERISTICS AND OLIVE PASTE PREPARATION CONDITIONS ON PROCESS YIELD OF VIRGIN OLIVE OIL

PhD Thesis

Abir Sadkaoui

Jaén, febrero 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN

RAFAEL PACHECO REYES, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, miembro del Grupo de Investigación Bioprocesos (TEP-138) de la Universidad de Jaén y Tutor de Dña. **ABIR SADKAOUI**.

INFORMA:

Que el trabajo recogido en la presente Memoria, titulado: ***Influencia de las características del fruto y condiciones de preparación de la pasta de aceituna, en el rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen***, ha sido realizado por Dña. Abir Sadkaoui, en los laboratorios del Centro IFAPA Venta del Llano de Mengíbar (Jaén), área Postcosecha e Industria Agroalimentaria, y en los del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. D. Gabriel Beltrán Maza, D. Antonio Jiménez Márquez y D. Rafael Pacheco Reyes, para optar al grado de Doctora, con mención de Doctorado Internacional, por la Universidad de Jaén.

Jaén, febrero de 2017

Fdo.: Gabriel Beltrán Maza

Fdo.: Antonio Jiménez Márquez

Fdo.: Rafael Pacheco Reyes

Durante el desarrollo del trabajo conducente a la realización de esta Tesis, la aspirante al Grado de Doctora disfrutó de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

Los trabajos de investigación aquí recogidos, han sido financiados a través de los proyectos P10-AGR-6690 (Junta de Andalucía) e INIA RTA2008-00066-C03-01, del Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



Memoria de Tesis presentada por la Ingeniera Agrónoma, Abir Sadkaoui, para optar al Grado de Doctora Internacional por la Universidad de Jaén

Jaén, febrero de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sadkaoui', with a stylized flourish extending from the end.

Fdo.: Abir Sadkaoui

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas, aunque estén al principio de esta tesis, son realmente el punto final de una etapa a la que no habría podido llegar sola, y en la que sólo puedo expresar palabras de agradecimiento para todas las personas que han hecho posible esta aventura.

Así, deseo expresar mis más sinceras muestras de gratitud a todas las personas que han contribuido en mayor o menor grado a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, y en especial, a mis directores de tesis, los Dres. D. Gabriel Beltrán Maza, D. Antonio Jiménez Márquez y D. Rafael Pacheco Reyes, por la confianza depositada en mí, por compartir conmigo sus conocimientos e ideas, por sus orientaciones, apoyo y total disposición a lo largo de la elaboración de este trabajo sin los cuales no se habría realizado.

Gracias al Dr. Francisco Manuel Sánchez Arenas, Director del Centro IFAPA "Venta del Llano" por permitir el desarrollo del trabajo en sus instalaciones.

A las Dras. Araceli Sánchez-Ortiz y María Paz Aguilera, por su continuo interés, disponibilidad y amabilidad en la realización de este trabajo.

Agradezco profundamente a Maite su paciencia, ayuda constante y cariño. A Mari Carmen y Gloria, por su amabilidad y disponibilidad. A Alfonso, Antonio, Ginés, José, Juan, Justo, Miguel y Sebastián, por su ayuda en el desarrollo de los trabajos experimentales.

A mis amigos y compañeros Ayemen, Abraham, Angelica, Gema y Elena, por sus respaldos en momentos claves en la realización de esta Tesis y a todo el personal del Centro IFAPA: Juan Cano, Juan Carlos, Lola, Antonio, Rafa, José Antonio, Toñi, Conchi, Jesús, Juan Carlos, Alfonso, Mari Carmen, Micaela, Toñi. Muchas gracias por todo.

Agradezco a la Unidad UMR1145 (AgroParitech, Massy, Francia), por acogerme durante ocho meses. Me gustaría mostrar mi gratitud al profesor Gérard Cuvelier, Director de la Unidad, por darme la oportunidad de tomar parte de su grupo de investigación y sobre todo, por la amabilidad con que me trató durante todo el tiempo que pasé allí. También, quisiera expresar mi gratitud a Cassandre Leverrier, por la ayuda técnica y científica prestada durante mi estancia en el AgroParisTech Massy.

A todos los que habéis estado a mi lado os hago partícipes de esta Tesis Doctoral y os reitero mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

El camino conducente a la elaboración de una Tesis Doctoral no es un río tranquilo, y en mi caso no siguió siempre la trayectoria lineal que quería. Afortunadamente, a lo largo de este recorrido, he tenido el privilegio y la suerte de tener siempre a mi lado a personas y fuerzas positivas que me preservaron en el buen camino. A todas estas buenas almas, me gustaría rendir homenaje por su ayuda, su presencia y sus preciosos apoyos, durante las fases de incertidumbre por las que he pasado.

En términos de reconocimiento de sus sacrificios, y en testimonio de la profundidad de mis sentimientos para ellos, Dedico esta Tesis, fruto de muchos años de trabajo laborioso:

A mí querido padre: Mi fuente de confianza y orgullo, por apoyarme en todos los momentos a pesar de la distancia que nos separa, por su amor y su protección.

A mí querida madre: fuente de ternura y amor, por haber estado siempre a mi lado con mucha paciencia y apoyo durante estos años de estudio.

Que dios os asista y proteja, Os quiero mucho.

A mis dos niñas: Sirine y Linda, os agradezco la inmensa alegría, el amor y la incomparable felicidad que nos traéis a vuestro padre y a mí. Gracias por vuestra comprensión y perdón por todas las horas que pasé a 'doctorar' privándonos de los momentos preciosos que deberíamos compartir juntas.

A mí querido esposo Hatem: por sus sacrificios, su apoyo constante y su confianza ilimitada. En los mejores como los peores momentos, has estado siempre a mi lado apoyándome y creyendo en mi sueño, haciendo muchos sacrificios para seguir adelante.

A mis dos hermanos: Férid y Ghazi, quiénes por sus apoyos y consejos me ayudaron mucho a cumplir mi sueño.

A mis sobrinos: Karim, Yacine, Dorra, Mouna, Hajer y Mohammed por su amor, apoyo y sermones, que me dieron fuerzas en los momentos difíciles de mi vida.

DEDICATOIRE

Le cheminement doctoral menant à la rédaction de la thèse n'est jamais un long fleuve tranquille et dans mon cas n'a pas toujours suivi la trajectoire linéaire que je me souhaitais. Heureusement qu'au gré de ce parcours j'ai eu le privilège et la chance d'avoir des personnes et des forces positives qui m'ont préservée sur le droit chemin. C'est à toutes ces bonnes âmes que je voudrais rendre hommage pour leur aide, leur présence et leurs encouragements si précieux et tant salvateurs lors des phases d'incertitudes par lesquelles je suis passée.

En termes de reconnaissance de leurs sacrifices et en témoignage de la profondeur de mes sentiments à leurs égards je dédie ce travail, fruit de nombreux mois de labeur :

A mon très cher père : Ma source de confiance et de fierté pour m'avoir tant soutenue, pour ses encouragements incessants malgré la distance qui nous sépare et pour son amour et sa protection.

A ma très chère mère: Source de tendresse et d'amour pour avoir toujours été à mes côtés avec autant de patience et pour son soutien tout au long de ces années d'études.

Que dieu vous assiste et vous protège, je vous aime beaucoup.

A me deux chères filles Sirine et Linda, je vous remercie pour l'immense joie, l'amour et l'incomparable bonheur que vous nous apportez à votre père et à moi. Merci pour votre compréhension et pardonnez-moi pour toutes les heures que j'ai passées à 'doctorer' en nous privant des précieux moments qu'on devrait partager ensemble.

A mon très cher époux Hatem Elmia : Pour tous ses sacrifices, pour son soutien constant et sa confiance illimitée. Dans les meilleurs comme dans les pires moments tu es resté là malgré tout à me soutenir, à m'encourager et à croire en mon rêve au gré de plusieurs sacrifices. Pour tout cela, cette œuvre est la concrétisation de nos efforts communs

A mes deux frères Férid et Ghazi, pour leurs divers supports, leurs conseils et leurs encouragements qui m'ont permis de réaliser mon rêve.

A mes très chers neveux et nièces : Karim, Dorra, Mouna, Yacine, Hajer et Mohamed pour leur amour, leur support et leurs sermons qui m'ont donné de la force dans des moments les plus difficiles de ma vie.

ÍNDICE

3.2.1. Molienda	52
3.2.2. Batido	53
3.2.2.1. Agua.....	54
3.2.2.2. Cloruro de sodio	55
3.2.2.3. Carbonato cálcico	55
3.2.2.4. Arcilla caolinítica	55
3.2.2.5. Microtalco natural	56
3.3. Extracción del aceite	58
3.3.1. Separación Sólido-Líquido	58
3.3.2. Separación Líquido-Líquido	58
3.4. Almacenamiento del aceite	59
4. Reología	59
4.1. Conceptos reológicos	60
4.1.1. Esfuerzo.....	60
4.1.2. Deformación	61
4.1.3. Velocidad de deformación y flujo	63
4.1.4. Viscosidad	64
4.1.5. Viscoelasticidad lineal y Viscoelasticidad no lineal	65
4.2. Clasificación de los fluidos según su comportamiento reológico	66
4.3. Reología de la pasta de aceituna	68
5. Referencias bibliográficas	70
JUSTIFICACIÓN	85
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	91
MATERIALES Y MÉTODOS	97
1. Materiales.....	99
1.1. Material vegetal	99
1.2. Microtalco natural	99
2. Métodos.....	100
2.1. Determinaciones en el fruto	100
2.1.1. Caracterización pomológica.....	100

2.1.1.1. Índice de madurez.....	100
2.1.1.2. Peso medio de la aceituna.....	101
2.1.1.3. Peso medio del hueso.....	101
2.1.1.4. Relación pulpa/hueso.....	102
2.1.2. Determinación de la humedad.....	102
2.1.3. Determinación del contenido graso.....	102
2.1.4. Rendimiento industrial.....	103
2.1.5. Firmeza.....	104
2.2. Determinaciones analíticas en el orujo.....	104
2.3. Determinaciones del contenido en pectinas.....	104
2.3.1. Preparación de los sólidos insolubles al alcohol.....	104
2.3.2. Extracciones de las fracciones pécticas.....	106
2.3.3. Cuantificación del contenido en ácido galacturónico.....	107
2.4. Determinaciones del contenido en metanol.....	108
2.5. Determinaciones del grado de esterificación.....	110
2.6. Ensayo enzimático.....	110
2.6.1. Extracción enzimática.....	110
2.6.2. Determinación de la actividad enzimática.....	111
2.6.2.1. Pectinmetilesterasa (PME).....	111
2.6.2.2 Poligalacturonasa (PG).....	112
2.6.2.3. Pectato-liasa (PcL) y pectin-liasa (PL).....	114
2.7. Determinaciones del contenido en proteínas.....	114
2.7.1. Proteínas del fruto.....	114
2.7.2. Proteínas en los sólidos insolubles al alcohol.....	115
2.8. β -eliminación.....	116
2.9. Caracterización de las pastas de pulpa de aceituna.....	116
2.9.1. Preparación de las muestras.....	116
2.9.2. Observaciones microscópicas.....	117
2.10. Ensayos reológicos.....	117
2.11. Determinación de la actividad emulsionante.....	119
2.12. Análisis estadístico.....	120
3. Referencias Bibliográficas.....	120

RESULTADOS	123
SECCIÓN I EFECTO DEL USO DE TALCO SOBRE LA RUPTURA DE LAS EMULSIONES ACEITE-AGUA, EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN, Y LA SOLUBILIZACIÓN DE LAS SUSTANCIAS PÉCTICAS Y PROTEINAS, DURANTE EL BATIDO DE LA PASTA DE ACEITUNA	125
Capítulo 1 Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion	127
Capítulo 2 Virgin olive oil yield as affected by physicochemical talc properties and dosage	149
Capítulo 3 Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during 'Hojiblanca' virgin olive oil extraction	167
SECCIÓN II CAMBIOS BIOQUÍMICOS E INVOLUCRACIÓN DE LA PECTINMETILESTERASA EN LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR Y LA BIOSÍNTESIS DE METANOL DURANTE LA MADURACIÓN DE TRES VARIEDADES DE ACEITUNA: 'ARBEQUINA', 'PICUAL' Y 'HOJIBLANCA'	191
Capítulo 4 Involvement of pectin methylesterase in the regulation of pectic cell wall disassembly, methanol accumulation and softening of olive fruit during ripening	193
SECCIÓN III ASOCIACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS PÉCTICOS DE LA PARED CELULAR Y LA EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TEXTURALES Y REOLÓGICAS DE LA PULPA DURANTE LA MADURACIÓN DE TRES VARIEDADES DE ACEITUNA: 'ARBEQUINA', 'PICUAL' Y 'HOJIBLANCA'. INFLUENCIA SOBRE EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	217
Capítulo 5 Pectic cell wall polysaccharides and oil content modulate the rheological behavior of the olive fruit pulp during ripening process	219
DISCUSIÓN GENERAL	247
Referencias bibliográficas	269
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	277/283
ANEXOS	287
I PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	289
II CONTRIBUCIÓN A CONGRESOS	323

PRESENTACIÓN
PRESENTATION/PRÉSENTATION

Esta memoria de Tesis Doctoral, se presenta como compendio de publicaciones científicas, y cumple con los requisitos para la obtención de la mención de Doctorado Internacional, de acuerdo con la normativa de la Universidad de Jaén.

El objetivo de esta Tesis, es asociar los cambios en la composición de los polisacáridos pécticos, con las propiedades texturales y reológicas de la pared celular de la aceituna, en diferentes etapas de maduración del fruto y del proceso de extracción de aceite de oliva virgen, con el fin de generar fundamentos de futuros desarrollos tecnológicos en el control y la optimización de los rendimientos.

Para facilitar la lectura de esta memoria, primeramente, un *Resumen* recoge de forma abreviada la investigación realizada, sus resultados y conclusiones

Un segundo apartado sobre *Antecedentes*, ofrece los estudios más relevantes realizados en relación a la temática de la Tesis.

A continuación, la *Justificación*, *Hipótesis* y *Objetivos*, centran la temática de la tesis y describen los objetivos de la misma.

En el capítulo *Materiales y Métodos*, se refiere brevemente la metodología desarrollada para llevar a cabo los objetivos planteados, cuyos resultados han dado lugar a las publicaciones científicas que se adjuntan en el capítulo de *Resultados*.

Posteriormente, se realiza una *Discusión General* de los resultados obtenidos, a la que sigue un capítulo con las *Conclusiones* más destacadas que pueden extraerse de la investigación realizada.

Finalmente, se recogen los *Anexos* constituidos por la Producción Científica y la Contribución a Congresos.

This Doctoral Thesis is presented as a compilation of scientific papers and it meets the requirements for the application of the international Doctor mention according to the University of Jaén.

The main objective of this Thesis was to associate the changes in the composition of pectic cell wall polysaccharides with the textural and rheological properties of olive fruit throughout ripening and extraction process with the aim of optimizing the process oil yield.

This Thesis Doctoral begins with an *Abstract* reporting research results and conclusions.

Then, the *General Introduction* includes the most relevant studies in relation to the subject of the thesis.

Chapters on *Justification and objectives* explain the subject and describe the objectives of the Thesis.

In the *Materials and Methods* chapter, we briefly describe the methodology and work plan used. The scientific papers are included in *Results* chapters.

Then, a chapter *global discussion* of results followed by the chapter of the main *conclusions* found in this Thesis are presented.

Finally, in the *Annexes* chapter are collected the different Congresses as well as the scientific papers that have been developed in this Thesis.

Cette Mémoire de Thèse de Doctorat se présente sous forme d'un recueil de publications scientifiques et répond aux exigences pour l'obtention de l'approbation du Docteur International conformément aux règlements de l'Université de Jaén.

L'objectif principal de la présente Thèse est d'associer les changements dans la composition des polysaccharides pectiques avec les propriétés texturales et rhéologiques de la paroi cellulaire de l'olive au cours du processus de maturation des fruits et du procédé d'extraction de l'huile d'olive, afin de trouver un moyen technologique pour le contrôle et l'optimisation des rendements.

Pour faciliter la lecture de cette Mémoire de Thèse, un *Résumé* recueille les recherches réalisées avec les résultats et conclusions qui ont été tirées.

Ensuite, la partie *Introduction Générale* reporte les études les plus pertinentes concernant le sujet de la Thèse.

Après, les deux parties *Justification de la Thèse* et *Objectifs*, décrivent la thématique de la thèse et les objectifs qui ont été visés.

La partie *Matériels et Méthodes* décrit brièvement la méthodologie et le plan du travail développé pour atteindre les objectifs décrits dans la Thèse et dont les résultats ont débouché sur des publications scientifiques annexées dans le chapitre Résultats.

Par la suite, un Résumé et une Discussion Complète des résultats a été faite dans la partie *Discussion des Résultats*. Enfin, un chapitre avec les principales *Conclusions* qui ont été tirées dans cette Thèse.

Enfin la dernière partie de la Thèse, *Annexes*, recueille la liste des différentes participations aux congrès ainsi que les différents articles scientifiques élaborés.

RESUMEN/SUMMARY/RÉSUMÉ

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido, profundizar en los conocimientos del efecto que podrían tener las sustancias pécticas, sobre la formación de las emulsiones durante la operación de batido de la pasta de aceituna; los mecanismos físicos de actuación del microtalco natural (MTN) sobre la ruptura de estas emulsiones, y el papel que desempeñan dichas sustancias, en el control de las propiedades texturales y reológicas, de la pared celular de la aceituna, durante el proceso de maduración de la misma.

Los resultados revelaron que dosis incrementadas de pectina, generan un aumento de la actividad emulsionante (AE) que se va debilitando, a medida que aumenta la dosis de talco adicionado. La capacidad del microtalco para romper las emulsiones aceite-agua (A/E) podría explicarse por su carácter hidrófobo responsable de la actividad superficial de las sustancias pécticas. Asimismo, se ha observado que las características fisicoquímicas de los talcos, afectan notablemente a la ruptura de dichas emulsiones. Sin embargo, su efecto depende de la dosis de talco aplicada a la emulsión. De hecho, los valores más bajos de la AE se obtuvieron utilizando dosis de 0.5% del talco MNT1, caracterizado por el porcentaje de carbonato más alto (4 %) y el diámetro de partícula más bajo (2,4 μm). Este talco, permitió obtener los porcentajes de mejora de rendimiento en aceite más altos, cuando se comparó con los demás talcos ensayados y con tratamiento control al que no se añadió talco.

Las proteínas son otras sustancias presentes en abundancia en la pared primaria de las aceitunas, y junto a las pectinas, se caracterizan por tener una acción emulsionante. En un ensayo, realizado a la escala de la almazara experimental del Centro IFAPA "Venta del Llano", se observó que durante el batido, estas sustancias sufren una degradación sustancial que influye sobre su solubilidad. Se observó también, que la aplicación de dosis bajas de talco ($\leq 0.5\%$) disminuye fuertemente las pérdidas de aceite en el orujo, probablemente a través de la formación de enlaces químicos, resultado de las interacciones electrostáticas entre pectinas, proteínas y partículas de talco contribuyendo a su complejación. Mientras que dosis más altas (1%), estorba su agregación, promoviendo la formación de emulsiones y reduciendo la cantidad del aceite extraído durante el batido.

Otro objetivo de la Tesis ha sido, contribuir a aclarar la involucración de una de las principales enzimas pectolíticas: pectinmetilesterasa (PME) en la degradación de las sustancias pécticas. Así como, los cambios texturales asociados a la pérdida de firmeza de la aceituna de tres variedades: 'Arbequina', 'Picual' y 'Hojiblanca', durante la maduración de la misma. Los resultados de este estudio, revelaron que en el transcurso del proceso de maduración de las aceitunas, la degradación de los compuestos pécticos podría resultar de una acción sinérgica entre una reacción no enzimática por β -eliminación, conduciendo a la formación de los urónidos 4,5-insaturados, y una reacción enzimática, principalmente controlada por la actividad de la PME. Esta enzima, cataliza la hidrólisis de los esteres metílicos de los ácidos poligalacturónicos, liberando metanol al medio, y convirtiendo a las pectinas en ácidos pécticos. Estas reacciones, son responsables del debilitamiento de la cohesión entre los diferentes componentes de la pared celular, y causan el ablandamiento del fruto.

Todas estas alteraciones estructurales, son cruciales en la determinación de las propiedades reológicas de la aceituna. Es por ello, que en la última parte de esta Tesis Doctoral, se planteó determinar la magnitud de la contribución de la solubilización de las sustancias pécticas de la pared celular, en la definición de las propiedades reológicas de las aceitunas de las tres variedades estudiadas. Los resultados revelaron que la solubilización de las pectinas, afectó notablemente la firmeza y el comportamiento reológico del fruto. De hecho, las aceitunas inmaduras, ricas en protopectinas (PP), tienen tejidos más firmes y son más rígidas. Gradualmente, con el avance de la maduración, esta fracción péctica se solubiliza y se transforma en pectina soluble en agua (PSA) y pectato de calcio (PCa). El examen de las diferentes muestras de pulpa de aceituna, utilizando la técnica de microscopía confocal láser de barrido (CLSM), revela una degradación continua de la estructura de la pared celular a medida que avanza la maduración del fruto.

Por otra parte, los datos reológicos revelaron que para todas las variedades estudiadas, la pasta de pulpa de aceituna exhibe un comportamiento tipo sólido bajo una tensión de fluencia (comportamiento viscoplástico) típico de suspensiones concentradas, que evoluciona notablemente a medida que avanza la maduración de

los frutos. Además, se observó que el aumento gradual de la fracción oleosa, contribuyó activamente en la disminución de las fuerzas de fricciones internas entre las diferentes partículas de la pulpa de aceituna.

The main objective of this Doctoral Thesis was to obtain deeper insights into the role that play pectin polysaccharides on the formation of emulsions during olive oil malaxation process, the physical mechanisms of action of MNT particles on the breakdown of these emulsions, and the role played by these substances in the control of the textural and rheological properties of the olive fruit cell wall during the course of ripening process.

Results revealed that increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity (EA) and that the emulsifier effect of pectins was weakened, by the addition of increasing MNT dose. The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions (O/W), could be explained by its hydrophobic character, which is responsible for the surface activity of the pectic substances. It was also found that MNT physicochemical characteristics, markedly affected the breaking of O/W emulsions. Nonetheless, its effect depends on the dose of MNT applied to the emulsion. Results also revealed that the highest decrease in EA was observed for MNT1, with the lowest D50 (2.4mm) and the highest carbonate rate (4%) at 0.5%. In general, this talc showed better capacity for breaking O/W emulsion. In addition, the use of this talc allowed to achieve the highest improvement of the process industrial yield when compared to the others tested MNTs and the control treatment carried out without talc addition.

Proteins are others components present in the primary cell wall of the olive fruit, which together with pectins, may have an emulsifying action during olive oil extraction process. In an experiment performed in the oil mill of IFAPA "Venta del Llano" Center, it was observed that these compounds undergo substantial degradation that influences their solubility. Addition of MNT at doses lower than 0.5%, reduced the oil losses in the pomace by favoring the formation of a chemical bound through electrostatic interactions between proteins and pectic polysaccharides which are held together and adsorbed onto the talc surface giving a decrease in their content in the malaxed olive paste. However, greater dose (1%) led to the increase of all above-mentioned parameters, concluding that an excess of MNT could not adsorb protein and pectic polysaccharides, remaining oil-in-water emulsions during kneading and then reducing the process oil yield.

Part of this thesis was, conducted to investigate the involvement of one of the main pectolytic enzymes: pectinmethylesterase (PME) in pectin degradation and textural changes associated with the loss of firmness during the ripening of three of the major olive cultivars: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'. Results of this study indicated that during the course of ripening process, the degradation of cell wall pectins could result from a synergistic action between a non-enzymatic reaction through a β -elimination, resulting in the formation of unsaturated uronides and an enzymatic reaction mainly governed by the activity of PME. This enzyme, catalyzes the de-esterification of the methyl esters groups of the galacturonic acid units releasing methanol and converting pectins into pectic acids. These reactions, are responsible for the weakening of the cohesion between the different cell wall components leading to the softening of the fruit.

All these structural alterations, are crucial in determining the rheological properties of the olive fruit. That's why in the last part of this Thesis, we intended to determine the magnitude of contribution of cell wall pectin solubilisation to the rheological properties of the three studied cultivars. Results revealed that pectin solubilisation, affected markedly the fruit firmness and the rheological behavior of the fruit. In fact, for the three studied cultivars, unripe fruits are rich in protopectin (PP), having firmer tissues and are more rigid. Gradually as ripening progressed, this pectic fraction was solubilized and transformed into water soluble pectin (WSP) and chelate soluble pectin (CSP). The examination of the different olive pulp paste samples, using a confocal scanning laser microscopy (CLSM), revealed a continuous disruption of the cell wall structure as ripening progressed.

Rheological data revealed that for all cultivars, olive pulp pastes showed a solid-like behavior under a yield stress (viscoplastic behavior), typical of concentrated suspensions, which evolved markedly as ripening progressed. Furthermore, it was observed that the gradual increase of the oily fraction, contributed actively to the decrease of the internal friction forces between the different olive pulp particles.

L'objectif principal de cette Thèse Doctorale a été, d'apporter une meilleure compréhension de l'effet que pourraient avoir les substances pectiques, sur la formation des émulsions au cours du processus de malaxage de la pâte d'olive, les mécanismes d'action des particules de microtalc naturel (MTN) sur la rupture des émulsions huile dans l'eau (H/E) ainsi que leur rôle dans le contrôle des propriétés texturales et rhéologiques de la paroi cellulaire des olive au cours du processus de maturation de celles-ci.

Les résultats de cette étude ont révélé que l'augmentation progressive de la dose de pectines conduit à une augmentation de l'activité émulsionnante (AE) qui, cependant s'atténue avec l'augmentation progressive de la dose de talc ajoutée. La capacité du MTN à rompre les émulsions H/E, peut être expliquée par son caractère hydrophobe responsable de l'activité superficielle des substances pectiques. En outre, il a été observé que les caractéristiques physicochimiques des MTN, affectent considérablement la rupture de ces émulsions. Cependant, son effet dépend de la dose de talc appliquée à l'émulsion. Les résultats obtenus ont révélé que la plus forte baisse de l'AE a été observée pour le traitement auquel lui a été ajoutée une dose de 0.5% du talc MTN1, caractérisé par le pourcentage de carbonate le plus élevé (4%) et le diamètre de particule le plus faible (2.4 μm). L'ajout de ce talc, a permis d'obtenir le pourcentage d'amélioration du rendement d'extraction en huile le plus élevé, comparé aux autres talcs testés et au traitement témoin auquel le talc n'a pas été appliqué.

Les protéines sont d'autres composants présents en abondance dans la paroi cellulaire primaire des olives, qui comme les pectines, possèdent un pouvoir émulsifiant. Dans une étude réalisée à l'échelle de l'huilerie expérimentale du Centre IFAPA "Venta del Llano", il a été observé que pendant le processus de malaxage de la pâte d'olive, ces substances subissent une dégradation importante affectant leur solubilité. Il a été aussi observé, que l'ajout du MTN à des doses inférieures à 0.5% diminue considérablement les pertes d'huiles dans le grignon, probablement suite à la formation de liaisons chimiques résultant des interactions électrostatiques entre les protéines et les polysaccharides pectiques qui se relient ensemble et s'adsorbent à la surface du talc, entraînant ainsi une diminution de leurs teneurs dans la pâte d'olive

malaxée. En revanche, des doses plus élevées (1%), empêchent leur agrégation favorisant la formation d'émulsions et réduisant ainsi la quantité d'huile extraite.

Une autre partie de cette Thèse, a été orientée à l'étude de l'activité de l'une des principales enzymes pectolytiques: pectinmethylesterase (PME) impliquée dans la dégradation des substances pectiques et les changements de texture associés à la perte de la fermeté au cours du processus de maturation des olives des trois variétés: 'Arbequina', 'Picual' y 'Hojiblanca'. Les résultats de cette étude ont révélé, que pendant le processus de maturation des olives, la dégradation des substances pectiques de la paroi cellulaire pourrait résulter d'une action synergique entre une réaction non-enzymatique de β -élimination, conduisant à la formation des uronides 4,5-insaturés et une réaction enzymatique principalement contrôlée par la PME. Cette enzyme, catalyse l'hydrolyse des esters méthyliques des acides polygalacturoniques libérant du méthanol et transformant les pectines en acides pectiques. Ces réactions, sont responsables de l'affaiblissement de la cohésion entre les différents composants de la paroi cellulaire provoquant ainsi le ramollissement du fruit.

Toutes ces modifications structurelles, sont cruciales pour déterminer les propriétés rhéologiques de l'olive. C'est ainsi que la dernière partie de cette Thèse, a été consacrée à l'étude de l'implication de la solubilisation des substances pectiques de la paroi cellulaire, dans les principales modifications rhéologiques des pâtes de pulpes d'olive tout au long du processus de maturation des fruits des trois variétés étudiées. Les résultats ont révélé, que la solubilisation des pectines influe considérablement sur la fermeté et les propriétés rhéologiques des fruits. En effet, pour les trois variétés étudiées, il a été observé que les fruits immatures riches en protopectines (PP), possèdent des tissus plus fermes et plus rigides et qu'avec l'avancement de la maturation, cette fraction pectique, est solubilisée puis transformée en pectines solubles dans l'eau (PSE) et pectate de calcium (PCa). L'examen des différents échantillons de pulpe d'olive, effectué utilisant un microscope confocal à balayage laser (CLSM), révèle une dégradation progressive de la paroi cellulaire avec l'avancement de la maturation des fruits.

Les données rhéologiques ont révélé que pour les trois variétés étudiées, les pâtes de pulpe d'olive ont montré un comportement solide sous une contrainte de rendement (comportement viscoplastique), typique de suspensions concentrées, qui a évolué de manière importante avec l'avancement de la maturité des fruits. Il a été aussi observé, que l'augmentation progressive de la fraction huileuse, contribue activement à la réduction des forces de frottement interne entre les différentes particules de pâte d'olive.

ANTECEDENTES

1. El fruto del olivo (*Olea europaea* L.)

La aceituna es el fruto del olivo (*Olea europaea* L.), de forma elipsoidal o globosa, mide normalmente de 1 a 4 cm de longitud y de 0.6 a 2 cm de diámetro. Botánicamente, la aceituna es una drupa. Se trata de un fruto con una sola semilla compuesto por tres tejidos principales: endocarpio (hueso), mesocarpio (pulpa) y epicarpio (piel). El conjunto de estos tejidos se denomina pericarpio, y tiene su origen en la pared del ovario. Los tejidos del fruto, se desarrollan del ovario mediante los procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y del cuajado inicial.

Desde el punto de vista cualitativo, el crecimiento de la aceituna, como cualquier otra drupa, se ajusta a una doble sigmoide (Rallo y Cuevas, 1999), con cuatro etapas diferentes. En algunos casos, las delimitaciones de las cuatro fases no están claras, variando según cultivares, carga y estado nutritivo del árbol, y condiciones ambientales y de cultivo (Lavee, 1986).

Durante la primera fase de crecimiento, contribuyen al aumento del tamaño tanto la división como la expansión celular. Esta fase concluye aproximadamente con el final de la esclerificación o endurecimiento del endocarpio que sucede entre unas 7 y 9 semanas después de la floración.

Tras un periodo durante el que el crecimiento se ralentiza o se detiene, el fruto experimenta un nuevo incremento de tamaño, cuya fase final ocurre en el envero o cambio de color de la epidermis, que determina el comienzo de la maduración.

Cuando el fruto está completamente desarrollado, la pulpa representa un 70-90%, el hueso un 9-27% y la semilla un 2-3% del peso total del fruto, dependiendo del cultivar, madurez del fruto, condiciones de cultivo, carga de los árboles etc.

Los componentes mayoritarios de la pulpa y de la semilla son el agua y el aceite, le siguen en importancia los azúcares y polisacáridos. En la pulpa, los azúcares más importantes son los reductores destacando la glucosa, seguida de fructosa y

sacarosa. Entre los polisacáridos se encuentran fundamentalmente celulosa, lignina y hemicelulosa. Relacionadas con la textura de los frutos, se encuentran las sustancias pécticas. En la semilla, el contenido de proteínas es más elevado que en la pulpa. En la Tabla 1, se recoge la composición química de la aceituna.

Tabla 1. Composición química de las principales partes de la aceituna (% peso) (Fernández, 1971)

	pulpa	hueso	semilla
Agua	50-60	9.3	30
Aceite	15-30	0.7	27.3
Azúcares	3-7.5	41	26.6
Celulosa	3-6	38	1.9
Materia nitrogenada	2-5	3.4	10.2
Cenizas	1-2	4.1	1.5
Polifenoles	2-2.5	0.1	1-1.5

La acumulación de aceite en las aceitunas, tiene lugar paralelamente al ensanchamiento activo de las células del pericarpio. Se segregan pequeñas gotas de aceite en los extremos del retículo endoplasmático, que se fusionan seguidamente para formar gotas mayores que son impulsadas hacia la vacuola, y se incorporan lentamente a ella. La curva que representa la pauta de acumulación de aceite que caracteriza los frutos recién formados tiene una fase de acumulación rápida donde la cantidad de aceite aumenta rápidamente y linealmente, y una fase de ralentización de la síntesis lipídica, caracterizada por una tasa casi estable de materia grasa (Lavee y Wodner, 1991).

Esta última fase estacionaria, favorable para una buena recolección cualitativa y cuantitativa, abarca unas cuatro semanas y precede al fenómeno de sobremaduración de la aceituna. Diversos factores, entre ellos la luz y la disponibilidad de agua por parte del cultivo, pueden influir en la biosíntesis de lípidos.

2. La pared celular

La pared celular de los vegetales, constituye una envoltura resistente y extensible que rodea al plasma. Es una estructura dinámica que permite el desarrollo de las células jóvenes, determinando su tamaño y forma (Jaramillo, 2004), y constituye un sistema tampón entre el medio exterior y el contenido protoplásmico. Es un compartimiento permeable al agua y a los metabolitos auxiliares, del que el citoplasma toma los elementos necesarios para su metabolismo y retorna componentes que elabora (secreciones y residuos), asegurando la rigidez y la cohesión de las células en oposición a los choques osmóticos.

2.1. Estructura y composición

La pared celular es una estructura sumamente compleja. Sus principales funciones, las más reconocidas y estudiadas tradicionalmente, son el dar forma y sostén a las células, determinando así los distintos tipos celulares que conforman tejidos y órganos (Keegstra, 2010), y en parte también la morfología del organismo. Gracias a la pared celular, las células vegetales son capaces de afrontar las fuerzas de gravedad, tensión y compresión, así como la presión osmótica proveniente de su propio interior (Burton *et al.*, 2010). Su función estructural, se relaciona con la adhesión celular y la porosidad o permeabilidad de las células. En algunos casos, constituye además una fuente de energía metabolizable, y ha sido relacionada con numerosos procesos como la protección ante patógenos, reconocimiento, señalización (generalmente asociado a la pérdida de integridad de la pared), crecimiento y morfogénesis (Keegstra, 2010).

Los principales componentes de la pared celular son polisacáridos, junto con glicoproteínas y lignina (Somerville *et al.*, 2004). Los polisacáridos de la pared celular, se pueden agrupar en dos categorías: celulosa y polisacáridos no celulósicos (pectinas y hemicelulosas). La celulosa se encuentra formando una estructura de microfibrillas, embebidas en una matriz conformada por polisacáridos hemicelulósicos; que a su vez está inmersa en una matriz de pectinas (Figura 1).

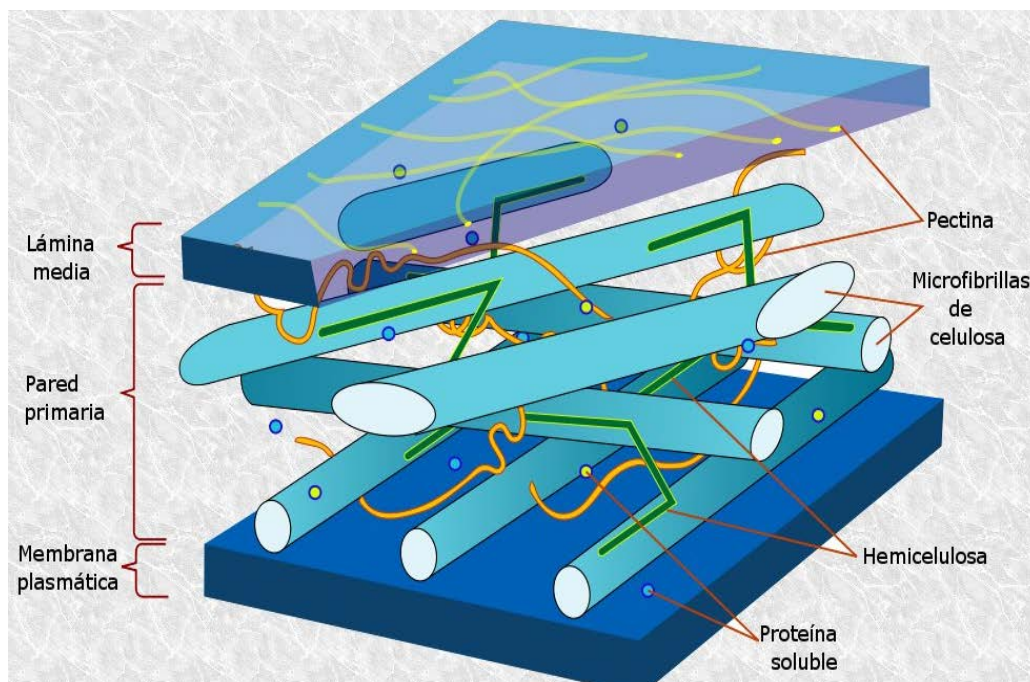


Figura 1. Estructura de los polisacáridos que conforman la pared celular

En la Tabla 2, se detalla la composición de los constituyentes polisacáridicos comúnmente encontrados en las paredes celulares vegetales.

En términos generales, la pared celular está compuesta de tres partes fundamentales: la lámina media o sustancia intercelular, la pared primaria y la pared secundaria, aunque esta última no siempre aparece.

Durante la división celular, se deposita la primera capa (más externa) originando la lámina media, que se comparte entre células adyacentes (Figura 2).

En células viejas, la pectina ubicada en los bordes, suele estar degradada y reemplazada por aire. Entre la lámina media y la membrana plasmática, se continúa depositando el material que va a constituir la pared celular. Esta acumulación de material, dará lugar a la pared celular primaria, que caracteriza a tejidos jóvenes y en crecimiento (Albersheim *et al.*, 1994).

Al finalizar el crecimiento celular, aparece la pared celular secundaria, por lignificación de los tejidos.

Tabla 2. Componentes estructurales de los polisacáridos de la pared celular vegetal (Contreras, 2003).

Polisacáridos	Monómeros mayoritarios	Monómeros minoritarios	Estructura química
Celulosa	Glc		Glc unida por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$
Hemicelulosa			
Xilanos	Xil	Ara, Gal,	Xil unida por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, sustituciones de Ara, Gal, GluA. Algunas xilas y residuos laterales están acetilados o contienen Afe
Galactoglucomanano	Man, Glc	Gal	Man y Glc unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ con sustituciones de Gal
Xiloglucanos	Glc, Xil	Gal, Ara, Fuc	Glc unida por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ con reiduos $\beta(1\rightarrow6)$ de Xil. Sustituciones de Ara, Gal, Fuc
Sustancias pécticas			
Homogalacturonano	AGA	Ram, Xil	AGA unido por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, parcialmente esterificado con metanol o acetilado. Algunos residuos de Ram y Xil
Ramnogalacturonano	AGA, Ram	Ara, Gal, Fuc Xil	RG tipo I $(1\rightarrow2)$ Ram $(1\rightarrow4)$ AGA con cadenas laterales de arabinanos y arabinogalactanos. Algunos AGA están acetilados y las cadenas contienen Afe
Arabinanos	Ara		Ara unida por enlaces $\alpha(1\rightarrow5)$ con ramificaciones $\alpha(1\rightarrow2)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$
Arabinogalactanos tipo I	Gal	Ara	Gal unida por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ con ramificaciones de Ara
Arabinogalactanos tipo II	Gal	Ara	Gal unida por enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ con ramificaciones $\beta(1\rightarrow6)$ de Gal y Ara

Abreviaturas: Ara: Arabinosa; Fuc: Fucosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; AGA: Acido galacturónico; Ram: Ramnosa; Xil: Xilosa; GluA: Acido glucurónico; Afe: Ácido ferúlico

Durante el proceso de maduración de los frutos, se produce una degradación de los polisacáridos de la lámina media y de la pared primaria (Waldron *et al.*, 1997), la pared celular se debilita, y hay un descenso en la adhesión entre las células (Ishimaru y Kobayashi, 2002).

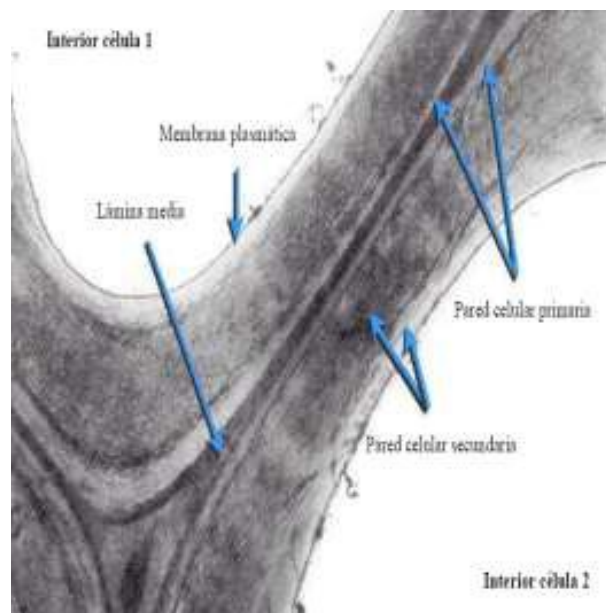


Figura 2. Microfotografía de dos células vegetales contiguas.

2.2. Sustancias pécticas

Las sustancias pécticas se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales, y muy especialmente en los tejidos parenquimáticos y meristemáticos. En ellos, las zonas más ricas en estas sustancias, corresponden a la pared primaria de las células y a la lámina media que las separa (Uenojo y Pastore, 2007). Esta, forma una capa intercelular entre las paredes de células adyacentes y se considera que es el primer material depositado por el citoplasma. Es una zona libre de celulosa y está compuesta por polímeros pécticos, tanto en su forma libre como de sales cálcicas. La pared primaria, es la estructura que se expande y acomoda durante el crecimiento de la célula. La localización de estas sustancias ha sido precisada por micrografía electrónica (Albersheim *et al.*, 1960).

2.2.1. Estructura

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones bien definidas: la región lisa y la región pilosa (De Vries *et al.*, 1982). La primera, región denominada “lisa” o también homogalacturonano (HG), está compuesta principalmente por los esqueletos de restos de ácido galacturónico (AGA). Los grupos

carboxilos del AGA, pueden estar parcialmente esterificados con metanol, y parcial o completamente neutralizados por una o más bases.

La segunda región definida dentro de la estructura de la pectina es la región “pilosa”, también denominada ramnogalacturonano (RG), dentro de la cual, a su vez, pueden distinguirse dos tipos de estructuras diferentes:

a) RG tipo I, es una región que se caracteriza por la presencia de dímeros de AGA y L-ramnosa unidos entre sí (AGA- α (1 $\rightarrow$ 2)-Ram- α (1 $\rightarrow$ 4)-AGA-Ram; forma piranósica) (Aspinall, 1980). A estos residuos de ramnosa se unen cadenas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4 y en otros casos, cadenas de L-arabinosa, unidas por enlaces α -1,5. A partir de estos azúcares pueden originarse otras ramificaciones del mismo tipo, o en ocasiones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico, dependiendo del origen vegetal de la pectina. Estas ramificaciones representan un 20-40 % de la cadena total (Darvill *et al.*, 1980).

b) RG tipo II, está conformado por cadenas laterales de diferentes azúcares unidos directamente a los residuos de AGA (Aspinall, 1980). El RG tipo II puede ser considerado incluso como una modificación estructural del HG y normalmente está en una posición adyacente al RG tipo I.

En la Figura 3, se muestra una estructura esquemática de la pectina, en la que se identifican claramente las regiones principales que la conforman.

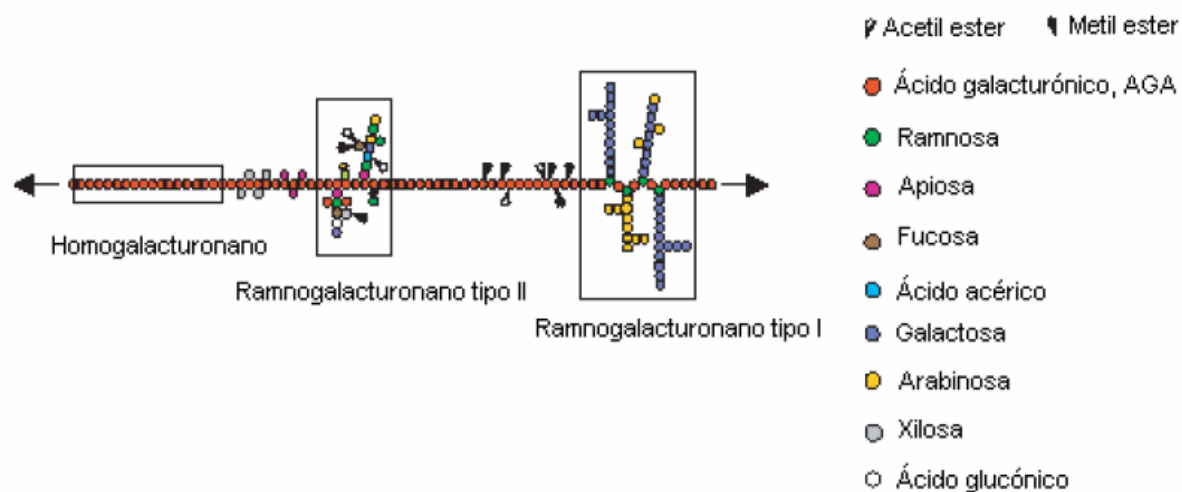


Figura 3. Estructura de la pectina (Willats *et al.*, 2006)

2.2.2. Clasificación

Las pectinas se pueden clasificar de acuerdo a las modificaciones que sufren en su cadena principal. Sin embargo, el término genérico pectina puede aplicarse a: protopectinas, ácidos pécticos, ácidos pectínicos y pectinas.

2.2.2.1. Protopectinas

Son sustancias, constituidas por una matriz de sustancias pécticas, que por un proceso de hidrólisis dan origen a la pectina o al ácido pectínico. Con el término de protopectina, se describen las sustancias pécticas que se encuentran en los tejidos vegetales y son insolubles en agua. De ellas, se forman posteriormente las sustancias pécticas solubles (Bravo, 1981). Durante la etapa de maduración, la protopectina insoluble que posee un 100% de metoxilación o GE (Badui, 1995), se transforma en pectina soluble al perder metóxilos, lo que conlleva a la pérdida de firmeza de los frutos. Por ello, la mayor cantidad de protopectina se encuentra en los tejidos de frutos no maduros (Brummell y Harpster, 2001).

Las protopectinas, extraíbles con disoluciones alcalinas o ácidos diluidos en caliente, presentan una estructura molecular similar. Mostrando un alto contenido

de azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa. La dificultad de la extracción de la protopectina, puede ser debida a los puentes ácidos o básicos que la anclan a la matriz de la pared.

Gran parte de las cadenas de protopectina, se encuentran en la pared primaria y secundaria, el resto se encuentra en la lámina media; mientras que las pectinas solubles en agua y en quelantes derivan de la lámina media (Walter, 1991).

2.2.2.2. Ácido péctico o poligalacturónico

Se trata de galacturonatos que no contienen grupos metilos. También se les denomina ácidos poligalacturónicos. A las sales que conforman, se les llama pectatos o poligalacturonatos (Kashyap *et al.*, 2001). Son cadenas formadas simplemente por la unión de ácidos galacturónicos, cuyos grupos carboxílicos no se encuentran esterificados ni por el grupo metilo (COOCH_3), ni por bases, por lo que su GE es de 0%.

2.2.2.3. Ácidos pectínicos

Estos compuestos, son ácidos poligalacturónicos con cantidades variables de grupos metilos esterificados con los grupos carboxilo del C6. Las sales de los ácidos pectínicos, son denominadas pectinatos. Tienen la propiedad de formar geles con azúcares, ácidos, y cuando los contenidos de metilo son muy bajos, tienden a formar geles con sales de calcio (Kashyap *et al.*, 2001). Se generan a partir de la protopectina cuando esta ha perdido grupos metoxilo que están unidos al ácido galacturónico; es decir, son ácidos poligalacturónicos que presentan algún grado de esterificación.

2.2.2.4. Pectinas

Estos compuestos, constituyen aquellas sustancias pécticas de composición variable, cuyo componente principal son los ácidos pectínicos solubles en agua, de contenido de metoxilo y grado de neutralización variables. Poseen la capacidad de formar geles con azúcares y ácidos en condiciones adecuadas. Generalmente, presentan

entre 60 a 70% de sus grupos carboxilos esterificados con metanol (Kashyap *et al.*, 2001). Las pectinas también se pueden clasificar de acuerdo a su proceso de extracción de la pared celular en:

Pectinas solubles en agua, son extraíbles en agua o disoluciones salinas. Están conformadas primordialmente por homogalacturano, y el ácido galacturónico está esterificado con alcohol metílico, variando el grado de esterificación de la pectina de acuerdo a su origen.

Pectinas solubles en quelantes, extraíbles mediante disoluciones de agentes quelantes de calcio como el EDTA (ácido etilendiaminotetracético), CDTA (ácido ciclohexanodiaminotetraacético) o hexametáfosfato de sodio. Su composición es muy similar a las pectinas solubles en agua; sin embargo, se diferencian en que pueden presentar un 2% de ramnosa, sustituyendo principalmente al ácido galacturónico en la cadena principal y de 10 a 20% de otros azúcares en las cadenas laterales.

En la Tabla 3, se resumen los criterios de clasificación de pectinas. Hay una amplia gama de grados de esterificación dependiendo de las especies, de los tejidos y de la madurez. En general, las pectinas del tejido tienen una gama de grados de esterificación que va del 60% al 90%, teniendo dicho grado un papel muy importante en la firmeza y cohesión de los tejidos vegetales. La reducción del grado de esterificación tiene como consecuencia una disminución de la cohesión que particularmente es evidente en tejidos vegetales de frutos maduros. En tejidos inmaduros, la formación de carboxilos libres incrementa las posibilidades y la fortaleza de los enlaces calcio entre polímeros. En los tejidos maduros se da la combinación de un descenso de los enlaces de calcio y un incremento de la susceptibilidad de la pectina a despolimerizarse por la β -eliminación (Van Buren, 1991).

Tabla 3. Clasificación de las sustancias pécticas de acuerdo a diferentes criterios (Contreras, 2003).

Criterio de clasificación	Componente
Solubilidad	Pectina soluble en agua Pectina soluble en agentes quelantes Pectina soluble en álcalis o ácidos
Idem (ACS)	Ácido péctico (pectato)* = ácido poligalacturónico** Ácido pectínico (pectinato)* = pectinas** Protopectina
Estructura	Sobre la base de la cadena principal: homogalacturonano Ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II xilogalacturonano, apiogalacturonano Basándose en las cadenas laterales: arabinogalactanos
Comercial	Pectinas de alto metoxilo Pectinas de bajo metoxilo Pectinas de bajo metoxilo amidadas Pectinas acetiladas

* En forma de sal ** Nombre común. ACS: American Chemical Society

2.2.3. Grado de esterificación

El grado de metilación (GM) o esterificación (GE), constituye un factor importante para la caracterización y determinación de la aplicación de la pectina. Se puede definir, como el número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico. De acuerdo a este criterio, se pueden clasificar en dos grupos: pectinas de alto metoxilo (HM) y de bajo metoxilo (LM), lo que depende del grado de esterificación (Figura 4).

2.2.4. Propiedades fisicoquímicas de las pectinas

- **Solubilidad:** El agua es el mejor disolvente para las pectinas, también son solubles en formamida, dimetilformamida y glicerina caliente (Acosta, 1984). Las pectinas son insolubles en disolventes orgánicos y en disoluciones de detergentes cuaternarios, polímeros, proteínas y cationes polivalentes. Estos agentes, se emplean para precipitar las pectinas de las disoluciones, después de una hidrólisis de la materia prima (Rincón, 1990).

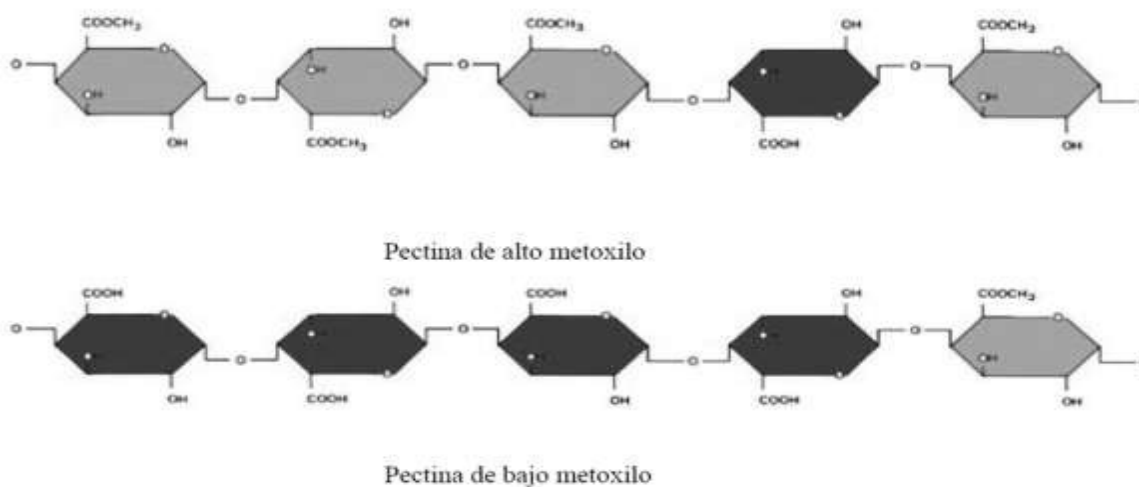


Figura 4. Clasificación de las pectinas de acuerdo al contenido de metoxilos.

- **Acidez:** Las pectinas son neutras en su estado natural; en disolución tienen un carácter ácido, el cual, depende del medio y del grado de esterificación. El pH de las disoluciones de pectina varía entre 2.8 y 3.4, en función del grado de esterificación. Las pectinas tienen una constante de disociación de 0.1 a 10×10^{-4} a 19°C (Cayón, 2004).
- **Viscosidad:** Las pectinas forman disoluciones viscosas en agua; ésta propiedad, depende del grado de polimerización de la pectina, el pH, la temperatura, la concentración y la presencia de electrolitos. El calcio y otros iones polivalentes, aumentan la viscosidad de las disoluciones de pectinas y algunas pectinas de bajo metoxilo, pueden gelificar si la concentración de calcio supera un cierto límite (Cayón, 2004).
- **Poder de gelificación:** Para las pectinas con alto metoxilo, se considera que a un pH de 3.4, al menos un 40% de los ésteres metílicos están desesterificados y, por lo tanto, será difícil lograr la formación de un gel estable con presencia de concentraciones de 65% de azúcares. Un exceso en la concentración del azúcar, puede producir cristalización en el almacenamiento.

En el caso de las pectinas de bajo metoxilo, los geles son menos rígidos y se

pueden trabajar con menos sólidos solubles, no dependen tanto del pH. De hecho, se pueden obtener buenos geles entre valores de pH de 2.5 y 6.5, pero requieren calcio en una concentración adecuada que varía entre 0.01 y 0.1% p/p en base húmeda. Una mayor concentración de calcio puede conducir a una sinéresis excesiva.

- **Longitud de las cadenas:** En las pectinas, la longitud de sus cadenas determina la consistencia del gel y está, por ello, íntimamente relacionada con el poder gelificante (Owens *et al.*, 1948).
- **Peso molecular:** El peso molecular de las pectinas está relacionado con la longitud de la cadena. Es una característica muy importante, de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación. La determinación cuidadosa del peso molecular es difícil, parcialmente debido a la extrema heterogeneidad de las muestras y a la tendencia de las pectinas a agregarse, aún bajo condiciones no favorables a la gelación. Los pesos moleculares de pectinas y su distribución, fueron estudiados sistemáticamente por viscosimetría y se observó que variaban de 20.000 a 300.000 (Owens *et al.*, 1948).
- **Acción de los hidróxidos:** La adición de hidróxido de sodio, permite obtener primero las sales ácidas, luego los pectinatos neutros y después ocurre el fenómeno de demetoxilación, es decir, la ruptura de los ésteres metílicos. Pudiendo ser separados de la molécula los grupos éster, que se han descrito como agente emulsificante (Hasenhuettl, 2008), aun a baja temperatura, sin despolimerización (Henao, 2012).
- **Acción de los ácidos:** Los ácidos solubilizan la protopectina. Por esta razón, se emplea medio ácido controlado en los procesos de extracción de la pectina; aceleran la separación de los metoxilos; si su efecto se continúa, se afectan los enlaces glicosídicos 1–4 y se pueden romper, y a pH fuertemente ácido, temperaturas altas y tiempos largos, se presenta la decarboxilación con formación de CO₂ y furfural (McCreedy y Owens, 1944). A bajas temperaturas predomina

la saponificación, y altas temperaturas la despolimerización (Walton y Sinclair, 1984).

- **Acción de los enzimas:** Sobre las pectinas pueden actuar la pectinmetilesterasa (PME) y la poligaracturonasa (PG). La primera actúa sobre los grupos carboxilos esterificados con metanol, liberando los grupos ácidos y el metanol; la PG actúa sobre las uniones de las unidades de ácidos galacturónicos disminuyendo el peso molecular, cambiando así todas las propiedades que dependen de éste (Contreras, 2003).

2.2.5. Enzimas pectolíticas

Existe una pléyade de proteínas, con o sin actividad enzimática demostrada, que son responsables, potenciales o actuales, de la modificación de polímeros de la pared celular. A continuación, se realiza una breve descripción de las principales enzimas pectolíticas que, además de ser investigadas en otros frutos, fueron estudiadas en la aceituna, centrándose en las principales proteínas pectolíticas objeto de estudio de esta Tesis.

Las pectinas son degradadas por enzimas pectinolíticos, pectinasas, los cuales presentan gran diversidad, debida en parte a la compleja naturaleza del sustrato degradado. Las plantas y los microorganismos son los principales productores de estos enzimas (Naidu y Panda, 1998). La mayoría de las modificaciones de la pared, durante la maduración de los frutos, están asociadas con la degradación de los polisacáridos pécticos (Brummell *et al.*, 2004), pero el momento y la velocidad a la que estos cambios ocurran, variarán en función de las características del fruto y de la variedad estudiada (Ali *et al.*, 2004). Las pectinasas, cuya acción enzimática se muestra en la Figura 5, se clasifican en tres tipos principales: enzimas desesterificantes (pectinesterasas), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinasas (Kashyap *et al.*, 2001).

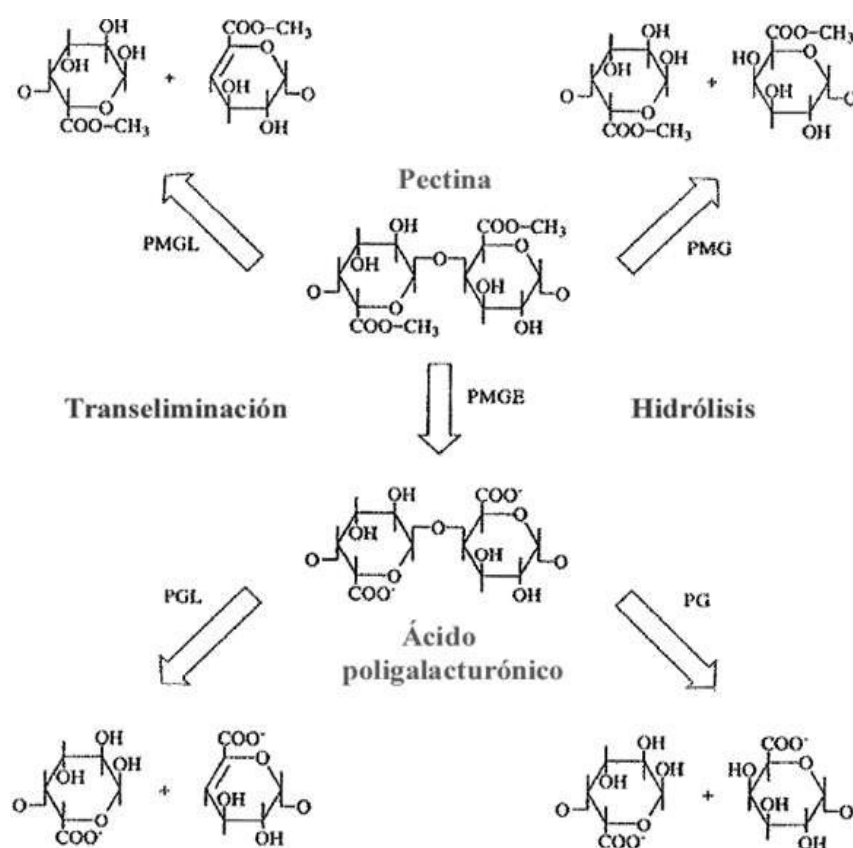


Figura 5. Esquema de la acción enzimática de las pectinasas.

PMGE: polimetilgalacturonato esterasa (pectinesterasa); PMGL: polimetilgalacturonato liasa (pectina liasa); PMG: polimetilgalacturonasa (pectina hidrolasa); PGL: poligalacturonato liasa (pectato liasa); PG: poligalacturonasa (pectato hidrolasa).

Así, la pectín metilesterasa (PME) cataliza la desesterificación de la pectina, y los enzimas despolimerizantes catalizan la escisión del enlace glicosídico α -(1 $\rightarrow$ 4) de la cadena de galacturonano de la molécula de pectina. Los enzimas despolimerizantes pueden clasificarse, asimismo, en función del mecanismo de rotura de los enlaces glicosídicos. La Poligalacturonasa (PG) escinde los enlaces por medio de hidrólisis, mientras que la pectín liasa (PL) y la pectato liasa, lo hacen mediante β -eliminación. Además, el prefijo endo- o exo- denota el modo de acción de estos enzimas, al azar (enlaces internos) o terminal (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de los enzimas pectinolíticos y su nombre de acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC) (Soriano, 2004).

Nombre recomendado por EC	Nombre común	Número EC	Sustrato	Modo de acción
Desesterificación de sustratos				
Pectin metil esterasa	Pectinesterasa	3.1.1.11	Pectina	Endo
Depolimerización de sustratos				
Hidrolasas				
Endopoligalacturonasa	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	Endo
Exopoligalacturonasa 1	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	Endo (terminal)
Exopoligalacturonasa 2	Poligalacturonasa	3.2.1.82	Pectato	Exo (penúltimo enlace)
Endopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	Endo
Exopolimetilgalacturonasa	Pectina hidrolasa		Pectina	Exo
Liasas				
Endopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	Endo
Exopoligalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	Exo
Endopolimetilgalacturonato liasa	Pectato liasa	4.2.2.10	Pectina	Endo
Exopolimetilgalacturonato liasa	Pectato liasa		Pectina	Exo

2.2.5.1. Enzimas desesterificantes: pectin metilesterasas (PME; EC 3.1.1.11)

Son enzimas que catalizan la desesterificación de los grupos metilo de la pectina, dando lugar a ácido poligalacturónico o pectato (Kashyap *et al.*, 2001). Su actividad se puede determinar midiendo la liberación de metanol. Las PME, catalizan la desmetilación del grupo carboxilo en la posición C-6, de los restos de ácido galacturónico de las pectinas de alto peso molecular, lo que conlleva a la eliminación de los grupos metilo de los galacturonanos esterificados.

De la bibliografía se deduce, que la eliminación de los grupos metilo incrementa el acceso a los polisacáridos del enzima PG, resultando en la interrupción del gel péctico (Barnavon *et al.*, 2001). Varios autores establecieron que los niveles de PME son muy altos en frutos inmaduros y disminuyen hasta poco antes de la maduración. Esta correlación negativa, entre los niveles de esta enzima y el grado de maduración, es empleada por algunos investigadores como indicador del tiempo que falta para que el fruto madure (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995).

2.2.5.2. Enzimas despolimerizantes o despolimerasas

Se clasifican atendiendo a tres aspectos, que se refieren al modo de ataque al esqueleto del ácido poligalacturónico, y siguen los siguientes criterios:

- a) El mecanismo químico de ruptura de los enlaces: hidrólisis o transeliminación.
- b) La naturaleza del sustrato preferido: pectina o ácido poligalacturónico.
- c) El modo de corte del polímero: endo o exo (Alkorta *et al.*, 1998) (Tabla 4).

Los enzimas despolimerizantes pueden romper los enlaces α -(1→4) glucosídicos, entre los monómeros de ácido galacturónico de las pectinas, por hidrólisis (hidrolasas) o por transeliminación (liasas).

- Hidrolasas: Estos enzimas, rompen los enlaces entre los monómeros de ácido galacturónico por adición de agua. Son activas a pH ácido y pueden ser inhibidas por el ión calcio (Guevara *et al.*, 1997). Se pueden dividir en dos grupos principales atendiendo al sustrato que hidrolizan:

- Poligalacturonasas (PG) o pectato hidrolasas

Las PG degradan la pectina desmetilada, es decir, el ácido poligalacturónico o pectato. Pueden tener modo de acción endo o exo. La endo-PG actúa al azar a lo largo de la cadena, lo que se traduce en una acusada disminución de la viscosidad del sustrato para un bajo nivel de actividad. La exo-PG cataliza la ruptura hidrolítica de enlace α -(1→4) terminal de la cadena de galacturonano, liberando ácido galacturónico como producto de reacción. A diferencia de la endo-PG, la exo-PG también escinde el ácido digalacturónico.

La PG está implicada en el ablandamiento de los frutos durante la maduración. El aumento de la solubilidad de las pectinas durante este proceso se puede deber, principalmente, a la despolimerización de las pectinas por la acción de esta enzima (Lohani *et al.*, 2004).

- *Polimetilgalacturonasas o pectin hidrolasas*

Estos enzimas degradan el polímero metilado, la pectina. Aunque hay algunas publicaciones que describen este tipo de actividad catalítica, la existencia de estos enzimas parece ser cuestionada, pues es posible que preparaciones de poligalacturonasas contaminadas con pectinesterasas, hayan sido consideradas por error como preparaciones de polimetilgalacturonasas (Alkorta *et al.*, 1998).

- Liasas: Estos enzimas, también llamadas transeliminadas, rompen los enlaces glucosídicos por β -eliminación en presencia de Ca^{2+} , obteniéndose una molécula de pectina de menor grado de polimerización, con un extremo reductor, y otra en cuyo extremo no reductor, se genera un doble enlace entre los C4 y C5. Según el sustrato sobre el que actúen, sea pectina o ácido poligalacturónico, se clasifican en polimetilgalacturonato liasas o poligalacturonato liasas, respectivamente. Estos enzimas debilitan las estructuras de la pared celular en láminas paralelas, afectando principalmente a la lámina media (Amrani- Joutei *et al.*, 2003).

- *Poligalacturonato liasas o pectato liasas (PcL)*

Las PcL, catalizan la ruptura de las uniones glicosídicas entre moléculas de ácido galacturónico no metiladas, en pectinas de baja metoxilación. Es Ca^{2+} dependiente, y puede actuar tanto al azar como en posición terminal (Whitaker, 1990). Estos enzimas actúan a pH alcalino, entre 8 y 10, y pueden tener modo de acción endo o exo (Sakai *et al.*, 1993).

- *Pectín liasas (PL)*

Son enzimas, que catalizan la ruptura de los enlaces en sustratos altamente esterificados. Actúan al azar, no habiéndose identificado ninguna PL que pueda escindir el enlace terminal (Ros, 1989).

2.2.5.3. Protopectinasas

Según Sakai *et al.* (1993), son enzimas que solubilizan la protopectina, y se clasifican en dos tipos. El tipo A degrada el ácido poligalacturónico de la protopectina, mientras que el tipo B degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular. En este tipo de enzimas se incluirían las hidrolasas y liasas que degradan el ramnogalacturonano (De Vries y Visser, 2001).

2.3. Metabolismo de la pared celular durante la maduración del fruto

2.3.1. Cambios generales

La maduración de la mayoría de los frutos carnosos, incluye una combinación de cambios texturales significativos y a veces drásticos, que son usualmente agrupados bajo el término “ablandamiento” (Rose *et al.*, 2003).

En el ablandamiento de los frutos durante la maduración, se pueden presentar diferentes mecanismos como la despolimerización y la solubilización de diferentes clases de polisacáridos de la pared celular, como las pectinas y los glicanos de matriz, por la pérdida de azúcares neutros de la pared celular y, al mismo tiempo, por el elevado nivel de expresión de los ciertos genes, codificantes de proteínas/enzimas asociadas con la degradación de la pared celular (Brummell y Harpster, 2001). La naturaleza y extensión de estos cambios, varía entre las distintas especies y aún entre variedades de una misma especie.

El ablandamiento que sufren los frutos durante la maduración, está caracterizado por una disminución en la firmeza de los tejidos (Wakabayashi, 2000). Este es resultado de una pérdida de la adhesión celular producida por la degradación de la lámina media, cuyos constituyentes principales son los polisacáridos pécticos, y en particular los poliurónidos. Actualmente, se propone que la degradación de xiloglucanos iniciaría el proceso de ablandamiento de los frutos, mientras que la degradación de las pectinas, contribuiría principalmente al ablandamiento hacia el

final de la maduración y en los estadios sobremaduros (Wakabayashi, 2000).

Durante el proceso de maduración de los frutos hay, un incremento en la solubilización parcial de pectinas, celulosa y en la solubilidad que da como resultado una despolimerización progresiva de estos compuestos. Existe además, una degradación de almidón, así como una acumulación de azúcares y ácidos orgánicos. En muchos casos se ha demostrado la acción de diversas enzimas catalíticas; algunas de ellas inducen la expansión celular, por la ruptura de enlaces covalentes y no covalentes entre la hemicelulosa y las microfibrillas de la pared celular, durante el proceso de maduración del fruto.

Además, se ha descrito que, al principio de la maduración, los cambios de pared celular catalizados por varias enzimas pueden regular y/o limitar las actividades de otras enzimas necesarias para el ablandamiento (Vicente *et al.*, 2007). Sin embargo, se demostró que el principal determinante no es una sola proteína, sino un conjunto de ellas que se encuentran implicadas en el ablandamiento de muchos frutos (Goulao y Oliveira, 2008). Cabe indicar, que hasta finales de la década de los años 80 del pasado siglo, se señalaba a la poligalacturonasa (PG) y a la pectin metilesterasa (PME) como las principales enzimas responsables de los cambios en la pared celular que ocurren durante el ablandamiento de los frutos (Brummell y Harpster, 2001).

2.3.2. Maduración de la aceituna

Durante el proceso de maduración, las aceitunas experimentan un conjunto de cambios químicos y bioquímicos, que se producen principalmente en la pared celular primaria del fruto. Una de las modificaciones más notorias está relacionada con la composición de las fracciones pécticas. A medida que avanza la maduración, la estructura de estas sustancias se altera por la acción de enzimas endógenas, causando la ruptura de las cadenas de pectinas. Estas contribuyen al ablandamiento del tejido vegetal y afectan a las características texturales y reológicas del fruto. Estos cambios estructurales, aumentan la capacidad de romper las estructuras celulares facilitando la liberación del aceite de oliva de las células vacuolares. Por tanto, el

estudio de los cambios que sufren los polisacáridos pécticos de la pared celular de la aceituna, principalmente controlados por las enzimas pectolíticas, durante el proceso de maduración, puede utilizarse como herramienta para establecer el punto óptimo de cosecha.

Los modelos propuestos durante los muchos años de investigación, atribuyen el fenómeno de la pérdida de firmeza de la aceituna, al desensamblaje de la lámina media y de las interconexiones, entre los distintos polisacáridos, que forman las paredes primarias (Jiménez *et al.*, 2000; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002; Mafra *et al.*, 2006a). La falta de progreso en la identificación de los factores clave determinantes de la pérdida de firmeza de los tejidos de la aceituna durante la maduración podría explicarse por la hipótesis actualmente vigente de que la desestructuración de las paredes celulares se debe a la acción concertada de numerosos enzimas sobre diversos componentes estructurales de la pared.

2.3.2.1. Pérdida de firmeza

El ablandamiento de los tejidos de la aceituna, que se manifiesta en una disminución de su firmeza, es uno de los cambios más visibles y comunes entre los que tienen lugar durante la maduración. Este proceso tiene consecuencias directas sobre las propiedades texturales finales de las aceitunas destinadas a mesa (Marsilio *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 2000; Marsilio *et al.*, 2000; Mafra *et al.*, 2006a). Así como, sobre el potencial de extractabilidad de las aceitunas destinadas a la producción del aceite, pues éste se extrae más fácilmente de los tejidos poco firmes (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002).

Los cambios texturales que experimenta el fruto durante la maduración, se acompañan de importantes modificaciones en la composición y estructura de las paredes celulares, y particularmente de la degradación de los polisacáridos que la constituyen. Debido a ello, la disminución de la firmeza de la aceituna, durante el proceso de maduración, se ha atribuido tradicionalmente a estos cambios, que incluyen solubilización y despolimerización de los polisacáridos de la pared celular, y reorganización de sus interconexiones así como la pérdida de azúcares neutros (Huisman *et al.*, 1996; Mafra

et al., 2001; Coimbra *et al.*, 1994; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002).

2.3.2.2. Cambios en las paredes celulares

La pérdida de firmeza de la aceituna se acompaña, habitualmente de la disrupción de las paredes celulares y de la disolución de la lámina media, que contribuye de manera decisiva a la adhesión intercelular, y está formada mayoritariamente por pectinas unidas entre sí por puentes de calcio (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002; Mafra *et al.*, 2001). Se observa solubilización y, en algunos casos, despolimerización tanto de pectinas como de hemicelulosas (Vierhuis *et al.*, 2000), así como, reorganización de las interacciones entre los distintos polisacáridos de pared.

La solubilización de estos polímeros, se manifiesta por un aumento en su extractabilidad con disolventes acuosos (Mafra *et al.*, 2001), mientras que la despolimerización representa una disminución del peso molecular debida a la acción de hidrolasas específicas y/o a la disgregación de los complejos pectínicos mantenidos por fuerzas no covalentes (Vierhuis *et al.*, 2000).

Varios trabajos de investigación, se llevaron a cabo con el fin de identificar los diferentes polisacáridos pécticos de la aceitunas fresca y su evolución durante la maduración, destacando los de Huisman *et al.* (1996). En este estudio, se describió en detalle la extracción secuencial de diferentes fracciones pécticas, de la pared celular, a partir de los sólidos insolubles al alcohol, utilizando una serie de agentes de extracción específicos. Estos autores, mostraron que es difícil de extraer el material péctico con alto grado de ramificación a partir de aceitunas inmaduras. Sin embargo, a medida que avanza la maduración, estas pectinas se extraen más fácilmente. En otro trabajo posterior (Jiménez *et al.*, 2001a), se estableció que las fracciones pécticas de la aceituna se ven marcadamente afectadas por el proceso de maduración. En general, se observó una liberación de homogalacturonanos y una pérdida y/o acortamiento de las cadenas de ramnogalacturonanos. Las pérdidas más importantes de homogalacturonanos, junto con la liberación de las cadenas laterales de ramnogalacturonanos, se produjeron entre el estado de envero y el estado de plena madurez. Asimismo, se observó un aumento drástico del contenido de los azúcares

relacionados con la pectina (ácido urónico, ramnosa y arabinosa), a la vez que los azúcares relacionados con la hemicelulosa (xilosa, manosa, galactosa y glucosa), aumentaron durante las últimas fases de la maduración del fruto.

En otro trabajo, se estableció que los contenidos de celulosa y hemicelulosa disminuyeron marcadamente durante el proceso de maduración de las aceitunas. Las cromatografías de intercambio iónico y de exclusión por tamaño (SEC), revelaron que la disminución del peso molecular de la hemicelulosa, se produce principalmente durante las primeras fases de maduración del fruto, es decir, entre el estado fruto verde y el estado envero, mientras que la disminución del peso molecular de la celulosa se produce con posterioridad (Jiménez *et al.*, 2001b).

Trabajando sobre los xiloglucanos, que representan la fracción hemicelulósica más abundante en la aceituna, Vierhuis *et al.* (2001) encontraron que estos compuestos de la pared celular del fruto, se forman principalmente a partir de dos tipos de oligosacáridos: XXSG y XLSG. La estructura de estos compuestos confirma la presencia de unos xiloglucanos específicos con un núcleo XXGG en la aceituna, identificados por la presencia de cadena lateral tipo α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Xylp.

Mafra *et al.* (2006b) describieron que con el avance del proceso de maduración de las aceitunas, se observa un aumento de la solubilización de los polisacáridos pécticos y hemicelulósicos, y del contenido de arabinosa en los extractos pécticos, acompañado por una disminución marcada del grado de metilesterificación de dichos compuestos. Además, estos autores observaron la síntesis de nuevos polisacáridos, como los glucoronoxilanos y xiloglucanos durante las últimas fases de maduración de las aceitunas.

Cardoso *et al.* (2007), encontraron que el proceso de maduración de las aceitunas, induce modificaciones en la estructura de los polisacáridos pécticos profundamente inmersos en las paredes celulares. Estos autores, establecieron que al comparar las aceitunas inmaduras y las recolectadas en su estado envero, las maduras tienen más cadenas laterales cortas de arabinanos altamente ramificados, y que la presencia de

dichos compuestos, podría utilizarse para indicar la presencia de compuestos pécticos en la pulpa de aceituna.

Trabajando sobre la misma línea de investigación Mínguez-Mosquera *et al.* (2002) determinaron la evolución, a lo largo de la maduración, de las aceitunas de la variedad 'Hojiblanca' de diferentes fracciones de sustancias pécticas: pectinas solubles en agua (PSA), pectinas solubles en quelatos de calcio o pectatos de calcio (PCa), pectinas insolubles o protopectinas (PP), así como el contenido en sólidos insolubles en alcohol (SIA). Se ha observado que la concentración de SIA disminuye durante ese periodo, incrementándose notablemente las fracciones PSA y PCa como consecuencia del aumento de la actividad enzimática del fruto. La fracción de PP, experimentó un descenso que fue correlativo al aumento en las fracciones PSA y PCa, lo que parece indicar la conversión de PP en pectinas solubles.

En un estudio realizado por Coimbra *et al.* (1998), se llevó a cabo una extracción secuencial del material de la pared celular de la pulpa de aceituna y su fraccionamiento, por precipitación con etanol y cromatografía de intercambio aniónico. Los resultados revelaron que la pared celular está caracterizada por una amplia gama de fracciones de polisacáridos. Los espectros de FT-IR en la región 1200-850 cm⁻¹, permitieron la predicción de la presencia de los ácidos urónico y los azúcares neutros en las muestras de los extractos pécticos de las pulpas de aceitunas.

Se ha observado, que tanto la composición como la solubilidad de los polisacáridos pécticos, carecen de importancia en el control de las propiedades estructurales de la aceituna durante la maduración del fruto. Así, Mafra *et al.* (2001), estudiaron los cambios estructurales que sufre la aceituna en tres fases claves de maduración: fruto verde, fruto en estado envero y fruto negro. Los resultados de este estudio revelaron, que la solubilización de las sustancias pécticas de la aceituna está relacionada con el relajamiento de las paredes celulares y con la pérdida de cohesión de los tejidos. La solubilización de las pectinas, puede ser consecuencia de la disrupción de las conexiones entre los distintos componentes de la pared celular, como resultado de la pérdida de residuos de galactosa o de otros azúcares neutros a partir de las

ramificaciones de los ramnagalacturonanos, lo que resultaría en una disminución de las propiedades cohesivas de la matriz péctica. Estas modificaciones, suelen manifestarse en la disolución de la lámina media, lo que disminuye la adhesión intercelular (Figura 6) y causa la pérdida de firmeza del fruto (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002; Mafra *et al.*, 2001)

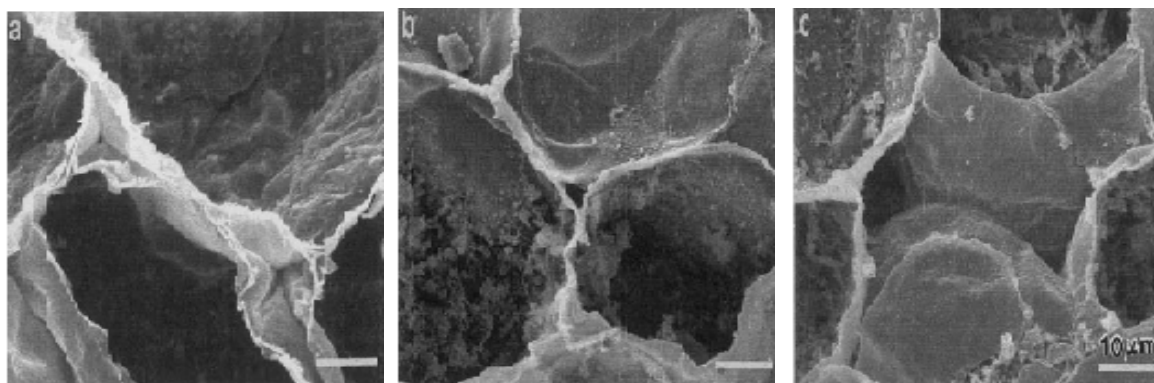


Figura 6. Alteración progresiva de las células parenquimáticas de la lámina media durante la maduración de la aceituna (Mafra *et al.*, 2001).

(a) aceitunas verdes; (b) aceitunas en estado envero (c) aceitunas negras

2.3.2.3. Enzimas modificadoras de la pared celular

La modificación de la estructura de la pared celular de la aceituna, durante la maduración, es un proceso integrado que implica toda una red de interconexiones entre numerosas rutas metabólicas. Virtualmente, todos los genes implicados en este proceso se expresan diferencialmente, en respuesta a distintos estímulos internos y externos. Consecuentemente, todas estas rutas responden, de un modo u otro, a la manipulación, tratamientos y/o condiciones de conservación a que es sometido el fruto una vez cosechado, lo que causa cambios generalizados en el metabolismo del mismo, y dificulta la comprensión y el control de determinados aspectos del proceso. Se conocen numerosas proteínas enzimáticas y no enzimáticas, cuya actividad modifica la composición y estructura de las paredes celulares de la aceituna. Así pues, las modificaciones que sufre la pared celular de la aceituna durante la maduración, son paralelas al aumento en la expresión de estos enzimas potencialmente relacionados

con su degradación.

En general, para asignar un papel potencial a un determinado enzima se siguió una aproximación “culpable por asociación” según la cual se proponía un posible papel en el proceso si la maduración coincidía con un aumento en sus niveles de transcritos, de proteína o de actividad in vitro (Goulao y Oliveira, 2008).

En un trabajo realizado sobre aceitunas de la variedad ‘Hojiblanca’ (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002), se observó que, durante la maduración, el ablandamiento de los tejidos es muy drástico y rápido. En este fenómeno, juegan un papel importante las sustancias pécticas presentes en el fruto, así como, las enzimas pectolíticas implicadas en el mecanismo biológico de degradación de las primeras, debido al fuerte incremento en sus niveles de expresión y actividad durante la maduración. Asimismo, la actividad de la PME tiende a aumentar hacia el inicio de maduración de la aceituna para luego disminuir de forma gradual en los estados maduros y sobremaduros. En cuanto a la PG, se observó que su actividad aumenta en los frutos inmaduros, disminuye en el estado envero para aumentar de nuevo en los frutos maduros (Figura 7).

La función de estos dos enzimas en la aceituna, se puede sintetizar de la forma siguiente:

- Acción de la pectinmetilesterasa (PME, EC 3.1.1.11), produce la eliminación de los grupos metilo de los residuos de ácidos galacturónicos presentes en las pectinas. Esta desmetilación tiene importantes consecuencias, puesto que la exposición de los grupos carboxilo libres cambia el pH y la carga de la pared celular, además de permitir la agregación no-covalente de los poliurónidos mediante puentes de calcio (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). Por otro lado, la desmetilación hace a estos polímeros susceptibles al ataque hidrolítico por parte de PG y de otros enzimas pectolíticos como los pectato-liasas (PL; EC 4.2.2.2), por lo que la actividad PME ejerce un papel dual sobre las propiedades de la pared celular, dependiendo del estadio fisiológico en que se encuentre la aceituna (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1978).

- Acción de la poligalacturonasa (PG), tanto de tipo exo (EC 3.2.1.67) como endo (EC 3.2.1.15), una vez producida la desesterificación, escindiendo la cadena desesterificada y facilitando la solubilidad del material péctico constitutivo de la lámina media que actúa de cemento de unión entre las células del fruto con el consiguiente ablandamiento (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1978).

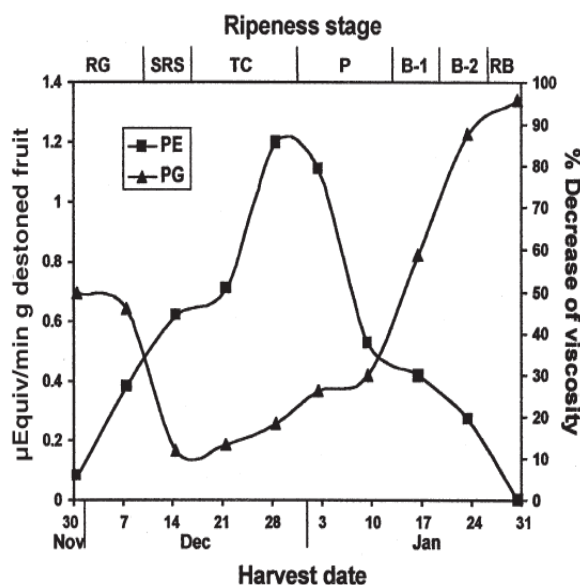


Figura 7. Evolución de la actividad de la PME y PG durante la maduración de las aceitunas (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002).

RG: piel de color verde maduro; SRS: piel con pequeñas manchas rojizas; TC: color cambiante; P: piel de color morado; B: piel de color negro; RB: piel de color negro maduro; B-1: frutos con superficie de color negro y pulpa blanca; B-2: fruto con superficie de color negro y pulpa morada; μEquiv: microequivalentes; PE: pectinmetilesterasa; PG: poligalacturonasa.

Confirmado el rol central que podrían tener la PG y la PME, en la pérdida de firmeza durante la maduración de las aceitunas, las investigaciones se centraron en la identificación de otras proteínas que pudieran cooperar con ellas en el desensamblaje de las paredes celulares de las aceitunas. Se ha sugerido que el alto grado de ramificación de las pectinas, que presentan abundantes cadenas laterales ricas en galactosa y arabinosa, podría controlar la porosidad de la pared celular, restringiendo el acceso de los enzimas pectolíticos a sus substratos y evitando su despolimerización (Brummell y Harpster, 2001). Por tanto, se ha propuesto un papel importante para las glicosidasas que eliminan azúcares neutros a partir de las ramificaciones de los

ramnogalacturonanos, y que incluyen entre otros menos estudiados a β -galactosidasa (β -Gal; EC 3.2.1.23) y α -L arabinofuranosidasa (AFasa; EC 3.2.1.55).

En un estudio realizado por Heredia *et al.* (1990), con objeto de demostrar la presencia de α y β -galactosidasas, α -manosidasa y α -arabinosa en el fruto del olivo, se observó que las actividades de estos cuatro enzimas, obtenidos bajo condiciones estándares, eran muy bajas incluso nulas en algunos casos. Sin embargo, la aplicación de condiciones óptimas dio lugar a un aumento marcado de la actividad de estos enzimas. Posteriormente, se estudió la evolución de la actividad de varios p-nitrofenil-o-glicosidasas durante el desarrollo y maduración de la aceituna, observándose que la actividad de estos enzimas no aparece en los frutos verdes, para detectarse con posterioridad en frutos maduros. Asimismo, se observó una correlación temporal entre el proceso de ablandamiento de la aceituna, la disminución de la actividad de varias glicosidasas y el contenido de los azúcares neutros de la fracción no-celulósica de la pared celular (Heredia *et al.*, 1992). También hay evidencias experimentales que apuntan a la relevancia de las celulosas en el proceso de ablandamiento de las aceitunas durante la maduración (Heredia *et al.*, 1993).

Por último, cabe destacar que las sustancias pécticas, involucradas en la formación de las emulsiones durante el batido, afectan de manera significativa las características reológicas de la pasta procesada y por tanto, al contenido del aceite extraído (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). Por ello, es de gran interés estudiar con profundidad la participación de estas sustancias, en el control de las características reológicas de la pasta de aceituna, con el fin de mejorar la eficiencia del proceso de extracción de aceite de oliva virgen, pues no se había llevado a cabo ningún estudio al respecto.

3. Elaboración de aceite de oliva virgen

A continuación, se describe el proceso de elaboración de aceite de oliva virgen.

3.1. Etapas preliminares

Son aquellas etapas necesarias para que el fruto llegue, a las siguientes fases de elaboración, en las condiciones idóneas para obtener un aceite de oliva virgen de calidad.

3.1.1. Recepción, limpieza y lavado

En el momento de entrada a la almazara, las aceitunas deben separarse según su estado, para su procesado por vías diferentes según su potencial de calidad (Jiménez *et al.*, 2001). La aceituna que llega a la almazara, lleva un porcentaje variable de materias extrañas de muy diversa índole, como tierra, piedras, hojas, tallos o hierbas. Para poder obtener aceites de calidad y evitar la interferencia de estos productos en las características organolépticas, y disminuir en gran parte el desgaste y averías de la maquinaria, es indispensable eliminar todos estos cuerpos extraños. La limpieza se realiza mediante limpiadoras, que utilizan corrientes de aire para la separación de los objetos menos pesados que la aceituna (Bueno, 2001), y con lavadoras que utilizan el agua como medio de solubilización y eliminación de los cuerpos más pesados. Los frutos procedentes del árbol, en principio y salvo circunstancias especiales, no deben someterse a un lavado pues se pierde extractabilidad en el proceso y los aceites obtenidos son menos estables y fragantes (Uceda *et al.*, 2004).

3.1.2. Almacenamiento de aceituna

El fruto una vez preparado, limpio y/o lavado, se almacena en las tolvas pulmón o de espera para ser molturado. Los frutos deben molturarse dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, para evitar alteraciones que modifican la calidad del aceite. El atrojado (almacenamiento prolongado del fruto), es la principal causa de deterioro de la calidad de los aceites, produciendo una grave alteración de los caracteres sensoriales, elevación de la acidez, debido esencialmente a la actividad de los microorganismos (Rodríguez de la Borbolla *et al.*, 1955) y una disminución de la estabilidad (García *et al.*, 1996).

3.2. Preparación de la pasta

Con el fin de facilitar la extracción del aceite contenido en los frutos, es necesario someter a la aceituna a una operación de molturación y posteriormente al batido de la pasta resultante, como se indica seguidamente.

3.2.1. Molienda

La molienda tiene por objetivo la rotura de los tejidos de la aceituna donde se aloja la materia oleosa. Se realiza mediante molinos de martillos y debe hacerse con la mayor uniformidad posible. Los aspectos fundamentales a considerar en esta operación son:

- Uniformidad. Para alcanzar la máxima eficacia en el batido.
- Grado de molienda. Para conocer el tamaño medio en el que quedan las partes más duras de la pasta; es regulable en los molinos en función del diámetro de los orificios de las cribas o distancia entre listellos. Debe ser más fino para las aceitunas de principio de campaña y mayor para frutos más maduros.
Cabe señalar, que una molienda gruesa implica una débil rotura de los tejidos y se obtienen orujos con alto contenido graso. En el caso de que se realice una molienda fina, se originan papillas en los tamices y aparecen finos en los alpechines.
- Aireación. Se deberá limitar en lo posible, mediante la reducción de la superficie y del tiempo de contacto de la pasta con el aire.
- Impurezas. Se evitará la incorporación de cualquier tipo de materias extrañas, incluyendo trazas metálicas, que afectan a las características organolépticas y actúan como catalizadores de la oxidación del aceite (Paz y Molero, 2001).
- Velocidad de trituración. Este parámetro, incide en las características sensoriales del aceite (Hermoso *et al.*, 1998) por la incorporación de trazas metálicas a la masa, lo que produce alteraciones en el color y sabor de los aceites, al tiempo que catalizan los procesos oxidativos (Uceda, 2004).

3.2.2. Batido

Como es conocido, la extracción de aceite de oliva virgen, se lleva a cabo utilizando únicamente métodos físicos. Alrededor del 80% de aceite, contenido en las vacuolas de las células de pulpa de la aceituna, puede extraerse fácilmente. El resto se encuentra disperso en el citoplasma como microgeles y, por tanto, es difícil de extraer.

Con el fin de perturbar las películas interfaciales del fruto, se mezcla la pasta poco a poco, modificando el grado de dispersión de las gotas de aceite, favoreciendo así los fenómenos de coalescencia. Este proceso, debe llevarse a cabo de forma que permita el mayor contacto posible entre las gotas de aceite sin provocar emulsiones, que luego dificulten el proceso de extracción.

El batido ha sido ampliamente estudiado por su influencia sobre la calidad del aceite (Morales y Aparicio, 1999), y los principales factores que condicionan esta operación son la temperatura y el tiempo de batido (Aguilera *et al.*, 2015).

Las condiciones de batido de la pasta afectan el rendimiento del proceso; así, cuando el tiempo de batido se prolonga de 50 a 75 minutos, incluso con tiempos de batido excesivamente largos (105 minutos) no producen resultados significativamente mejores según ya indicaba Hermoso *et al.* (1998). Por otra parte, un aumento de la temperatura de batido de la pasta, disminuye la viscosidad del aceite de oliva y favorece los fenómenos de coalescencia (Di Giovancchino *et al.*, 2002). En este sentido, la extracción de aceite a 40°C produce orujos con contenido graso inferior a los obtenidos a 30°C y a 18°C, aunque la alta temperatura, puede afectar negativamente a la composición y a las características sensoriales del aceite (Aguilera *et al.*, 2010; Aguilera *et al.*, 2015).

En la extracción de aceite de oliva virgen, se pueden presentar con frecuencia pastas emulsionadas o “pastas difíciles” que presentan dificultades en las distintas fases del proceso de extracción del aceite, e inciden negativamente en el rendimiento final (Alba *et al.*, 1990). Estas se producen por la textura de la pulpa de las aceitunas, y por la situación en que se encuentra el aceite en el protoplasma de la célula, formando una

emulsión extraordinariamente fina y dispersa, que permanece en suspensión gracias a la acción de distintos tipos de coloides protectores de estructura proteínica (Martínez Moreno, 1972).

Las pastas difíciles suelen formarse en aceitunas en las que han podido ocurrir las siguientes circunstancias:

- Condiciones climatológicas anormales o críticas que afectan el desarrollo biológico del fruto.
- Ataque de ciertas plagas o enfermedades.
- Tipo de abonado, forma y época en que se realice.
- Época de recolección (Beltrán *et al.*, 2003).

Estas pastas emulsionadas, se observan principalmente en ciertas variedades de olivo, como 'Hojiblanca' y 'Picual' con índices de madurez bajos, que son molturadas inmediatamente después de su recolección, provocando bajos rendimientos industriales.

Para mejorar el rendimiento del proceso de extracción de estas pastas difíciles se suelen utilizar coadyuvantes tecnológicos con efecto meramente físico (Reglamento CE 1513/2001).

Se ha descrito el empleo de diferentes coadyuvantes como agua, talco, cloruro sódico, carbonato cálcico y arcilla caolinitica. Sin embargo, actualmente los únicos autorizados por la reglamentación Europea son el talco y la arcilla caolinitica (BOE, 2015; (Reglamento CE 1513/2001).

3.2.2.1. Agua

La adición de agua a la pasta como coadyuvante puede ser muy eficaz, especialmente cuando la humedad de las aceitunas es baja; no obstante, se puede añadir en la batidora o en el decánter. Diversos autores indican que la adición de agua al decánter es significativamente más eficaz que la adición a la batidora; cuando el agua se adiciona a la batidora, se necesita una cantidad sustancialmente más elevada

(Hermoso *et al.*, 1998). La adición de agua implica una reducción del contenido de fenoles de los aceites y de los parámetros sensoriales relacionados con ellos: amargor y picante.

3.2.2.2. Cloruro de sodio

El uso de la sal puede tener (sobre todo a la concentración de 1.2%) una eficacia similar a la del talco en cuanto al rendimiento obtenido, y no produce efectos negativos sobre la calidad del aceite (Cruz *et al.*, 2007). No obstante, la presencia de NaCl en la pasta de aceituna, aumenta la densidad y la fuerza iónica de la fase acuosa que podría afectar la solubilidad de ciertos compuestos, e incluso modular la actividad de ciertas enzimas activas durante el proceso de batido (Clodoveo, 2012). El uso de este coadyuvante no se ha autorizado por la Comisión Europea (BOE, 2015).

3.2.2.3. Carbonato cálcico

Ha sido estudiado como coadyuvante tecnológico para la extracción de aceite de oliva virgen (Moya *et al.*, 2010), aunque no se ha autorizado su empleo (BOE, 2015). La estructura cristalina de este compuesto y su afinidad por el agua hacen que no reaccione con el aceite. Además, debido a su alta densidad (2.72 g/cm³), se elimina durante el centrifugado junto con el residuo sólido (orujo) (Espínola *et al.*, 2009). Se han descrito mejoras en el rendimiento del proceso de extracción, incluso con pastas no difíciles. La dosis a emplear depende del estado de las aceitunas, no siendo necesario superar el 0.3%.

3.2.2.4. Arcilla caolinítica

La utilización de este aditivo alimentario ha sido evaluada por el Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición y ha sido autorizado recientemente como coadyuvante tecnológico para la elaboración de aceites de oliva (BOE, 2015).

No existen trabajos publicados sobre el efecto de este coadyuvante en el rendimiento del proceso de extracción de aceite. Si bien en el informe de la Agencia Española de

Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), se describe que para dosis del 2.5% se obtienen rendimientos similares a los obtenidos para el microtalco natural (MNT) (AESAN, 2011). Asimismo, se describió que no hay efecto sobre la calidad del aceite extraído.

3.2.2.5. Microtalco natural

En la Unión Europea, el único coadyuvante autorizado en la elaboración de aceites de oliva vírgenes, por su exclusivo efecto físico, es el talco (Cert *et al.*, 1996). El talco es un producto natural obtenido en forma bruta en canteras o minas. Para su utilización como coadyuvante, el talco se prepara en forma micronizada con tamaños de partículas que pueden estar en el rango de 5 a 75 μm (Sánchez *et al.*, 2007a).

El Microtalco Natural (MTN), se utiliza como coadyuvante tecnológico debido a sus propiedades organofílicas reduciendo las emulsiones de aceite/agua y favoreciendo la liberación de aceite para su extracción.

Un mecanismo puramente físico, explica el comportamiento del talco al contacto con la pasta:

- Adsorbe las microgotas de aceite retenidas en las paredes de las células, dando lugar a la formación de macrogotas incrementando de esta manera la cantidad de aceite suelto.
- Impide la formación de emulsiones, o rompe las ya formadas
- Disgrega los microgeles y cambia la estructura de la pasta hacia un comportamiento hidrofílico, lo que permite una recuperación significativa de los rendimientos de extracción y un aumento de la capacidad de molturación de la planta (Martínez Moreno, 1972).

Su uso se recomienda para las “pastas difíciles” que presentan emulsiones y tienen bajos rendimientos grasos (Martínez *et al.*, 1975). Este coadyuvante, aglutina las pequeñas gotas de aceite, facilitando su extracción y produce una clarificación del aceite y un descenso del nivel de sólidos y grasa en el alpechín.

La adición de talco exige un continuo control analítico (grasa y humedad) de los orujos y de los alpechines (si se trabaja con sistemas en tres fases). De esta manera, se podrá regular la dosis de talco adecuada al tipo de pasta que se está procesando, y que puede variar desde el 0,5 al 2% en peso de aceituna (Hermoso *et al.*, 1998). En general, cuanto mayor es el contenido en agua de la aceituna (principios de campaña), la dosis de talco es más elevada, reduciéndose a medida que avanza la recolección.

Por otra parte, el talco es un producto mineral natural en el que los parámetros de producción (grado de molienda y contenido en carbonato) pueden variar de un origen a otro. Alba *et al.* (2007) observaron cómo estos dos factores, ejercen una influencia muy significativa en la corrección de la textura de las pastas fluentes y en el aumento del rendimiento de aceite, corroborando los resultados obtenidos por Sánchez *et al.* (2007b).

Los experimentos a escala industrial, propusieron el cuerpo intermedio de la batidora de tres cuerpos, como el lugar óptimo para la adición de talco, pues así se observaron las menores pérdidas de aceite (Hermoso *et al.*, 1998).

Diferentes dosis de MTN han sido probadas, y los resultados mostraron que los mejores rendimientos de aceite se han obtenido cuando se adicionó talco al 1%. Sin embargo, cuando se añadió talco al 2% no se observaron diferencias significativas a pesar de la presencia de pastas difíciles (Hermoso *et al.*, 1998).

Sin embargo, su utilización, ha de realizarse de forma razonada y sólo cuando la pasta de aceituna lo exija, pues un uso indiscriminado de éste, tanto en dosis, momento y lugar de adición, puede provocar el efecto contrario al deseado, pues el talco puede retener aceite en su superficie y, dado que el MTN es eliminado a través del orujo, puede producir un aumento del contenido graso del mismo (Hermoso *et al.*, 1998).

En cuanto a la calidad del aceite, la adición de microtalco natural no produce diferencias significativas, aunque se observa una tendencia a incrementar el contenido en fenoles, al tiempo que se incrementa el amargor y el atributo picante de los aceites, aumentando su estabilidad y disminuyendo el atributo dulce (Cert *et al.*, 1996, Aguilera

et al., 2015).

3.3. Extracción del aceite

En la extracción de los aceites de oliva vírgenes, hay que diferenciar dos etapas fundamentales:

- Separación Sólido-Líquido
- Separación Líquido-Líquido

A continuación, se van a considerar dichas etapas.

3.3.1. Separación Sólido-Líquido

Según Hermoso *et al.* (1998), esta operación constituye la parte fundamental del proceso de obtención del aceite. Está basada en la separación de las fases líquidas contenidas en la pasta de aceitunas. Se puede realizar por diferentes sistemas: filtración selectiva, extracción por presión, o extracción por centrifugación de la pasta. En la actualidad, los sistemas predominantes son los realizados por centrifugación.

En los sistemas de centrifugación continua, la utilización de un sistema de separación de dos fases (aceite y alperujo), o de tres fases (aceite, orujo y alpechín), incide sobre la composición del aceite de oliva. Así, en un sistema continuo de dos fases, la adición de agua es escasa, lo que se traduce en aceites con un mayor contenido en fenoles (Di Giovacchino, 2002), mayor estabilidad y caracteres sensoriales más acusados (Ranalli y Angerosa, 1996), fundamentalmente en frutado, amargo, verde y picante (Hermoso *et al.*, 1998).

3.3.2. Separación Líquido-Líquido

El mosto oleoso obtenido de la separación de las fases sólida y líquida, tiene una proporción variable, pero significativa, de humedad e impurezas que es necesario eliminar.

La separación de las impurezas y humedad que contiene el aceite, puede realizarse

por decantación natural, o por medio de centrifugas verticales, basadas ambas técnicas en las diferencias de densidades de los componentes del mosto oleoso. Actualmente, se emplean más las centrifugas verticales, que ofrecen un trabajo de forma continua y rápida. Durante esta etapa de clarificación del aceite, es esencial controlar la temperatura y la cantidad de agua de adición a la centrifuga vertical. Temperaturas elevadas y un aumento del agua adicionada, pueden producir, en el aceite, pérdidas de características organolépticas, descenso del contenido en polifenoles y de la estabilidad (Jiménez *et al.*, 1995; Cert *et al.*, 1999).

3.4. Almacenamiento del aceite

Obtenidos los aceites, es necesario conservarlos en depósitos, bajo condiciones adecuadas, con objeto de preservar las características físico-químicas y organolépticas. Son varios los aspectos que se deben considerar para preservar la calidad del aceite durante el almacenamiento previo a la comercialización (Uceda *et al.*, 2004). El aceite separado del mosto oleoso presenta siempre impurezas, generalmente inferiores al 0,5%, formadas por agua (en estado libre, en suspensión coloidal o en emulsión), sustancias ajenas al aceite que son necesarias eliminar durante su almacenamiento (Ranalli, 1992). La construcción de los depósitos es esencial para realizar una buena operación de eliminación de las impurezas decantadas (sangrado), evitando fermentaciones y pérdida de calidad de los aceites. Deben de ser de material inerte a fin de prevenir la incorporación de trazas metálicas a los aceites, que inician oxidaciones, pérdida de color y del atributo frutado del aceite (Angerosa y Di Giacinto, 1993).

4. Reología

El comportamiento reológico de la pasta de aceituna, es uno de los aspectos que influyen en el proceso de extracción de aceite de oliva.

El término 'Reología' describe el estudio de la deformación y el comportamiento de flujo

de materia.

A pesar de que la interpretación de los datos reológicos en ocasiones es compleja, los métodos reológicos en la industria agroalimentaria han demostrado la necesidad urgente de disponer de datos reológicos de diferentes materias primas y productos derivados.

En este trabajo de investigación, se estudiarán principalmente los módulos mecánicos (módulo de pérdida, G'' , módulo de almacenamiento, G'), por lo que se describen también aspectos como fluidos pseudoplásticos y viscoelasticidad.

4.1. Conceptos reológicos

Para empezar a desarrollar algunos aspectos reológicos de interés, es necesario establecer algunos conceptos que se manejan en los estudios sobre reología, tales como: esfuerzo, deformación, velocidad de deformación, flujo, viscosidad cortante, entre los más importantes.

4.1.1. Esfuerzo

El esfuerzo se define como la fuerza dividida por el área sobre la cual es aplicada. En general, sobre un elemento material cualquiera pueden actuar dos tipos de esfuerzos, los esfuerzos normales, que se refieren a la componente en dirección perpendicular a la superficie considerada, y esfuerzos de cizalla o cortantes, que son las componentes tangenciales a dichas superficies (Figura 8) (Dealy, 1982). Las unidades en las que se mide el esfuerzo son Pascales (Pa).

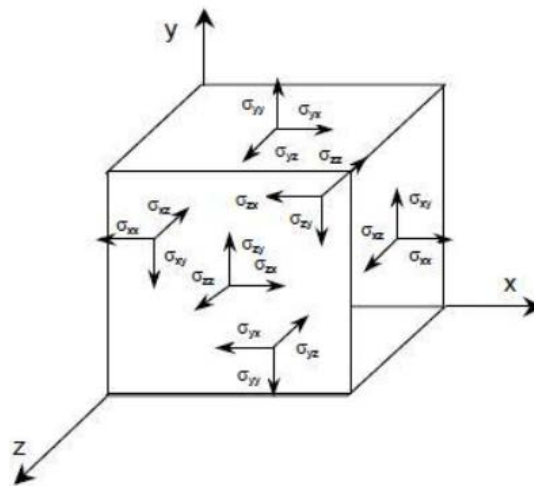


Figura 8. Espacio euclídeo con esfuerzos normales y de cizalla

4.1.2. Deformación

Cuando un esfuerzo es aplicable a un material (σ), se genera una deformación (γ), como resultado de este esfuerzo. Así pues, se define la deformación relativa como la deformación por unidad de longitud (γ). La longitud que se utiliza es aquella en la que ocurre la deformación (Figuras 9 y 10, Goodwin y Hudhes, 2008).

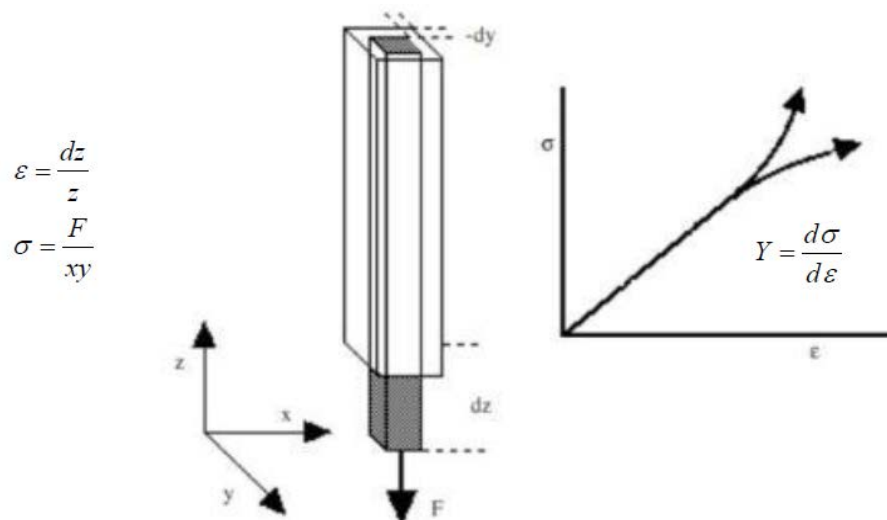


Figura 9. Deformación extensional a volumen constante $\varepsilon = \gamma_{yz} = (\gamma_{xx} + \gamma_{yy})$, Y es el módulo de Young

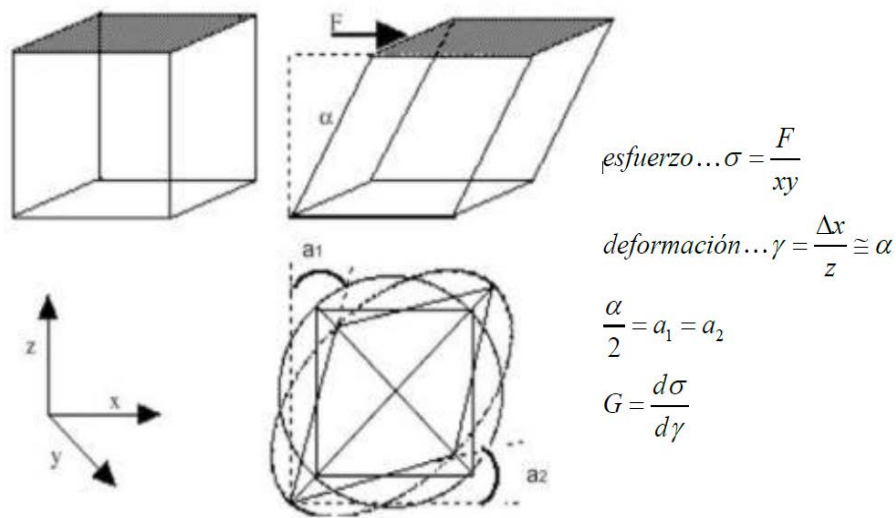


Figura 10. Deformación de cizalla $\gamma = \gamma_{xz} = \gamma_{zx}$, G es el módulo de cizalla

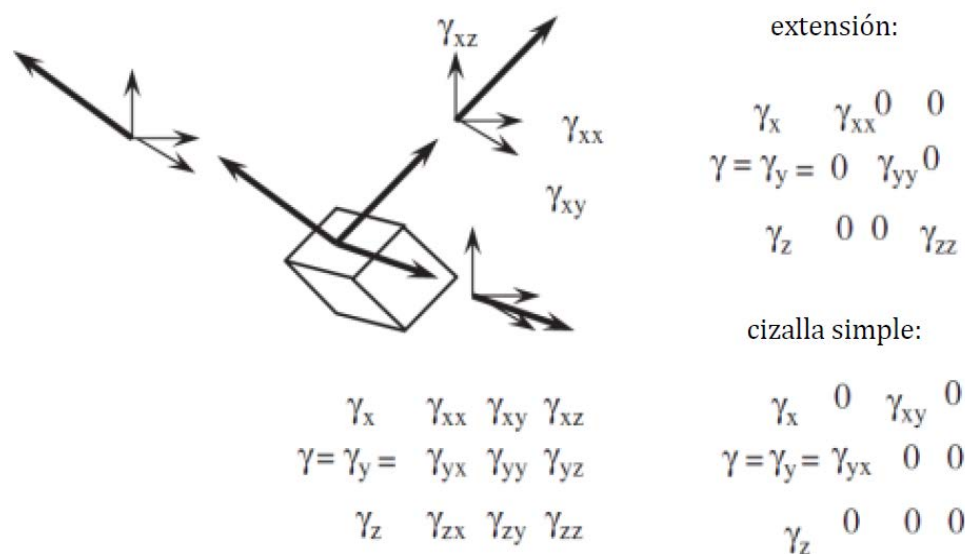


Figura 11. Deformaciones y esfuerzos de tensores

Algunas características que se observan en las Figuras 10 y 11 son:

- El módulo elástico es constante para deformaciones y esfuerzos pequeños. Esta linealidad viene dada por la ley de Hooke. Según la cual, los esfuerzos son

directamente proporcionales a las deformaciones.

- La deformación de cizalla, producida por la aplicación de un esfuerzo cortante (σ), se ilustra en la Figura 10. La sección inferior de la figura, muestra el caso general donde no hay rotación de los ejes principales de deformación. Las deformaciones son las diagonales del elemento material, una de las cuales es más corta que la otra.
- Para grandes esfuerzos y deformaciones se observa no linealidad.
- Los esfuerzos y las deformaciones son cantidades tensoriales y no escalares, esto pone en evidencia la complejidad matemática (Figura 10).

4.1.3. Velocidad de deformación y flujo

Cuando un fluido es estudiado por la aplicación de un esfuerzo, se genera un movimiento hasta que el esfuerzo desaparece. Consideremos dos superficies separadas por una pequeña apertura en la cual se mantiene el líquido, como se muestra en la Figura 12.

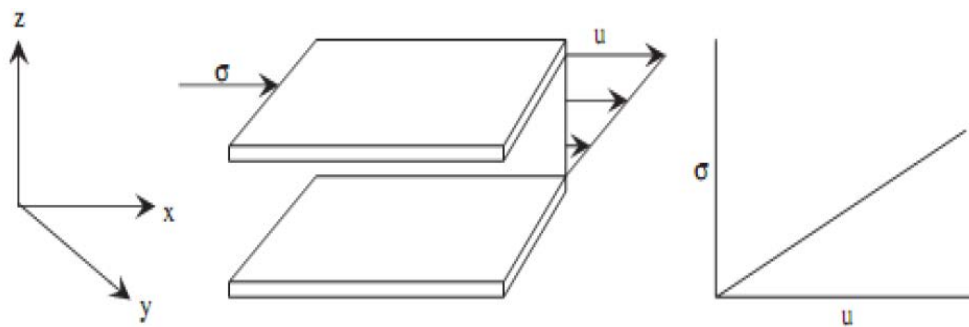


Figura 12. Gradiente de velocidad generado durante el cizallamiento de un fluido

Un esfuerzo cortante, debe mantenerse en la superficie superior para que ella se mueva a una velocidad constante, u . Este esfuerzo de cizallamiento, produciría un cambio continuo en la velocidad a través de la abertura hasta llegar a ser cero para superficies bajas (Goodwin y Hudhes, 2008). Ahora, en cada segundo, los desplazamientos producidos están en x , y la deformación vendrá dada por:

$$\gamma = \frac{x}{z} \quad (1)$$

donde, x es el eje en el que se producen los desplazamientos horizontales; y es el eje en el que se producen los desplazamientos diagonales, z es el eje en el que se producen los desplazamientos verticales.

y como $u = \frac{dx}{dt}$, se puede escribir la velocidad de deformación como:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{u}{z} \quad (2)$$

Los términos velocidad de deformación, gradiente de velocidad y velocidad cortante, son utilizados como sinónimos. Para grandes aperturas, la velocidad de deformación variara a través de la abertura por lo que se puede expresar como:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dz} \quad (3)$$

4.1.4. Viscosidad

La viscosidad, se puede definir como una medida de la resistencia a la deformación de un fluido. La Ley de Newton, relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad), y puede expresarse en una dimensión (ec. 4)

$$\sigma = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (4)$$

donde, σ es el esfuerzo cortante en Pa, μ es la viscosidad dinámica o absoluta en Pa.s, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación en s^{-1} .

Para un fluido Newtoniano, el parámetro μ es una constante en la ecuación 4 (aunque la viscosidad puede ser función de la presión, temperatura, composición). La viscosidad de los materiales, es de importancia y se utiliza en muchos cálculos de ingeniería, pues en reología los materiales se caracterizan de acuerdo con su comportamiento viscoso.

Generalmente, el comportamiento de los materiales es de fluidos no-Newtonianos, por lo que se utiliza el concepto de viscosidad aparente (viscosidad cortante) para describir este tipo de materiales. La viscosidad aparente η viene dada por la siguiente relación:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (5)$$

siendo σ el esfuerzo cortante en Pa, η es la viscosidad aparente en Pa.s, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación en s^{-1} .

4.1.5. Viscoelasticidad lineal y viscoelasticidad no lineal

Se habla de comportamiento viscoelástico, cuando el material exhibe simultáneamente algunas de las propiedades elásticas de un sólido ideal, y algunas de las propiedades de flujo de un líquido ideal. El comportamiento viscoelástico podría dividirse en dos grupos generales:

- Viscoelasticidad lineal, en la que las propiedades reológicas dependen únicamente del tiempo y no de la magnitud o tasa de aplicación de un esfuerzo. La mayoría de los alimentos muestran viscoelasticidad lineal por encima de ligeras deformaciones.
- Viscoelasticidad no lineal, donde las propiedades mecánicas están en función del tiempo del esfuerzo aplicado, la magnitud de este y en ocasiones, de la velocidad con la que se aplica. El estudio de la viscoelasticidad no lineal es experimental y teóricamente más complicado que la viscoelasticidad lineal, estando aún en el rango en el cual muchos alimentos son comprimidos o cizallados en la boca (Bourne, 2002).

Los componentes viscosos y elásticos de fluidos viscoelásticos, pueden medirse mediante pruebas oscilatorias de pequeña amplitud. El material de prueba, usualmente se ubica entre un cono y plato o platos paralelos, puestos en un reómetro con esfuerzo controlado. El cono o el plato, oscila con respecto a un punto central con una velocidad angular sinusoidal a baja amplitud, mientras que el esfuerzo de cizalla es medido. Es una prueba no destructiva cuando la amplitud es pequeña. Para un sólido elástico, el

esfuerzo cortante estará en fase con la deformación, mientras que para un fluido newtoniano el esfuerzo cortante estará a 90° fuera de fase con la deformación. Para un fluido viscoelástico el esfuerzo cortante está una onda más atrás de la deformación para un ángulo de diferencia entre 0° y 90°. La curva experimental, esfuerzo de cizalla-tiempo, puede dividirse en dos componentes (Bourne, 2002):

- El componente del esfuerzo en fase con la deformación por cizalla, que se define como el módulo de almacenamiento (o elástico) G' , es la relación del esfuerzo en fase con la deformación.

$$G' = \frac{\sigma'}{\gamma} \quad (6)$$

siendo σ' el esfuerzo cortante en fase, γ la deformación.

- El componente del esfuerzo 90° fuera de fase con la deformación de cizalla, definido como el módulo de pérdida (o viscoso) G'' , es la relación del esfuerzo de cizalla fuera de fase con la deformación.

$$G'' = \frac{\sigma''}{\gamma} \quad (7)$$

siendo σ'' el esfuerzo cortante 90° fuera de fase, γ la deformación.

Estas funciones, a su vez se relacionan mediante el factor o tangente de pérdida:

$$\frac{G''}{G'} = \text{factor o tangente de pérdida (tan } \delta) \quad (8)$$

4.2. Clasificación de los fluidos según su comportamiento reológico

En una primera clasificación, destacan dos grupos principales: los fluidos newtonianos y los no newtonianos, según obedezcan a la ley de Newton de la viscosidad o no.

Para los fluidos newtonianos, la función viscosidad es constante, siendo precisamente su valor el de la viscosidad newtoniana. En los fluidos no newtonianos, ya no se puede

hablar de la viscosidad, pues la relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación no es constante, y en este caso, se define la viscosidad aparente, que es función de la velocidad de deformación.

Una segunda clasificación, distingue entre los fluidos dependientes e independientes del tiempo. Los fluidos cuyo comportamiento sólo depende del esfuerzo cortante, se denominan independientes del tiempo, y su viscosidad, a una determinada temperatura, sólo depende de la velocidad de deformación. Los fluidos dependientes del tiempo, son aquellos cuya viscosidad depende, además, del gradiente velocidad del tiempo que actúa dicho gradiente. Por otra parte, existe un tipo de alimentos que tienen un comportamiento intermedio entre fluido viscoso y sólido elástico, son los denominados fluidos viscoelásticos. Se puede realizar una clasificación de los fluidos alimentarios según se recoge en la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de los diferentes comportamientos reológicos

Grupo	Denominación	Características
Fluidos independientes del tiempo	Seudoplásticos	La viscosidad aparente disminuye con el aumento del esfuerzo cortante
	Plásticos	Presentan un límite $\sigma = \sigma_0$ por debajo del cual no se presenta flujo
	Dilatantes	La viscosidad aparente aumenta con el esfuerzo cortante
Fluidos dependientes del tiempo	Tixotrópicos	La viscosidad aparente disminuye con el tiempo de aplicación de esfuerzo
	Reopécticos	La viscosidad aparente aumenta con el tiempo de aplicación de esfuerzo
Fluidos viscoelásticos	Viscoelásticos	Presentan características elásticas y viscosas simultáneamente

En la Figura 13 se recogen los reogramas característicos de los fluidos newtonianos y no-newtonianos en condiciones de flujo.

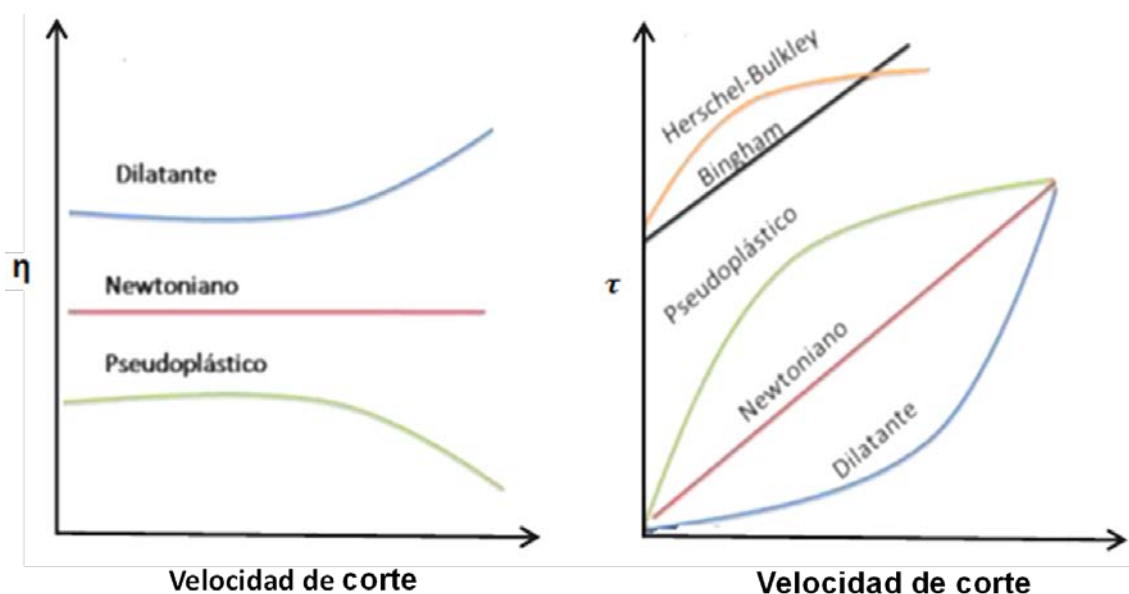


Figura 13. Viscosidad aparente vs velocidad de corte en fluidos Newtonianos y no-Newtonianos independiente del tiempo (a); esfuerzo cortante contra velocidad de corte en fluidos Newtonianos y no-Newtonianos independiente del tiempo (b) (Nuñez-Santiago *et al.*, 2002).

4.3. Reología de la pasta de aceituna

Mientras que las características de composición y textura de las aceitunas intactas, han sido objeto de numerosos estudios, no ocurre igual con las características reológicas de la pasta molida. Su conocimiento pretende ser de utilidad, para el diseño de equipos de extracción de aceite, así como para la optimización de las variables del proceso de extracción y la adaptación de estas a las características del fruto.

Durante el proceso de extracción de aceite, las propiedades reológicas de la pasta de aceituna dependen tanto del estado de madurez del fruto del que procede, como de los tratamientos que se hayan realizado. Di Renzo y Colelli (1997) indicaron, que la pasta de aceituna procesada exhibe determinados comportamientos mecánicos y reacciones cuando está sometida a un esfuerzo de deformación. Este comportamiento, está influenciado por su composición en sólidos solubles totales/concentración y tamaño de partículas (Ahmed *et al.*, 2004; Manayay e Ibarz, 2010), que difieren

substantialmente según el estado de madurez del fruto procesado. Por otra parte, es bien sabido que la temperatura y el tiempo de batido de la pasta, tiene una gran influencia sobre las propiedades físicas de las pastas de aceituna y en concreto, sobre sus propiedades reológicas, indispensables para el diseño de los equipos de procesado y para la optimización del proceso de extracción del aceite.

Muchos investigadores han utilizado modelos matemáticos para describir las propiedades de flujo de productos derivados de frutas (Rao y Anantheswaram, 1982). El comportamiento de estos últimos, puede describirse mediante la ley de la potencia (Saravacos, 1970; Holdsworth, 1971), o mediante el modelo de Herschel-Bulkley, en el caso que presenten una tensión de fluencia diferente de cero (Crandall *et al.*, 1982). Otros modelos matemáticos han sido utilizados para describir el comportamiento reológicos de los derivados de frutas, entre los que se citan: el modelo de Mizrahi-Berk, el modelo de Casson y el modelo de Bingham (Marcotte *et al.*, 2001). Algunos de estos modelos son potencialmente aplicables para describir el comportamiento de la pasta de aceituna.

Estudiando el comportamiento del flujo de la pasta de aceituna durante el proceso de batido, Di Renzo y Colelli (1997) establecieron, que los datos reológicos se ajustan perfectamente con los modelos de Herschel-Bulkley y la Ley de Potencia.

En un trabajo de investigación realizado por Tamborrino *et al.* (2012), se estudió el efecto que podrían tener el tiempo de batido, así como, el oxígeno disuelto en la pasta de aceituna sobre sus propiedades reológicas. Los resultados obtenidos revelaron, que tanto el tiempo de batido como la concentración de oxígeno inyectado durante el batido, son factores que influyen marcadamente sobre la viscosidad de la pasta de aceituna procesada, disminuyendo con el aumento del tiempo de batido corroborando así los resultados previamente reportados (Di Renzo y Colelli, 1997).

Boncinelli *et al.* (2013), comprobaron una serie de modelos matemáticos para estudiar el comportamiento reológico de muestras de pasta de aceituna, durante el proceso de extracción del aceite, a diferentes porcentajes de dilución con agua. Estos autores encontraron, que tanto las pastas de aceituna como el agua de vegetación, se

ajustaron perfectamente al modelo de Ley de Potencia. Se observó también que la dilución de las muestras con agua, reduce la viscosidad aparente de manera uniforme en el rango de velocidad de deformación-cizallamiento estudiado. Los resultados indicaron una variación progresiva del comportamiento reológico, de la pasta de aceituna procesada, de no newtoniano en la salida del molino, a casi newtoniano en la salida del decanter.

Masella *et al.* (2008) estudiaron la posibilidad del uso de la consistencia de la pasta de aceituna, como indicador del estado óptima para extraer el aceite de oliva. Los resultados de este estudio, mostraron la existencia de una relación estrecha entre la consistencia de la pasta de aceituna batida y su extractabilidad. Al incrementar el tiempo de batido y la humedad de la pasta, disminuye significativamente su consistencia y aumenta su extractabilidad, obteniéndose una correlación lineal altamente significativa entre la consistencia de la pasta batida y su extractabilidad.

5. Referencias bibliográficas

Acosta G. 1984. Comportamiento de la pectina de la pulpa de guayaba conservada con bisulfito de sodio. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias.

Alba J., Ruiz A., Hidalgo F. 1990. Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Edible fats and oils processing: basic principles and modern practices. Erickson DR (Ed.), Champaign, Illinois, USA: American Oil Chemists' Society pp. 341-347.

Alba J., Moyano J., Martínez F., Hidalgo F. 2007. Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. En: El aceite de oliva. Actas del XII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2005. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.), Jaén (España). pp. 503-508.

AESAN. 2011. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de una arcilla caolinítica como coadyuvante tecnológico en el proceso de obtención de aceite de oliva virgen (Número de referencia: AESAN-2011-010).

Aguilera M.P., Beltrán G., Sánchez-Villasclaras S., Uceda M., Jiménez A. 2010. Kneading olive paste from unripe 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *Journal of Food Engineering* 97, 533-538.

Aguilera M.P., Jiménez A., Sánchez-Villasclaras S., Uceda M., Beltrán G. 2015. Modulation of bitterness and pungency in virgin olive oil from unripe 'Picual' fruits. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117, 1463–1472.

Ahmed J., Shivare U.S., Singh P. 2004. Colour kinetics and rheology of coriander leaf puree and storage characteristics of the paste. *Food Chemistry* 84, 605-611.

Albersheim P., Mühlethaler K., Frey-Wyssling A. 1960. Stained pectin as seen in the electron microscope. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 8, 501-506.

Albersheim P., An J.H., Freshour G., Fuller M.S., Guillen R., Ham K.S., Han M.G., Huang J., O'Neil M., Whitecombe A., Williams M.V., York W.S., Darvill A. 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society Transactions* 22, 374–378.

Ali Z. M., Chin L., Lazan H. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science* 167, 317-327.

Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 33, 21-28.

Amrani-Joutei A., Ouazzani Chandi F., Bouya D., Saucier C., Glories Y. 2003. Examen en microscopie électronique de l'influence d'activités enzymatiques purifiées

sur les parois cellulaires des pellicules des raisins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 37, 23-30.

Angerosa F., Di Giacinto L. 1993. Oxidation des huiles d'olive vierges par les métaux manganèse et nickel, Note I (Metal-induced oxidation of virgin olive oils: manganese and nickel. Note I. *Revue Française des Corps Gras* 40, 41-44.

Aspinall G.O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. In *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*. P.K Stumpf and E.E. Conn (Eds.), vol. 3, pp. 473-500.

Badui S. 1995. Química de los alimentos (3ª Ed.), Alhambra Mexicana (Ed.), México DF, México. Academic Press, New York.

Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58, 693-701.

Beltrán G., Aguilera, M.P., Del Rio, C., Martínez, L. 2003. Influencia del proceso de maduración del fruto sobre el contenido en antioxidantes del aceite de oliva de la variedad 'Hojiblanca'. XI Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2003. Foro de la Tecnología Oleícola y la Calidad.

BOE 2015. Disposiciones generales Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 28 de julio de 2015. Boletín Oficial del Estado 179, 64243-64249.

Bourne M. 2002. Food Texture and Viscosity: Concept and measurement (2ª Ed.). Academic Press. San Diego California, EE.UU. p. 427.

Boncinelli P., Catalano P., Cini E. 2013. Olive paste rheological analysis. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 56, 237-243.

Bravo C. 1981. Caracterización de las sustancias pécticas y enzimas pécticas de la lechosa (*Carica papaya* L.) y su relación con la gelificación de la pulpa. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Brummell D.A., Harpster M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47, 311-340.

Brummell D. A., Dal Cin V., Crisosto C. H., Labavitch J. M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55, 2029-2039.

Burton R.A., Gidley M.J., Fincher G.B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structures and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* 6, 724-732.

Bueno M.A. 2001. El cultivo del olivo. En: *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*, Granada, Universidad de Granada-Puleva Food (Eds.).

Cardoso S.M., Ferreira J.A., Mafra I., Silva A.M.S., Coimbra M.A. 2007. Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7124-7130.

Cayón S.G., Valencia M., Morales O.H, Domínguez V.A. 2004. Desarrollo y producción del plátano Dominico Hartón (*Musa AAB Simmonds*) en diferentes densidades y arreglos de siembra. *Agronomía Colombiana* 2(1), 18-22.

Cert A., Alba J., León M., Moreda W., Pérez M.C. 1996. Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin olive oils obtained by centrifugation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3390-3934.

Cert A., Alba J., Pérez-Camino M.C., Ruiz-Gómez A., Hidalgo F., Moreda W., Moyano M.J., Martínez R., Olías J.M. 1999. Influence of extraction methods on the characteristics and minor components of extra virgin olive oil. *Olivae* 79, 41-50.

Clodoveo M.L. 2012. Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview. *Trends in Food Science & Technology* 25, 13-23.

Coimbra M.A., Waldron K.W., Selvendran R.R. 1994. Isolation and characterization of cell Wall polymers from olive pulp (*Olea europea* L.). *Carbohydrate Research* 252, 245-262.

Coimbra M.A., Barros A., Barros M., Rutledge D.N., Delgadillo I. 1998. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 37, 241-248.

Comisión Europea 2001. Reglamento (CE) nº 1513/2001 del Consejo, de 23 de julio de 2001 que modifica el Reglamento nº 136/66/CEE y el Reglamento (CE) nº 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L201, 4-7.

Contreras Esquivel J.C. 2003. Purificación y caracterización de poligalacturonas de *Aspergillus kawachii*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Argentina. 156 pp.

Crandall P.G., Chen C.S., Carter R.D. 1982. Models for predicting viscosity of orange juice concentrate. *Food Technology* 36, 245-252.

Cruz S., Yousfi K., Pérez A.G., Mariscal C., Garcia J.M. 2007. Salt improves physical extraction of olive oil. *European Food Research and Technology* 225, 359-365.

Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P., Delmer D.P. 1980. The primary cell walls of flowering plants. In: *The biochemistry of plants*. N.E. Tolbert. Press, New York. (Ed.), Vol (1), pp. 91-162.

Dealy J.M. 1982. Rheometer for molten plastics, Van Nostrand Reinhold Compagny, New York.

De Vries J.A., Rombouts F.M., Voragen A.G., Pilnik W. 1982. Enzymatic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers* 2, 25-33.

De Vries R.P., Vissier J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 497-522.

Di Giovancchino L., Costantini N., Ferrante M., Serraiocco, A. 2002. Influence of malaxation time of oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y aceites* 53, 179-186.

Di Renzo G. C., Colelli G. 1997. Flow behavior of olive paste. *Applied Engineering in Agriculture* 13, 751-755.

Espínola F., Moya M., Fernández D., Castro E. 2009. Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering* 92, 112-118.

Fernández Díaz M.J. 1971. The olive. En: *The biochemistry of fruits and their products*. Vol (2). Hulme A. C. (Ed.), Academic Press. London.

García J.M., Gutiérrez F., Castellano J.M., Perdiguero S., Morillo S., Albi M.A. 1996. Influence of storage temperature on fruit ripening and olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 264–267.

Goodwin, I.W., Hudhes, R.W. 2008. *Rheology for chemist. An introduction*. (2ª Eds.), RSC publishing.

Goulao L.F., Oliveira C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology* 19, 4-25.

Guevara M.A., González-Jaén M.T., Estévez P. 1997. Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Canadian. Journal of Microbiology* 43, 245-253.

Hasenhuettl G.L. 2008. Synthesis and Commercial preparation of food emulsifiers. In: *Food emulsifiers and their applications*. G.L. Hasenhuettl and R.W. Hartel (eds.), Springer-Verlag New York. pp. 11-37.

Henao E.C. 2012. Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscara de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción. Tesis Doctoral. Universidad de Cartagena.

Heredia A., Fernández-Bolaños J. Guillén R., Vioque B., Fernández J.C. 1990. Cellulases in cell wall-degrading extracts of *Olea europaea arolensis*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 190, 22-24.

Heredia A., Guillén R., Jiménez A., Fernández-Bolaños J. 1992. Olive fruit glycosidases: factors affecting their extraction. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 194, 561-565.

Heredia A., Guillén R., Jiménez A., Fernández-Bolaños J. 1993. Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 196, 147-151.

Hermoso M., González J., Uceda M., García-Ortíz A., Morales J., Frías L., Fernández A. 1998. Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas 61/98 Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía.

Holdsworth S.D. 1971. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. Journal of Texture Studies 2, 393-418.

Huisman M.M.H., Schols H.A., Voragen A.G.J. 1996. Changes in cell wall polysaccharides from ripening olive fruits. Carbohydrate Polymers 31, 123-133.

Ishimaru M., Kobayashi S. 2002. Expression of a xyloglucan endotransglycosylase gene is closely related to grape berry softening. Plant Science 162, 621-628.

Jaramillo M. 2004. Determinación de monosacáridos por cromatografía en fase Gaseosa para caracterizar la pared celular de las frutas. Proyecto de titulación previo

a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica de Quito, Ecuador.

Jiménez A., Hermoso M., Uceda M. 1995. Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo de dos fases: influencia de las diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. Madrid, España. *Grasas y Aceites* 46, 299-303.

Jiménez A., Uceda M, Beltrán G. 2001. Efecto de la separación Suelo-Vuelo y la preparación del fruto en el patio sobre las características del aceite. *Oleo* 4, 112-117.

Jiménez A., Rodríguez R., Felizón B., Fernández-Caro I., Guillén R., Fernández-Bolaños J., Heredia A. 2000. Cell wall polysaccharides implied in Green olive behaviour during the pitting process. *European Food Research and Technology* 211, 181-184.

Jiménez A., Rodríguez R., Fernández-Caro I., Felizón B., Guillén R., Fernández-Bolaños J., Heredia A. 2001a. Olive Fruit Cell Wall: Degradation of Pectic Polysaccharides during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 409-415.

Jiménez A., Rodríguez R., Fernández-Caro I., Felizón B., Guillén R., Fernández-Bolaños J., Heredia A. 2001b. Olive Fruit Cell Wall: Degradation of Cellulosic and Hemicellulosic Polysaccharides during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2008-2013.

Kashyap D., Vohra P., Chopra S., Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector. A review: *Bioresource Technology* 77, 215-227.

Keegstra K. 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology* 154, 483-486.

Lavee S. 1986. Olive. En: S.P. Monselise (Ed.), *CRC handbook of fruit set and development*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 261-276.

Lavee S., Wodner M. 1991. Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive. *The Journal of Horticultural Science* 66, 583–591.

Lohani S., Trivedi P.K., Nath P. 2004. Changes of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology* 31, 119-126.

Mafra I., Lanza B., Reis A., Marsilio V., Campestre C., De Angelis M., Coimbra M. A. 2001. Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiologia Plantarum* 111, 439-447.

Mafra I., Barros A.S., Coimbra M.A. 2006a. The combined effects of black oxidizing table olive process and ripening on the cell wall polysaccharides of olive pulp. *Carbohydrate Polymers* 68, 647–657.

Mafra I., Barros A.S., Nunes C., Vitorino R., Saraiva J., Smith A.C. Waldron K.W., Delgadillo I., Coimbra M.A. 2006b. Ripening-related changes in the cell walls of olive (*Olea europaea* L.) pulp of two consecutive harvests. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 988-998.

Manayay D., Ibarz A. 2010. Modelamiento de la cinética de reacciones del pardeamiento no enzimático y el comportamiento reológico, en el proceso térmico de jugos y pulpas de fruta. *Scientia Agropecuaria* 1, 155-168.

Marcotte M., Hoshahili A. R., Ramaswamy H. S. 2001. Rheological Properties of Selected Hydrocolloids as a Function of Concentration and Temperature. *Journal of Food Engineering* 34, 695–703.

Martínez Moreno J.M. 1972. Fundamentos fisicoquímicos de la técnica oleícola. CSIC (Ed.), Madrid, Spain.

Martínez Suárez J.M., Muñoz Aranda E., Alba Mendoza J., Lanzón Rey A. 1975. Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos Abencor. *Grasas y Aceites* 28, 379-385.

Masella P., Parenti A., Spungnoli P. 2008. Olive paste consistency as a control parameter for oil extraction: A preliminary approach. *Journal of Agricultural Engineering* 3, 27-30.

Marsilio V., Lanza B., De Angelis M. 1996. Olive cell wall components: physical and biochemical changes during processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 35-43.

Marsilio V., Lanza B., Campestre C., De Angelis M. 2000. Oven-dried table olives: textural properties as related to pectic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1271-1276.

McCready R.M., Owens H.S. 1944. Alkali-hydrolyzed pectins are potential industrial products. *Food Industries* 16, 794–796, 864–865, 906–908.

Mínguez-Mosquera M.I., Gómez J.C., Díez M.J.F. 1978. Ensayos de captación del ión cálcico y su relación con la textura en la aceituna madura. *Grasas y Aceites* 29, 417-422.

Mínguez-Mosquera M., Gallardo L., Roca M. 2002. Pectinesterase and Polygalacturonase in changes of pectic Matter in Olives (cv. *Hojiblanca*) intended for mill. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 93-99.

Morales M., Aparicio R. 1999. Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76, 295-300.

Moya M., Espínola F., Fernández D., De Torres A., Marcos J., Vilar J., Josue J., Sánchez T., Castro E. 2010. Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *Journal of Food Engineering* 97, 57-63.

Naidu G.S.N., Panda T. 1998. Production of pectolytic enzymes. A review: *Bioprocess Engineering* 19, 355-361.

Nemecek-Marshall M., MacDonald R.C., Franzen J.J., Wojciechowski C.L., Fall R. 1995. Methanol emission from leaves: enzymatic detection of gas-phase methanol and

relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiology* 108, 1359-1368.

Núñez-Santiago M.C., Méndez M.G., Solorsa F.J. 2002. Introducción a la reología, Instituto Politécnico Nacional, (1ª Ed.), p 104.

Owens H.S., Miers J.C., Maclay W.D. 1948. Distribution of molecular weights of pectin propionates. *Journal of Colloid Science* 3, 277-291.

Paz I., Molero M. 2001. Efecto catalítico de los metales sobre la estabilidad térmica de los aceites de oliva. *Grasas y Aceites* 52, 373-379.

Rallo L., Cuevas J. 1999. Fructificación y producción. En: *El cultivo del olivo*. (3ª Ed), Barranco, D. Fernández. Escobar, R., Rallo, L. (Eds.), Mundi-Prensa, Madrid pp. 117-150.

Ranalli A. 1992. Incidence of the processing parameters of the olive fruits on the chromatic and analytical characteristics of the oils. *Industria Alimentaria* 31, 513-526.

Ranalli A., Angerosa F. 1996. Integral Centrifuges for olive oil extracción. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 417-422.

Rao M.A., Anantheswaram R.C. 1982. Rheology of fluids. *Journal of Food Processing* 36, 116-126.

Rodríguez de la Borbolla J.M., Alcalá M.J., Fernández Díez A., González Pellisó F. 1955. Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. *Grasas y Aceites* 6, 5-22.

Ros J.M. 1989. Producción de poligarocturonasas termoestables de interés tecnológico por *Rhizopus nigricans*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Murcia.

Rose J.K.C., Catalá C., Gonzalez-Carranza Z.H., Roberts J.A. 2003. Cell wall disassembly. In: Rose, J.K.C. (Ed.), The Plant Cell Wall. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido. pp. 264-324.

Rincón L. 1990. Estudio de factibilidad de obtención de pectina a partir de desechos cítricos, Trabajo de Grado, Facultad de ingeniería, Universidad Nacional de Colombia.

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: Production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* 39, 213-294.

Sánchez S., Pacheco R., La Rubia M.D., Sánchez A., Pereira M.G. 2007a. Evolución histórica de la utilización de coadyuvantes tecnológicos en la producción de Aceite de Oliva. En: Revista de la CECEL. I Congreso de la Cultura del Olivo. Jaén (España). pp. 623-633.

Sánchez S., Pacheco R., La Rubia M.D., Sánchez A., Pereira M.G. 2007b. Aplicación de distintos microtalcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: El aceite de oliva. Actas del XII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2005. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.), Jaén (España). pp. 497-502.

Saravacos G.D. 1970. Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purees. *Journal of Food Science* 35, 122-125.

Somerville C., Baue S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. 2004. Towards a system approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206-2211.

Soriano M.L. 2004. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PeIA de *Paenibacillus* sp. BP-23 E YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

Tamborrino A., Catalano P., Leone A. 2012. Evaluation of mechanical and rheological aspects of the malaxed olive paste. International Conference Ragusa-Italy: Safety Health and Welfare in Agriculture and in Agro-food Systems.

Uceda M. 2004. Variabilidad intraspecífica de los factores que determinan la calidad del aceite de oliva. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.

Uenojo M., Pastore G.M. 2007. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. Química Nova 30, 388-394.

Van Buren, J. 1991. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En: Walter, R. (Ed.). The chemistry and technology of pectins. San Diego, California, Academia press, Inc. pp. 1-22.

Vierhuis E., Schols H.A., Beldman G., Voragen A.G.J. 2000. Isolation and characterization of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages. Carbohydrate Polymers 43, 11–21.

Vierhuis E., York W. S., Kolli V.S. K., Vincken J.P., Schols H.A., Van Alebeek G.J.W.M., Voragen A.G.J. 2001. Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. Carbohydrate Research 332, 285-297.

Vicente A.R., Saladie M., Rose J.K.C., Labavitch J.M. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. Journal of the Science of Food and Agriculture 87, 1435-1448.

Wakabayashi K. 2000. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. Journal of Plant Research 113, 231-237.

Waldron K. W., Smith A. C., Parr A. J., Ng A., Parker M. L. 1997. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. Trends in Food Science and Technology 8, 213-221.

Walter, R. 1991. The chemistry and technology of pectin. Academic Press (Ed.), USA. Cap. VIII, pp. 147-149.

Walton E.D., Sinclair B. 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits; University of California. Division of agricultural sciences. pp. 946-1984.

Whitaker, J. R. 1990. Microbial pectolytic enzymes. En: Microbial enzymes and biotechnology, (2^a Ed.). Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. (Eds). Elsevier Science Publishers Ltd, Essex, England, pp. 133- 176

Willats W.G.T., Knox J.P., Mikkelsen J.D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in Food Science & Technology 17, 97-104.

JUSTIFICACIÓN

La investigación realizada, que da origen a esta Tesis Doctoral, se justifica considerando que el sector del olivar y del aceite de oliva tiene una importancia decisiva en la economía agraria española, y particularmente en algunas zonas de Andalucía, donde las aceitunas proporcionan la base de dos industrias importantes: producción de aceites de oliva y elaboración de aceitunas de mesa.

El estudio del proceso de maduración de la aceituna tiene un gran interés, pues varios trabajos de investigación establecieron, que durante la maduración del fruto, los componentes de la pared celular y de la lámina media de la célula vegetal, experimentan notables variaciones estructurales que ocasionan cambios en la textura de los frutos. Las sustancias pécticas, hemicelulosa y celulosa, son sometidas a procesos de despolimerización que contribuyen al ablandamiento del tejido vegetal.

Por otra parte, en algunas regiones olivareras, se presentan serias dificultades técnicas en la elaboración del aceite con ciertos tipos de aceitunas, pues dan lugar a pastas que presentan dificultades durante su extracción (pastas fluentes, fuertes o difíciles). Estos problemas, se ponen de manifiesto en la retención u oclusión de las fases líquidas en la pasta, en la retención del aceite, fugas de sólidos, y por tanto, menor rendimiento de extracción de aceite.

La emulsión es un fenómeno que tiene lugar en la pasta de aceituna procesada, entre las dos fases líquidas “agua y aceite”, por la acción de un agente emulsionante que facilita este proceso. Ello se produce, cuando los frutos se recogen durante la primera etapa de maduración con un nivel de humedad (por lo general superior al 55%), y se molturan inmediatamente. La pasta de aceitunas emulsionada, tiene una textura suave y muy homogénea. Cuando este tipo de emulsión ocurre en la pasta de aceituna, esta se denomina difícil.

Durante el proceso de extracción de aceite, los agentes emulsionantes son, generalmente, polímeros pécticos de alto peso molecular, que se derivan de los polisacáridos de la pared celular, y promueven la formación de emulsiones por acción interfacial, alterando así las características reológicas y texturales de la pasta de

aceituna. Estas sustancias representan un factor determinante que condiciona el potencial de extractabilidad de la pasta de aceituna, independientemente del método de elaboración empleado. En términos reológicos, este tipo de pasta pertenece a los fluidos *no newtonianos* o *fluidos de Bingham*.

Cuando una tensión se aplica a la pasta de aceituna emulsionada, ésta actúa como un semi-sólido a viscosidad de plástico. Estas pastas suelen causar problemas durante todo el proceso de extracción de aceite. La separación del aceite es menos fácil, reduciendo el rendimiento industrial del proceso de extracción, debido a la gran cantidad de aceite que queda atrapado en los tejidos coloidales del citoplasma o emulsionada con el alpechín, llamado aceite “no libre”, y como consecuencia de ello, el orujo es más rico en aceite.

La adición de coadyuvantes tecnológicos, como el microtalco natural (MTN), se ha comprobado que permite incrementar el rendimiento de aceite sin alterar los parámetros físico-químicos del mismo. El empleo de dicho coadyuvante, está unánimemente reconocido en el sector de elaboración de Aceite de Oliva Virgen, por su interés en el tratamiento de las pastas difíciles, que se observan en ciertas variedades de aceitunas como “Hojiblanca”. Al ser un producto natural, su composición puede variar si las canteras de donde se extrae, están situadas en zonas geográficas diferentes, afectando a sus características físico-químicas como la granulometría y el contenido en carbonato. La preparación del MTN para su posterior aplicación, también puede ser otro factor diferenciador. En este sentido, se ha comprobado a nivel de laboratorio, cómo la procedencia del MTN y su preparación, podrían tener cierta influencia sobre el rendimiento en materia grasa de los aceites.

Las revisiones bibliográficas realizadas, indican que se ha ensayado con diferentes dosis de talco, y los resultados mostraron que dosis altas pueden conducir a pérdidas de aceites en los orujos, pues el talco puede retener más materia grasa de lo normal, y éste se elimina con el orujo.

No obstante, ningún estudio cuantitativo se hizo a nivel de laboratorio para dilucidar el

mecanismo físico de actuación del talco, como coadyuvante tecnológico, sobre la ruptura de las emulsiones, aceite-agua que se generan durante la operación de batido por la acción de las sustancias pécticas.

En consecuencia, se hace necesario un mayor conocimiento de las interacciones electrostáticas entre el talco y las pectinas, así como, los cambios bioquímicos, reológicos y texturales que sufre la aceituna durante el proceso de maduración, lo que permitirá mejorar el control, tanto de la calidad, como de la eficiencia del proceso de extracción de aceite de oliva y determinar el momento óptimo de recolección.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El fruto varía en características pomológicas, físicas y bioquímicas durante su maduración lo que da lugar a cambios, entre otros, en la estructura y composición de la pared celular. Los cambios asociados a las sustancias pécticas, podrían afectar a las características reológicas de la pasta de aceituna y determinar, en gran medida, la extractabilidad del aceite de oliva virgen durante su proceso de extracción, por su capacidad como agentes emulsionantes.

Esta variación en la composición de la fracción pectica y la carga enzimática asociada, puede variar, además de por la propia maduración del fruto, por el componente genético de las variedades de olivo.

El conocimiento de la bioquímica asociada a la pared celular, y de la formación de las denominadas 'pastas difíciles', permitirá profundizar en el mecanismo de acción del microtalc natural (MTN) como coadyuvante tecnológico, y en definitiva, permitirá mejorar el rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen.

En esta Tesis Doctoral, una de las hipótesis que se pretende validar es que la diferencia en las velocidades de ablandamiento de las tres variedades de aceituna más cultivadas en España ('*Arbequina*', '*Picual*' y '*Hojiblanca*'), se debe a la degradación diferencial de alguno o algunos de los componentes de la pared celular, lo que supondría la acción de alguna o algunas de las enzimas implicadas en dicha degradación (poligalacturonasa (PG), pectinmetilesterasa (PME), pectato-liasa (PcL), pectin-liasa (PL).

Estas sustancias serían las pectinas, polisacáridos de la pared celular del fruto, que están involucradas en la formación de emulsiones durante la operación de batido y cuya acción es reducida por la adición de un coadyuvante tecnológico como es micro talco natural (MTN).

Otra hipótesis a considerar, es la existencia de una estrecha relación entre las propiedades reológicas y físicas del fruto del olivo (viscosidad y elasticidad),

principalmente controladas por las sustancias pécticas, la actividad de las enzimas pectolíticas, y la liberación del aceite contenido en las células mesocárpicas del fruto.

OBJETIVOS

Con el fin de comprobar las hipótesis planteadas, es necesario fijar unos objetivos a alcanzar, como son:

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente investigación, es asociar los cambios en la composición de los polisacáridos pécticos, con las propiedades texturales y reológicas de la pared celular de la aceituna, en diferentes etapas de maduración del fruto y del proceso de extracción de aceite de oliva virgen, con el fin de generar fundamentos para futuros desarrollos tecnológicos en el control de la optimización de proceso de extracción del aceite de oliva virgen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se han establecido son los siguientes:

- Evaluar el efecto de las características físicas y químicas (granulometría D50 y porcentaje de carbonato) y de la dosis de talco, sobre el rendimiento del proceso de extracción y la ruptura de las emulsiones aceite-agua.
- Analizar la influencia de las sustancias pécticas en las emulsiones aceite-agua, y el mecanismo de su ruptura mediante la adición de microtalco.
- Conocer el efecto de la operación de batido sobre la solubilización de las sustancias pécticas y proteicas de la pared primaria de la pasta de aceituna.
- Profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el ablandamiento de la aceituna, a través un estudio detallado del proceso de reconversión y solubilización de las diferentes fracciones pécticas, durante la maduración de la aceituna.

- Caracterizar las propiedades reológicas de la aceituna a lo largo de la maduración del fruto y su relación con la composición de los polisacáridos pécticos de la pared celular.

Para alcanzar los objetivos previstos, el estudio se dividió en cuatro fases.

- En la primera, se estudiaron los cambios bioquímicos y la actividad de la pectinmetilesterasa involucrada en la biosíntesis de metanol, y la degradación de los polisacáridos pécticos durante la maduración de aceituna.
- En la segunda, se estudió la relación entre la composición de los polisacáridos pécticos de la pared celular y la evolución de las características texturales y reológicas a lo largo de la maduración del fruto, así como, su influencia sobre el rendimiento del proceso de extracción del aceite obtenido.
- En la tercera, se estudió el efecto de las características físicas y químicas (porcentaje de carbonato y granulometría D50) y de la dosis de talco, sobre la ruptura de las emulsiones aceite-agua y el rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen de la variedad 'Hojiblanca'.
- En la cuarta, se efectuó el estudio del efecto de la adición de diferentes dosis de microtalco natural, sobre la disolución de las sustancias pécticas y proteínas de la pasta de aceituna, durante la operación de batido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de alcanzar los objetivos establecidos en esta Tesis Doctoral, se utilizaron los materiales y se aplicaron los métodos que a continuación se consideran:

1. Materiales

1.1 Material vegetal

Para el ensayo del efecto de las características físicas y químicas del talco, sobre el rendimiento del proceso de extracción (2009/2010), y la ruptura de las emulsiones aceite en agua (2012/2013), se tomaron muestras de fruto de la variedad 'Hojiblanca' cultivada en el Centro IPAFA 'Venta del Llano' Mengíbar (Jaén).

Para el ensayo del efecto del uso de microtalco natural, sobre la disolución de las sustancias pécticas y proteínas de las aceitunas, durante el proceso de extracción de aceite, se tomaron muestras de aceitunas de la variedad 'Hojiblanca', pertenecientes a la colección del Centro IPAFA de Cabra (Córdoba) durante la campaña 2012/2013.

Para el ensayo del efecto del proceso de maduración del fruto, sobre la evolución de las sustancias pécticas, metanol, urónidos 3,4 insaturados, proteínas en los frutos, actividades enzimáticas y propiedades reológicas, se tomaron muestras de tres variedades: 'Arbequina', 'Picual' y 'Hojiblanca', de la finca experimental del Centro IFAPA 'Venta del Llano' Mengíbar (Jaén). En estos ensayos, las aceitunas fueron muestreadas a lo largo de su maduración, entre los meses de septiembre de 2011 y febrero de 2014. La descripción detallada de las fechas de toma de muestras, se recoge en los correspondientes capítulos de resultados

1.2. Microtalco natural

La denominación y la casa comercial de cada tipo de talco, empleado en los ensayos, se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Denominación y casa comercial de los distintos talcos utilizados en el estudio

Talco	Nombre Comercial	Casa Comercial
MTN1	Micro-Talco FC8 - AW	Mondo Mineral B.V
MTN2	Talcoliva M	Luzenac
MTN3	Talco Miber Indutal C-20	Minerales Roset, C.B.
MTN4	Talcoliva	Luzenac

En la Tabla 2 se recogen las características físicas y químicas de los cuatro tipos de talco ensayados.

Tabla 2. Características físicas y químicas de los talcos ensayados

Tipo de Talco	Carbonato (%)	Granulometría D50 (μm)	Densidad real (g/cm^3)	Superficie específica B.E.T (m^2/g)
MTN1	4.0	2.4	2.77	7.0
MTN2	0.8	7.1	2.78	9.0
MTN3	0.5	13.0	2.77	7.0
MTN4	1.1	16.3	2.78	6.0

2. Métodos

2.1. Determinaciones en el fruto

2.1.1. Caracterización pomológica

De cada una de las muestras, una vez homogeneizadas, se toman 100 frutos al azar a los que se lleva a cabo las siguientes determinaciones:

2.1.1.1 Índice de madurez

Se trata de un método basado en la variación de pigmentación de la piel y la pulpa, a lo largo del proceso de maduración del fruto (Uceda y Frías, 1975). Se toman 100 aceitunas al azar de la muestra previamente homogenizada, clasificando los frutos en cada una de las clases o categorías que se recogen en la Tabla 3, que oscilan entre

0 y 7.

El índice de madurez (I.M), se define como el sumatorio de los productos de los frutos de cada clase o categoría, multiplicado por el valor numérico asignado a cada clase, dividido por el número total de frutos (ec. 1). Por tanto, el índice de madurez puede variar de 0 a 7.

$$IM = \frac{a_0 \cdot 0 + b_1 \cdot 1 + c_2 \cdot 2 + d_3 \cdot 3 + e_4 \cdot 4 + f_5 \cdot 5 + g_6 \cdot 6 + h_7 \cdot 7}{100} \quad (1)$$

siendo: *a, b, c, d, e, f, g, h*, el número de frutos de las clases 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, respectivamente.

Tabla 3. Categorías o clases de frutos del índice de madurez

Índice de madurez	Coloración de la piel de la aceituna
Clase 0	Piel verde intenso
Clase 1	Piel verde amarillento
Clase 2	Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero
Clase 3	Piel rojiza en más de la mitad del fruto. Final de envero.
Clase 4	Piel negra y pulpa blanca
Clase 5	Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa
Clase 6	Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso
Clase 7	Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso

2.1.1.2. Peso medio de la aceituna

La determinación del valor medio del peso del fruto (g), se lleva a cabo pesando 100 frutos tomados al azar y dividiendo por el número de frutos, utilizando para la pesada una balanza con una sensibilidad de $\pm 0.01g$.

2.1.1.3. Peso medio del hueso

De la misma muestra de fruto, se separan los huesos y se determina su peso medio (g), empleando para la pesada una balanza con una sensibilidad de $\pm 0.01g$.

2.1.1.4. Relación pulpa/hueso

A partir de los datos de peso de fruto y de hueso, proporcionados por la muestra analizada, se establece la relación pulpa/hueso.

2.1.2. Determinación de la humedad

Se muele una muestra representativa de aceitunas, obteniéndose una masa de la que, una vez homogeneizada, se pesan 30 g en un recipiente de acero inoxidable cubierto con una lámina de plástico resistente a altas temperaturas. La muestra se lleva a desecación a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta pesada constante, en una estufa de circulación forzada. La diferencia de peso, después de la desecación, referida a %, expresa la humedad de la muestra (ec. 2).

$$HMV = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

Siendo:

HMV: Humedad y materia volátil de la muestra (%)

Pi: Peso inicial de la muestra (g)

Pf: Peso final de la muestra después la desecación (g)

2.1.3. Determinación del contenido graso

La muestra de pasta molida y desecada, se introduce en un tubo de forma que no supere los 3 cm de altura. La medida del contenido graso, se realiza por Resonancia Magnética Nuclear (R.M.N), en un equipo Bruker (modelo minispec mq10).

La técnica está basada en la medida de energía emitida por muestras previamente sometidas a un impulso magnético. La masa de aceituna desecada y molida, se introduce en un vaso de vidrio para muestras de 100 cm^3 de volumen, realizándose dos lecturas de cada muestra en el equipo R.M.N. La respuesta obtenida de una determinada muestra, se compara con que se la obtiene de unos patrones que se preparan sobre un soporte sólido inerte (papel) con una cantidad conocida de aceite.

El analizador determina el contenido en aceite en húmedo (GMH) de la muestra, utilizando la recta de calibrado realizada previamente con tres patrones de peso de aceite conocido. El aparato interpreta la respuesta e indica la cantidad de aceite de la muestra y el porcentaje que representa del total. El contenido graso en base seca (GMS) se determina mediante la expresión (3).

$$GMS = \frac{GMH}{100-HMV} \times 100 \quad (3)$$

Siendo:

GMS: Contenido graso en base seca (%)

HMV: Humedad y materia volátil de la muestra (%)

GMH: Contenido graso en base húmeda (%)

2.1.4. Rendimiento industrial

El rendimiento del proceso, se determina mediante el sistema de extracción “Abencor” (Abengoa, Sevilla) (Martinez *et al.*, 1975). Se pesan 800 g de pasta de aceituna que se bate durante 30 minutos a la temperatura de 28°C. La pasta una vez batida, se centrifuga para la separación de las fases sólida y líquidas. Las fases líquidas se recogen en una probeta. El mosto oleoso, se deja decantar durante 10 min. Una vez decantado y claramente separado el aceite del alpechín, se lee el volumen del aceite y se calcula el rendimiento industrial (RI) mediante (4).

$$RI (\%) = \frac{V \times d}{M} \times 100 \quad (4)$$

Siendo:

RI: Rendimiento Industrial del proceso de extracción

V: Volumen de aceite extraído (mL)

d: densidad del aceite= 0,915 g.cm⁻³

M: peso de la pasta de aceituna (g)

2.1.5. Firmeza

Para determinar la firmeza de las aceitunas, se realizaron ensayos de punción con un penetrómetro de reloj, marca Bertuzzi FT 327, con puntas de 4 mm de diámetro. Las medidas se efectuaron en tres zonas diferentes del ecuador de cada fruto, pues se debe tener en cuenta que la firmeza no es constante en todo el fruto. Los resultados se expresaron en kg.cm^{-2} .

2.2. Determinaciones analíticas en el orujo

Se han determinado la humedad (%) y el contenido graso del orujo. La humedad se ha determinado siguiendo la misma metodología descrita para el fruto. El contenido en aceite sobre materia húmeda, se ha determinado mediante un analizador de contenido graso por R.M.N (Resonancia Magnética Nuclear), Bruker, modelo minispec mq10.

El contenido graso del orujo en base seca (GMS), se obtiene mediante (5).

$$GMS (\%) = \frac{GMH}{100-HMV} \times 100 \quad (5)$$

Siendo:

GMH: Contenido graso en base húmeda del orujo (%)

HMV: Humedad y materia volátil del orujo (%)

2.3. Determinaciones del contenido en pectinas

2.3.1. Preparación de los sólidos insolubles al alcohol

Los sólidos insolubles al alcohol (SIA) fueron preparados según el método propuesto por Levi *et al.* (1988). Así, cinco gramos de pasta de aceituna se mezclaron cuatro veces con 6 mL de etanol (70%) y la mezcla fue homogeneizada durante 2 min 30 s, usando un politrón a velocidad máxima. Posteriormente, la muestra fue sometida a dos extracciones con 6 mL de acetona, centrifugando a 4600 rpm durante 6 minutos. El residuo resultante, se dejó secar a temperatura ambiente hasta obtener un peso

constante de la muestra (Figura 1). A partir del peso del residuo seco, se evaluó el porcentaje de SIA presente en la muestra.

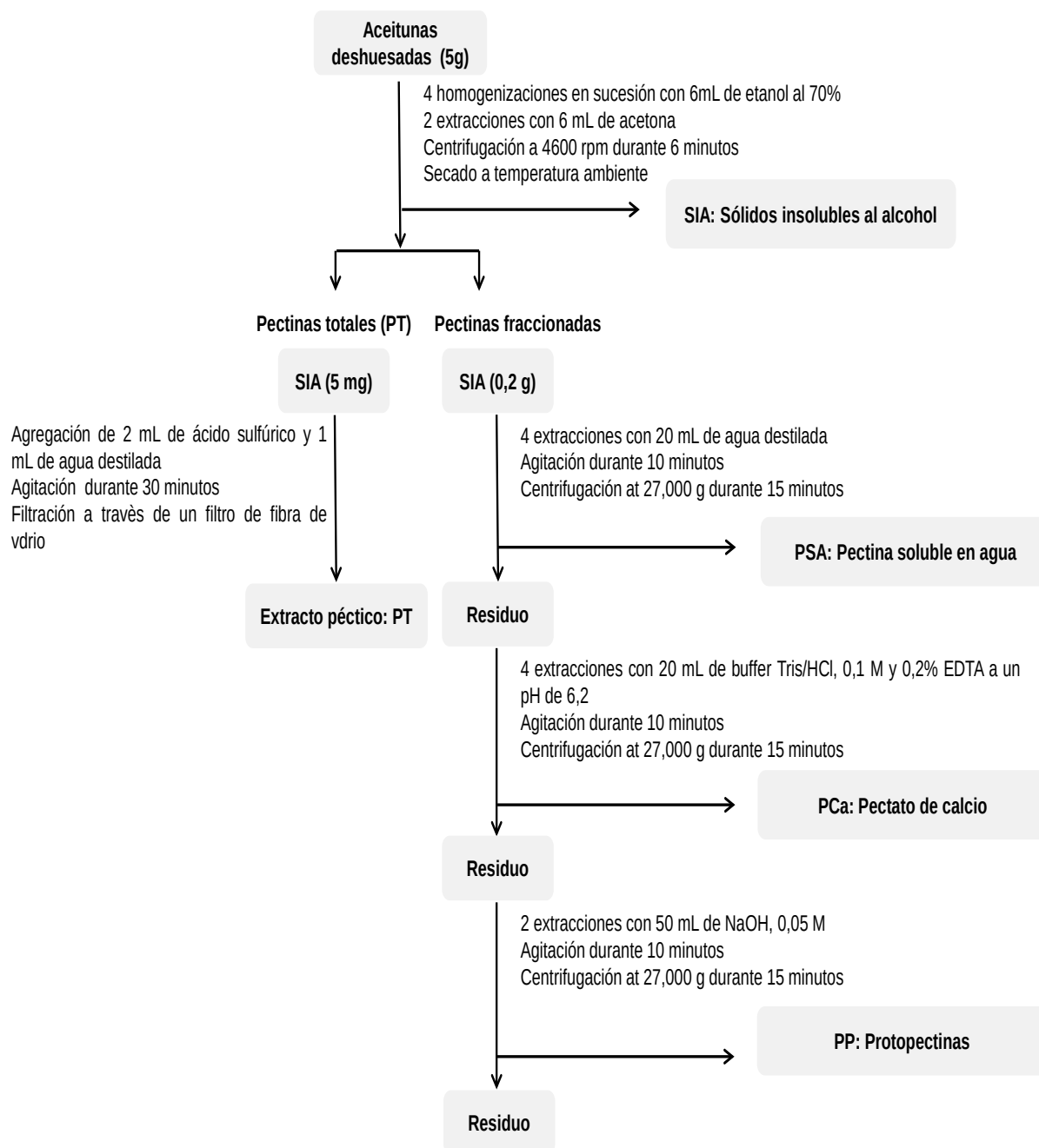


Figura 1. Proceso de extracción de pectina

2.3.2. Extracciones de las fracciones pécticas

200 mg de SIA fueron secuencialmente extraídos del siguiente modo:

- **Pectinas solubles en agua (PSA):** Se efectuaron cuatro extracciones con 20 mL de agua destilada. Una vez homogeneizadas a temperatura ambiente utilizando un vórtice-mezclador a velocidad máxima durante 10 min, las muestras fueron centrifugadas a 27000 rpm durante 15 min a 23°C. Los extractos se decantan y se filtran a través de un papel de filtro Whatman N°1, siendo enrasados a 100 mL con agua destilada para su posterior análisis.
- **Pectinas solubles en pectato de calcio (PCa):** Se efectuaron cuatro extracciones con 20 mL de solución tampón 0.1 M Tris/HCl y 0.2% EDTA, pH 6.2. Una vez homogeneizadas a temperatura ambiente utilizando un vórtex a velocidad máxima durante 10 min, las muestras fueron centrifugadas a 27000 rpm durante 15 min a 23°C. Los extractos se decantan, y se filtran a través de un papel de filtro Whatman N°1, enrasando a 100 mL con agua destilada para su posterior análisis.
- **Pectinas insolubles o protopectinas (PP):** Se efectuaron dos extracciones con 50 mL de NaOH 0.05 M. Una vez homogeneizadas a temperatura ambiente, utilizando un vórtex a velocidad máxima durante 10 min, las muestras fueron centrifugadas a 27000 rpm durante 15 min a 23°C. Los extractos se decantan, y se filtran a través de un papel de filtro Whatman N°1, y se enrasan a 100 mL con agua destilada para su posterior análisis.
- **Pectinas totales (PT):** La fracción total de pectinas se extrajo a partir de los SIA siguiendo el método propuesto por Ahmed y Labavitch (1977). Se tomaron 5 mg de los SIA a los que se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de agua destilada. Se agitó la mezcla durante 30 minutos hasta disolución total de los SIA y se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio, para asegurarse de que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras, como se detalla en la Figura 1. El filtrado resultante de la hidrólisis, fue recolectado y diluido con agua destilada hasta 25 mL.

Todas las extracciones anteriores fueron conservadas a 5°C durante 24 h, previo a la cuantificación analítica del ácido galacturónico (AG).

2.3.3. Cuantificación del contenido en ácido galacturónico

El contenido de AG en las diferentes fracciones pécticas, fue determinado mediante el método espectrofotométrico de determinación cuantitativa de ácidos urónicos propuesto por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973) y modificado por Kinter y Van Buren (1982), por incubación de los extractos pécticos con ácido sulfúrico y el consiguiente desarrollo del color mediante el metahidroxidifenilo (MHDP) en medio alcalino, que tiene un máximo de absorbancia a la longitud de onda de 520 nm.

Para ello, se mezclaron en un tubo de ensayo 400 µL del extracto obtenido (PSA, PCa, PP o PT según corresponda) con 2400 µL de una disolución de ácido sulfúrico concentrado/tetraborato de sodio (0.0125 M) en un baño de agua con hielo. La mezcla se realizó utilizando un vórtex a velocidad máxima, con paradas intermitentes a fin de asegurar la mezcla completa. Posteriormente, los tubos fueron calentados en un baño a 100°C durante 5 min e inmediatamente enfriados en un baño con hielo durante 10 min. Seguidamente se adicionó 40 µL de una disolución de MHDP al 0.15% (preparada en NaOH 0.5%) y se mezcló usando un vórtex durante 1min 30 s. Finalmente, las muestras se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 20 min, para estabilizar el color formado antes de realizar la lectura de la absorbancia.

La presencia de carbohidratos no urónicos que contiene la muestra (celulosa, almidón, glucosa, fructosa y sacarosa), pueden producir cierta coloración cuando son calentados con la disolución de ácido sulfúrico/tetraborato de sodio. Esta coloración adicional, afectaría a la lectura de la absorbancia de las muestras. Para descartar esta interferencia, de forma paralela, se preparó otro tubo de ensayo siguiendo el mismo procedimiento descrito, pero añadiendo 40 µl de NaOH 0.5% en vez de la disolución de MHDP. Este segundo tubo corresponde al blanco de cada muestra. La absorbancia del blanco de la muestra fue restada a la absorbancia total, a fin de cuantificar únicamente la absorbancia debida a la reacción entre los ácidos urónicos y el MHDP. Cada medida, se realizó por duplicado, y se prepararon disoluciones con

concentraciones conocidas de ácido galacturónico (Sigma Aldrich) para construir la recta de calibrado (Figura 2).

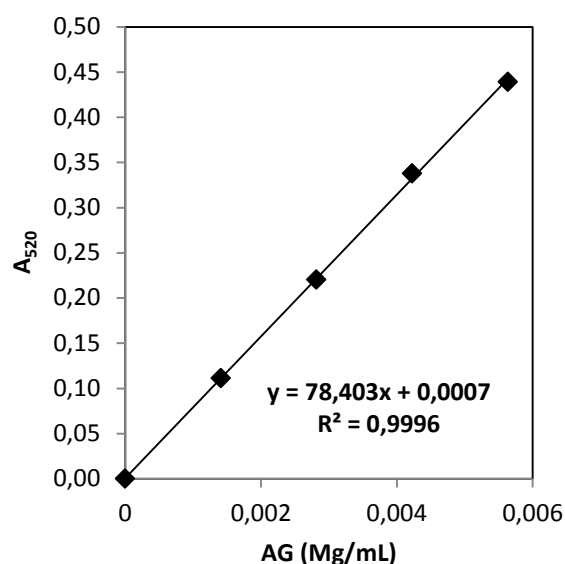


Figura 2. Recta de calibración del ácido galacturónico

Este método, tiene la ventaja de la sensibilidad y especificidad de los ácidos urónicos en relación con los azúcares solubles, y de la estabilidad del color formado con el tiempo (Carbonell *et al.*, 1990). Los resultados fueron expresados como gramos de ácido galacturónico contenidos en 100 gramos de sólidos insolubles al alcohol (g AG/100 g SIA). Las medidas espectrofotométricas se realizaron a 520 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

2.4. Determinaciones del contenido en metanol

5 mg de SIA se dispersaron en 2 mL de agua destilada, se homogeneizaron durante 1 min utilizando un vórtex y se sonicaron durante 10 min en un sonicador con baño de agua. Las muestras se saponificaron, agregando 0.8 mL de una disolución de hidróxido de sodio (NaOH, 2mol/L), se incubaron una hora a 20°C bajo agitación, luego se neutralizaron con una disolución de ácido clorhídrico (HCl, 2 mol/L) y por último, se colocaron en un baño de agua a 25°C, manteniéndose en reposo durante 15 minutos.

La disolución resultante, se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio. El metanol liberado, se determinó mediante el método propuesto por Klavons y Bennett (1986). La reacción se llevó a cabo mezclando 1 mL del filtrado obtenido, con 1 mL de alcohol oxidasa (previamente diluida en agua destilada). La mezcla se incubó durante 15 minutos a 25°C para permitir la oxidación del metanol a formaldehído. Posteriormente, se agregaron 2 mL de una disolución de acetilacetona conteniendo, 20 mM de 2,4-pentanediona, 2 M de acetato de amonio y 0.05 M ácido acético, que reaccionan con el formaldehído para formar un cromógeno amarillo. Las disoluciones obtenidas, se homogeneizaron en vórtex durante 1min 30s, incubándose a 58°C durante 15 minutos.

Finalmente, las muestras se dejaron reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 412 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

Para cuantificar la concentración de metanol, se elaboró una curva patrón utilizando distintas concentraciones de metanol (Figura 3).

Los resultados se expresaron como micromoles de metanol por gramo de SIA ($\mu\text{mol MeOH/g SIA}$).

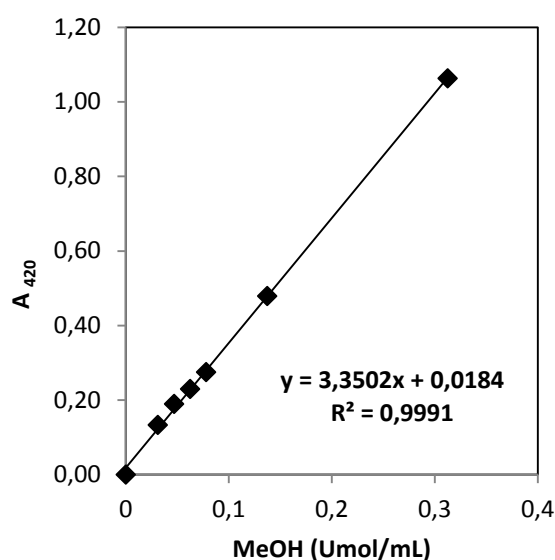


Figura 3. Recta de calibración del metanol

2.5. Determinaciones del grado de esterificación

El grado de esterificación (ec. 6), se determinó dividiendo los moles de los grupos metóxilos y los moles de ácido galacturónico anhidro tal como describió anteriormente (Fertonani *et al.*, 2006).

$$DE = \left[\frac{\frac{N_{MeOH}}{SIA}}{\frac{N_{AG}}{SIA}} \right] \times 100 \quad (6)$$

Siendo:

N_{MeOH} : número de moles de metanol

N_{AG} : número de moles de ácido galacturónico anhidro

SIA: sólidos insolubles al alcohol

2.6. Ensayo enzimático

2.6.1. Extracción enzimática

La metodología que se utilizó para la obtención de los extractos enzimáticos, se adoptó de Olías *et al.* (1993). Para la preparación de los extractos, se utilizaron pulpa de aceituna de las variedades ‘Arbequina’, ‘Picual’ y ‘Hojiblanca’, recolectados a diferentes estados de madurez, desde el fruto verde inmaduro hasta el negro maduro.

Para la extracción de la poligalacturonasa (PG) y la pectinmetilesterasa (PME), se homogeneizaron trozos de aceitunas deshuesadas en un Ultra-Turrax T-25 a 24000 rpm durante 2 min, con un buffer fosfato de sodio (Na_2HPO_4 - $NaHPO_4$, 20 mM, pH 7) conteniendo 60 mM de NaCl, 0.5 M fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF) y 20% de polivinilpirrolidona (PVPP), y con una relación buffer: material vegetal 1:4.

Para la extracción de las pectato-liasas, se utilizó como buffer el fosfato de sodio (20 mM, pH 7) conteniendo 20 mM de cisteína, 0.5 M fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF) y 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) con una relación buffer: material vegetal 1:4.

El homogeneizado, se filtró a través de 2 capas de miracloth y luego se centrifugó a 20000 rpm durante 20 min a 4°C, utilizando una centrífuga refrigerada Benchtop de alta velocidad, modelo SIGMA 3-30KS. La fase acuosa intermedia es el extracto enzimático.

La concentración de proteína presente en el extracto enzimático, se determinó utilizando el método propuesto por Bradford (1976) utilizando como estándar albúmina de suero bovino (ASB).

2.6.2. Determinación de la actividad enzimática

Seguidamente, se considera el procedimiento seguido para determinar la actividad enzimática.

2.6.2.1. Pectinmetilesterasa (PME)

Dado que la enzima pectinmetilesterasa, cataliza la reacción de demetoxilación de la pectina dando como resultado cadenas de pectina de bajo metoxilo y metanol, en este trabajo se ha empleado la cantidad de metanol liberado durante el proceso de maduración de la aceituna como un indicador de la actividad de la PME.

Para determinar la cantidad de metanol formado en el fruto, se usó el método colorimétrico elaborado por Klavons y Bennet (1986). La reacción se llevó a cabo mezclando 100 µL de extracto enzimático con 150 µL de una solución tampón fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 0.1 M, pH 6.5) y pectina cítrica al 0.1%. La disolución formada, se incubó a 25°C durante 15 min, deteniendo la reacción por calentamiento en un baño de agua a 100°C durante 10 min, para posteriormente dejar enfriar a 25°C.

A continuación, la mezcla de reacción se diluyó a 2 mL agregando 20 mM Tris/HCl, pH 7.5. Seguidamente, el metanol se oxidó a formaldehído mediante el agregado de 1 unidad de alcohol oxidasa (previamente diluida en agua destilada) e incubación (25°C, 15 min). Finalmente, se agregó 1mL de una disolución conteniendo 20 mM 2,4-pentánodiona y 2 M de fosfato de amonio, que reaccionan con el formaldehído para formar un cromógeno amarillo que absorbe a 412 nm. La absorbancia de las muestras

se leyó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

Para cuantificar la concentración de metanol se elaboró una curva patrón utilizando distintas concentraciones de metanol (Figura 4).

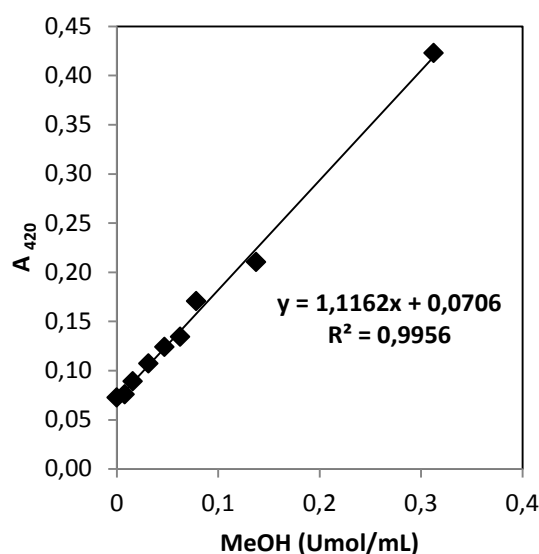


Figura 4. Recta de calibración del metanol

La actividad específica es la cantidad de PME que forma 1 μmol MeOH/mg proteína·min.

2.6.2.2 Poligalacturonasa (PG)

La actividad de la poligalacturonasa (PG), se determinó cuantitativamente midiendo la cantidad de grupos reductores producidos durante la reacción de esta enzima en ácido poligalacturónico (APG). La cantidad de los grupos reductores, se determinó colorimétricamente por el método propuesto por Gross (1982) utilizando 2-cianoacetamida (Honda *et al.*, 1982). De cada uno de los extractos, se tomaron 50 μL de enzima, se incubaron a 35 °C durante 10 min con 150 μL de ácido poligalacturónico al 0.3% preparado en buffer acetato 40 mM pH 4.4. La reacción se detuvo al tratar con

2 mL de buffer borato 0.1M pH 9.0 frío, y 400 μ L de 2-cianacetamida al 1% en agua. Las mezclas se agitaron en vórtex durante 5 segundos y se incubaron en baño maría a 100 °C durante 10 min, se colocaron en baño de hielo durante 10 minutos y se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 40 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a 276 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

Para cuantificar la concentración de los grupos reductores, se elaboró una curva patrón utilizando distintas concentraciones de ácido monogalacturónico disuelto en un buffer acetato de sodio (40 mM, pH 4,4) suponiendo que la concentración de ácido monogalacturónico (mM) es proporcional a la cantidad de los grupos reductores (mM) (Figura 5).

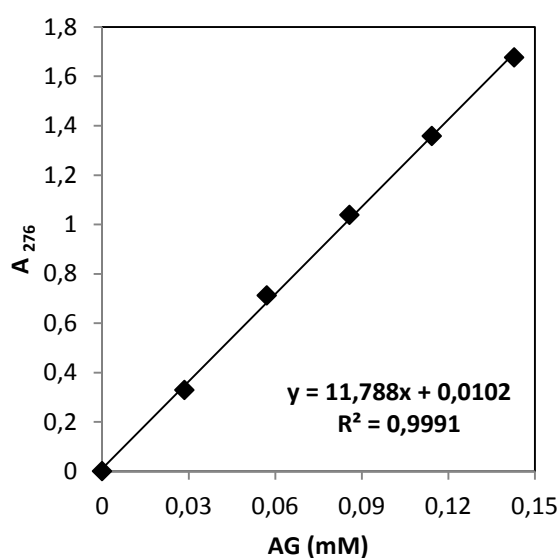


Figura 5. Recta de calibración del ácido galacturónico

La actividad específica de la PG es la cantidad de ácido galacturónico liberado formando 1 μ mol de grupos reductores/mg proteína·min a 30°C.

2.6.2.3. Pectato-liasa (PcL) y pectin-liasa (PL)

Las actividades de pectato-liasa (PcL) y pectin-liasa (PL), se determinaron mediante la cuantificación de los productos C4 y C5 insaturados espectrofotométricamente a 235 nm (Hasegawa y Nagel 1966; Collmer *et al.*, 1988). La reacción se llevó a cabo incubando 100 del extracto enzimático con 1 mL de ácido poligalacturónico al 0.4% a los que se agregaron 500 μ L de buffer Tris/HCl (200 mM, pH 8) y 0.4 mL de dicloruro de calcio (CaCl_2 , 25 mM) durante 10 min a 40°C. Posteriormente, la reacción se detuvo agregando 2 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl, 50 mL). La absorbancia se leyó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

Para cuantificar los urónidos 4,5-insaturados liberados durante esta reacción, se ha propuesto que el coeficiente de extinción molar para PcL es de 4600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y 5500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para PL (Hasegawa y Nagel 1966).

Una unidad de la actividad específica de PLs se define como la cantidad de enzima que libera 1 nmol de productos insaturados por minuto y mililitro de sobrenadante bajo la condición anterior.

2.7. Determinaciones del contenido en proteínas

2.7.1. Proteínas del fruto

Para determinar el contenido de proteínas en los frutos, se tomaron 3 gramos de la pulpa de aceituna y se homogenizaron con 10 mL de agua destilada durante 1 minuto utilizando un ultra-turrax T25 a 2400 rpm. Las muestras fueron luego centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min utilizando una centrífuga refrigerada benchtop de alta velocidad modelo SIGMA 3-30KS. El contenido total de proteínas, se determinó de acuerdo a una modificación del método descrito por Bradford (1976) el cual implicó la adición del colorante ácido azul brillante de Coomassie G-250. Se tomaron 900 μ L del sobrenadante obtenido tras la centrifugación, a los que se agregaron 3.5 mL de agua destilada y 600 μ L del reactivo de Bradford. Después de una agitación de 5 segundos

a temperatura ambiente, las muestras se dejaron en reposo durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'. Para cuantificar la concentración de proteínas, se elaboró una curva patrón utilizando distintas concentraciones de albumina de suero bovino (ASB) (Figura 6). Los resultados fueron expresados en miligramos de proteínas por gramos de peso fresco.

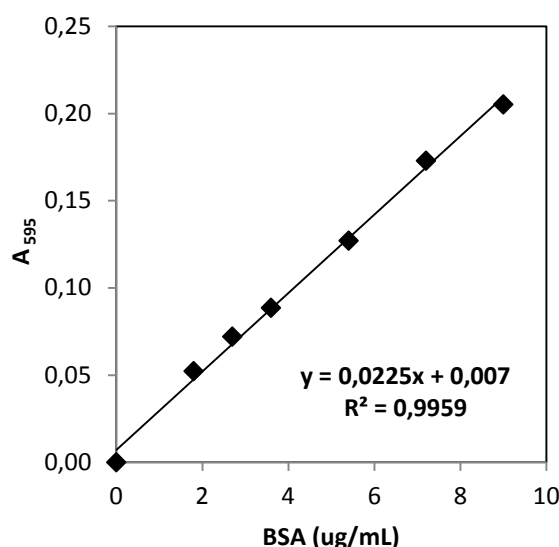


Figura 6. Recta de calibración de la albúmina de suero bovino (ASB)

2.7.2. Proteínas en los sólidos insolubles al alcohol

Para determinar el contenido de las proteínas en los sólidos insolubles al alcohol (SIA), se pesaron, en unos tubos Eppendorf, 10 mg de los SIA a los que se agregó 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH, 1N). Posteriormente, las muestras se agitaron durante 1min 30s utilizando un vórtex, y se colocaron en un baño de agua caliente a 100°C durante 10 min luego se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugaron durante 5 min a 13000 rpm, utilizando una centrífuga refrigerada benchtop de alta velocidad modelo SIGMA 3-30KS.

El contenido total de proteínas, se determinó de acuerdo a una modificación del método descrito por Bradford (1976). Se tomaron 10 µL del sobrenadante obtenido

tras la centrifugación, a los que se agregaron 70 μL de agua destilada y 20 μL de reactivo de Bradford. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS de Helwett Packard, modelo 8452A, con 'diode array'.

Para cuantificar la concentración de proteínas en los SIA, se utilizó la curva patrón que se muestra en la Figura 6, y los resultados fueron expresados como miligramos de proteínas por gramos de SIA.

2.8. β -eliminación

La β -eliminación es una reacción mediante la que se forma un doble enlace en el residuo de ácido galacturónico, cuando los enlaces glicosídicos de las cadenas pécticas se rompen. Para cuantificar el grado de β -eliminación, se mezclaron 2 mL de los extractos pécticos con un buffer fosfato de sodio (NaPi, 0.1 M, pH 0.8). Las disoluciones obtenidas, fueron agitadas mediante vortex durante 1min 30s, se colocaron en un baño de agua caliente a 80°C, y se incubaron durante 8 horas para permitir la hidrólisis de las muestras. La reacción se detuvo colocando las muestras en un baño de hielo durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 235 nm.

La concentración de los urónidos 4,5-insaturados se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 5412 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Krall y Macfeeters, 1998).

Los resultados se expresan como μmol residuos insaturados/ μmol ácidos urónicos.

2.9. Caracterización de las pastas de pulpa de aceituna

2.9.1. Preparación de las muestras

Se hicieron dos coloraciones sobre las muestras: la primera con un sensor de peroxidación lipídicas: BODIPY 665/676 (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA), la segunda con una disolución alcalina de rojo congo (Sigma Aldrich), para visualizar los lípidos y las paredes celulares, respectivamente.

Las muestras diluidas 20 veces con agua destilada fueron incubadas con 40 μL de

rojo congo (10 g/L) y 2 μ L de Bodipy (2.5 mg/mL en dimetilformamida (DMF)). Tras un reposo de 3 horas a 20°C, las muestras coloradas se colocaron sobre el portaobjetos, se cubrieron con el cubreobjetos y se sellaron con una capa autoadhesiva de 0.25 mm de espesor.

2.9.2. Observaciones microscópicas

Se empleó un microscopio láser confocal de barrido (CLSM) TCS SP2 (LEICA) equipado con una fuente UV-vis y un plano focal motorizado con un objetivo ($\times 40$), para visualizar la evolución de las partículas de pulpa de aceitunas durante tres fases de maduración del fruto: fruto verde, envero y fruto maduro.

El microscopio dispone de tres láseres: dos de helio-neón que emiten fluorescencia a longitudes de onda de 633 y 543 nm, respectivamente, y un láser de argón que emite fluorescencia a una longitud de onda de 488 nm.

En las imágenes, la pared celular apareció en verde, la materia grasa en rojo y la superposición de los dos materiales en amarillo.

2.10. Ensayos reológicos

Las medidas reológicas se llevaron a cabo dentro del intervalo viscoelástico lineal, utilizando un reómetro de deformación controlada (MCR301, Anton Paar, Austria). Todas las muestras se analizaron a temperatura constante de 20°C.

Las pruebas oscilatorias de las muestras de pulpa de aceituna, se realizaron usando una geometría de seis paletas, con radio interior de 11 mm y altura de 16 mm (Fig. 7).

Las muestras se colocaron en una copa estacionaria exterior, de un radio externo de 13.92 mm y un hueco de 2,92 mm.

Para determinar el dominio viscoelástico lineal, las pruebas de barridos oscilatorios de esfuerzos se llevaron a cabo a una frecuencia angular de 2 Hz.

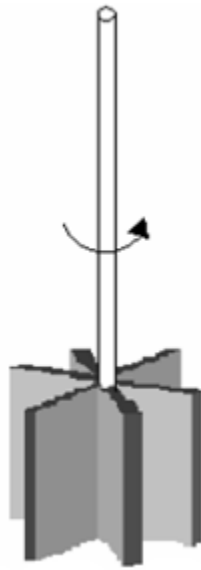


Figura 7. Geometría de seis paletas

La Figura 8, muestra un ejemplo de curva de flujo, ilustrando los cambios de deformación en función del esfuerzo cortante en escala logarítmica.

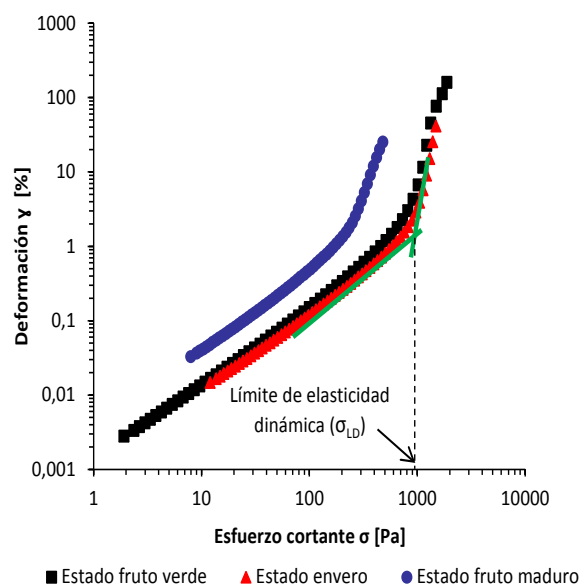


Figura 8. Diagrama de flujo (escalas logarítmicas) de pasta de pulpa de aceitunas de la variedad 'Arbequina' cosechadas en diferentes estados de madurez

Como se aprecia en la Figura 8, a medida que aumenta el esfuerzo cortante, se incrementa la deformación unitaria del material que se está ensayando, hasta la observación de un importante aumento de la deformación marcando el inicio del flujo.

El límite de elasticidad dinámico (σ_{LD}), se estimó a partir de la intersección de las tangentes de dos segmentos distintos de la curva esfuerzo cortante-deformación.

Las mediciones de los barridos de frecuencia, se realizaron dentro de la región viscoelástica lineal en el intervalo 0,5 a 100 Hz. Las amplitudes de los módulos G' (módulo de almacenamiento) y G'' (módulo de pérdida) se tomaron a 2 Hz.

El factor de amortiguación ($\tan \delta$), que mide la contribución del módulo viscoso respecto al módulo elástico de un material a una frecuencia dada (Ahmed y Ramaswamy, 2007), se determinó en la misma frecuencia a la que se determinaron G' y G'' .

Para proporcionar una buena repetitividad, se hicieron tres repeticiones de cada tratamiento, y sólo los valores medios fueron utilizados para construir las curvas.

2.11. Determinación de la actividad emulsionante

La actividad emulsificante (AE), se determinó siguiendo el método de Dalev y Simeonova (1995) adaptado: en tubos graduados, las emulsiones se prepararon añadiendo 1 mL de aceite de oliva virgen a 2.5 mL de disolución acuosa de ácido poligalacturónico (APG) (0.5% w/v) como fuente de pectina.

Una vez homogeneizadas a temperatura ambiente, mediante un vórtex, a velocidad máxima durante 3 min, las muestras fueron centrifugadas a 527 G durante 5 minutos, a 23°C. La actividad emulsificante fue calculada a través de la ecuación (7):

$$AE = \frac{CE_v}{T_v} \times 100 \quad (7)$$

Siendo:

T_v : Volumen total de la disolución

CE_v : Volumen de la capa emulsionada

2.12. Análisis estadístico

Se ha realizado el análisis de la varianza para la mayoría de los ensayos. Cuando las diferencias fueron significativas, la separación de medias se realizó mediante el Test de Tukey para un nivel de significación ($p \leq 0,05$).

Letras minúsculas en las Tablas de resultados, indican diferencias significativas entre tratamientos. Además se ha calculado el porcentaje de varianza con cada factor que contribuye a la variación total observada para cada uno de los parámetros estudiados.

Para la realización de los análisis estadísticos se ha empleado el programa Statistix, versión 9.0 Analytical Software U.S.A.

3. Referencias Bibliográficas

Ahmed A.E.R., Labavitch J.M. 1977. A simplified method for accurate determination of cell wall bromide content. Journal of Food Biochemistry 1, 361-365.

Ahmed J., Ramaswamy H.S. 2007. Dynamic rheology and thermal transitions in meat-based strained baby foods. Journal of Food Engineering 78, 1274–1284.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. 1973. New methods for quantitative determination of uronic acids. Analytical Biochemistry 54, 484-489.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.

Carbonell E., Costell E., Durán L. 1990. Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. Agroquímica y Tecnología Alimentaria 30, 1-9.

Collmer A., Ried J.L. Mount, M.S. 1988. Assay methods for pectic enzymes. Methods

in *Enzymology* 161, 329-335.

Dalev P.G., Simeonova L.S. 1995. Emulsifying properties of protein-pectin complexes and their use in oil contain foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68, 203-206.

Fertonani H.C.R., Scabio A., Canterischemin M.H., Carneiro E.B.B., Nogueira A., Wosiacki G. 2006. Influence of acid concentration on extraction and quality of apple pomace pectin. *Semina Ciências Agrárias* 27, 599-612.

Gross K.C. A. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortscience* 17, 933-934.

Hasegawa S, Nagel CW. 1966. A pectic aci transeliminase produced exocellularly by a *Bacillus*. *Journal of Food Science* 31, 838-842.

Honda Y., Nishimura M., Takahashi H., Chiba K., Kakehi A. 1982. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry* 119, 194–199.

Kinter P.K., Van Buren J.P. 1982. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxyphenyl method. *Journal of Food Science* 47, 756-760.

Klavons J.A., Bennett R.D. 1986. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 34, 597- 599.

Krall S.M., Macfeeters R.F. 1988. Pectin hydrolysis. Effect of temperature, degree of methylation, pH and calcium on hydrolysis rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1311-1315.

Levi A., Ben-Shalom N., Plat D., Raid D.S. 1988. Effect of blanching on pectin constituents and related characteristics of dehydrated peaches. *Journal of Food Science* 53, 1187–1203.

Olías J.M., Pérez A.G., Ríos J.J., Sanz L.C. 1993. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 2368-2373.

Uceda M., Frías L. 1975. Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional*. Córdoba.

Waldron K.W., Selvendran R.R. 1990. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum* 80, 568–575.

RESULTADOS

SECCIÓN I

EFFECTO DEL USO DE TALCO SOBRE LA RUPTURA DE LAS EMULSIONES ACEITE-AGUA, EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN, Y LA SOLUBILIZACIÓN DE LAS SUSTANCIAS PÉCTICAS Y PROTEINAS, DURANTE EL BATIDO DE LA PASTA DE ACEITUNA

CAPÍTULO 1

Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion

Authors: Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain.

²Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales. Universidad de Jaén, Spain.

European Journal of Lipid Science and Technology

Accepted: May 15, 2015

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2016, 118, 545–552

Research Article

Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹

¹ IFAPA Centro “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain

² Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

ABSTRACT

Micronized natural talc (MNT) has demonstrated to be very useful to break down emulsions formed during virgin olive oil extraction process improving the oil yield.

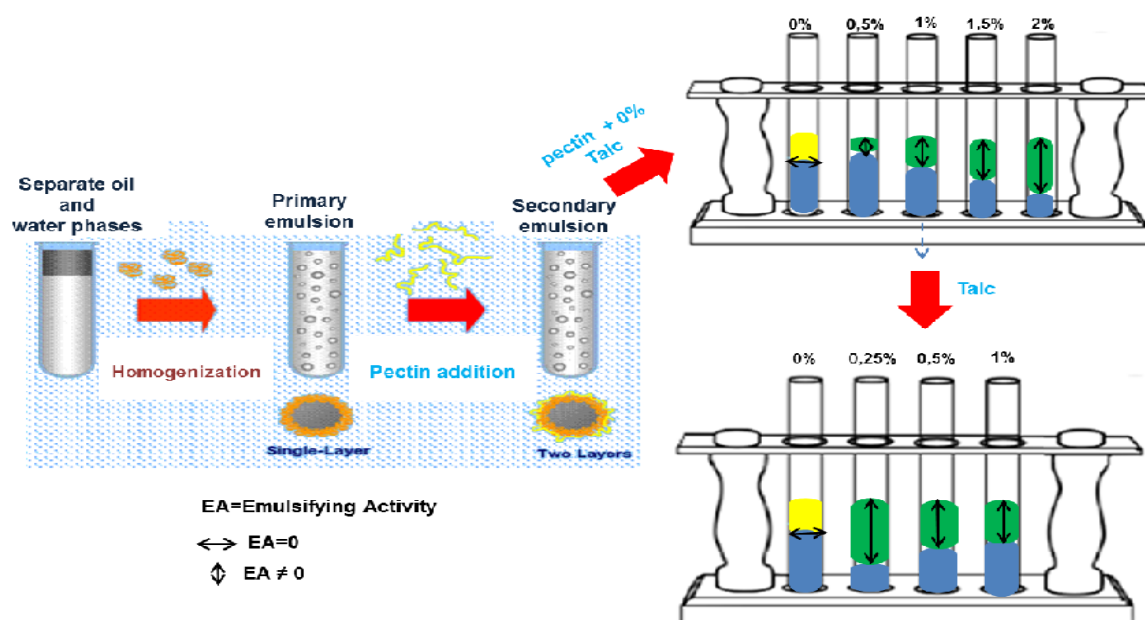
This study was aimed to obtain more insights into the mechanisms of MNT to break down oil-in-water emulsions. For this purpose, laboratory scale experiments were performed in order to evaluate the effect of different pectin concentrations (0.5%, 1%, 1.5% and 2%), used as emulsifier agent, on the behavior of oil-in-water interface. Afterward, to evaluate the effect of MNT dosage as well as its physicochemical characteristics on breaking or reducing emulsions, four MNTs differing in their particle size (D50) and carbonate rate were assayed at doses ranging from 0% to 1%.

Increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity (EA). The emulsifier effect of pectins was weakened by the addition of increasing MNT dose. MNT physicochemical characteristics markedly affected the breaking of oil-in-water emulsions. Nonetheless, its effect depends on the dose of MNT applied to the emulsion. The highest decrease in EA was observed for that MNT with the lowest D50 (2.4 μm) and the highest carbonate rate (4%) at 0.5 %. In general, MNT containing lower D50 and high rate of carbonate showed better capacity in breaking oil-in-water emulsion.

Practical applications: So far as can be ascertained, no quantitative study has been made, in vitro, on the relative merits of the MNT addition as technological aid in breaking down the oil-in-water emulsions. This study provides deeper insights into the clarification of the effect of the pectins as emulsifier agent, on aqueous emulsions of 'Hojiblanca' Virgin olive oil and how the addition of different doses of MNT, with different physicochemical characteristics, carried out the breaking of the oil-in-water emulsions.

Keywords: Micronized Natural Talc / Pectins/ Emulsifying Activity / Carbonate rate / Particle size / Oil-in-water emulsion / Virgin olive oil.

Abbreviations: ANOVA - analysis of variance, D50 - particle size, EA - emulsifying activity, EL_v - emulsified layer; HSD - honest significant difference, MNT – micronized natural talc, PGA - polygalacturonic acid, PSD - particle size distribution, SD - standard deviation, w/v – weight/volume, W_v - whole volume of the solution. **Graphical Abstract:**



Effect of micronized natural talc physicochemical characteristics and dosage on the break-down of oil-in-water emulsion

1. INTRODUCTION

Virgin olive oil production, unlike that of other vegetable oils, is a mechanical process that consists of crushing, malaxation and oil separation [1, 2, 3]. Several studies showed that the most fundamental phase of the extraction process is the olive paste malaxation since it let to increase the oil yield. During this mechanical step, oil remains inside the unaltered cells or is left in the colloidal system of the olive paste (microgels) and some is bound in an emulsion with the vegetable water [4]. The difficulty of releasing this “bound” oil can be explained because the droplets of dispersed or emulsified oil are surrounded by a lipoprotein membrane (phospholipids and proteins) [5]. Furthermore, an important potential factor in determining extractability of olive paste is the high molar mass of polymeric substances derived from cell wall polysaccharides during processing. These substances are natural emulsifier agents present in olives. They promote emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action [6]. This effect is more important when the fruits are harvested at the first stage of ripening and have high moisture content, usually above 55% [7].

Some olive varieties, such as ‘Hojiblanca’, achieve their highest content of pectic substances during veraison stage [8] which represents the usual picking period. Harvesting at this stage may produce emulsions during malaxation due to the presence of cell wall pectic polysaccharides with emulsifying activity. These emulsions lead to the formation of the so-called ‘difficult pastes’ which lessen substantially the oil yield. To break down these emulsions, some technological coadjuvants have been successfully developed. A combination of pectolytic, cellulolytic and hemicellulolytic plant enzymes have been used to break emulsions improving not only the oil yield but also the nutritional quality of the oil [9, 10]. Nevertheless, the use of technological coadjuvants with chemical or biochemical activity is forbidden by European regulations on virgin olive oil production [11].

The use of common salt (NaCl) could represent a feasible mean for the improvement of oil extraction [12; 13]. Its action, which is exclusively physical, is based on the repulsion between the oil and the hydrophilic phases due to the increased ionic charge

as well as its density [13]. Koprivnjak *et al.* (2015) [14] found that a significantly higher extractability of oil from 25 to 29% compared to the control, $p < 0.05$) was obtained by adding 3% of NaCl. Furthermore, in a research study describing the effect of salt addition on the solubility of phenolic compounds in olive mill waste water, Noubigh *et al.* (2006) [15] found that as the concentration of the NaCl increases, more and more water is bound up in hydration shells depending on the salt ability to coordinate water.

Another powerful emulsion breaker authorized by European Union regulations (CE Directive 30/2001) is the calcium carbonate (E170) [4]. This aid does not react with oils because of its crystalline structure and it is easily removed by centrifugation together with olive pomace due to its high density (2.72 g/cm³) and water affinity [4]. A recent research study conducted by Ben Brahim *et al.* (2015) [16].revealed that adding a ratio of 1.6% of calcium carbonate to the olive paste at a malaxing temperature of 31 °C during 20 min has important advantages. Indeed, it increases oil yield by 2% phenol and pigments contents without affecting the oil quality, as well as improves the antioxidant activity.

Currently, micronized natural talc (hydrated magnesium silicate) is the most widely used coadjuvant for oil extraction [17, 18] due to its exclusively physical action [4]. The use of talc as coadjuvant during malaxation has been proved to improve the extractability [7, 13], but it has not a marked effect on the quality parameters of olive oil [10, 19]. The same was observed by Carrapiso *et al.* (2013) [17] for laboratory trials used on 'Carrasqueña' and 'Picual' cultivars. In general, the amount of talc used ranges from 0.3% to 1% of fresh weight [20] although an over dose can reduce the process yield.

The hydrophobicity of talc has been thoroughly studied; its breakage during milling forms two surfaces [21, 22]. One surface results from the easy breaking of the Van der Waals bonds of a surface from its neighbour [23] which forms a basal face that is hydrophobic. The other surface is generated from the ionic/covalent bonds within the layers and form edges that are hydrophilic in nature [21, 22, 24].

From the chemical point of view, the hydrophilic or ionic face would be in an unstable state immediately after the bond breakdown and would seek to react with ions of the opposite charge in order to return to their stable state. Furthermore, micronized natural talc (MNT) physicochemical characteristics vary from deposit to other. Among the most studied MNT characteristics, particles size and carbonate rate may affect substantially the break of oil-in-water emulsions and thus industrial oil yield [25, 26, 5]

The purpose of this study was to determine the effect of the pectin addition, as emulsifier agent, on aqueous emulsions of 'Hojiblanca' Virgin olive oil and how the addition of different doses of MNT with different physicochemical characteristics affects to breakdown of oil-in-water emulsions.

2. MATERIALS AND METHODS

For this work, olive trees (*Olea europaea*, L.) of 'Hojiblanca' cultivar with uniform characteristics were selected. The trees were spaced 7*7 m and grown in the experimental orchard of Center IFAPA "Venta Del Llano"-Mengibar, Jaén (Spain) using standard growing techniques. This work was performed during the crop year 2012/13.

Fruit samples were harvested by hand at the ripening index 4.53, according to the fruit classification based on skin and flesh colour described in the ripening index method [27].

The virgin olive oil was extracted in the pilot oil mill of IFAPA Venta Del Llano equipped with a continuous extraction system (Pieralisi, Spain) working at two phases way. In this experiment, has been determined the effect of the physicochemical properties of the MNT on the emulsifying activity (EA) of an oil-in-water system prepared with different pectin amounts. Four commercial MNTs have been used; their main physical and chemical characteristics are shown in Table 1. In the experiment a factorial design was selected considering three variables: type of MNT (MNT1; MNT2; MNT3 and MNT4), MNT dose added to the emulsion (0, 0.25%, 0.5% and 1%); and the

concentration of pectin added to the emulsion (0, 0.5%, 1%, 1.5% and 2%). The assay was carried out by triplicate.

Table 1 Basic data of the used micronized natural talc (MNT) used in the experiment

Coadjuvant	Carbonate %	Medium particle size D50, μm	Density g/cm^3	Specific surface B.E.T, m^2/g
MNT 1	4	2.4	2.77	7
MNT 2	0.8	7.1	2.78	9
MNT 3	0.5	13	2.77	7
MNT 4	1.1	16.3	2.78	6

Emulsifying activity (EA) was assessed using the Dalev and Simeonova procedure [28]. In graduated tubes, emulsions were prepared by adding 1 mL of virgin olive oil to 2.5 mL of polygalacturonic acid (PGA) aqueous solution (0.5%, w/v), as a source of pectin. The mixture was homogenized at room temperature in a vortex mixer at maximum speed, for 3 min. Samples were centrifuged at 527g, for 5 min, at 23°C then the whole volume of the solution (W_v) and the emulsified layer volume were measured (EL_v). EA was calculated using the Equation (1):

$$EA = \frac{EL_v}{W_v} \times 100 \quad (1)$$

Statistical analysis: In the Tables, results are expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was applied. Tukey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). These determinations were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the emulsions were tested by measuring their Emulsifying activity (EA). Among the factors studied, pectin amount used for oil-in-water emulsion (either with or without use of the MNT) was the main factor affecting the EA since represents around 86 % of variability observed in the ANOVA (Table 2).

Table 2. Partial mean squares from analysis for the effect of pectin concentration and talc physic-chemical characteristics and dosage on the Emulsifying activity (EA)

Factor	DF ^a	MS ^b	SST ^c	P ^d
Total	239			
Talc (A)	3	162.46	1.43***	0.0000
%Talc (B)	3	426.73	3.75***	0.0000
Pectins (C)	4	7336.23	86.01***	0.0000
A×B	9	23.70	0.63*	0.0245
A×C	12	17.89	0.63 ^{ns}	0.0799
B×C	12	37.35	1.31***	0.0001
A×B×C	36	11.28	1.19 ^{ns}	0.4069
Error	160	10.77	5.05	

ns: no significance; *Significance level p, 0.05; ***Significance level p, 0.001; ^a Degree of freedom; ^b Mean squares; ^c Partial mean square for the effect expressed as percentage of the total corrected sum of square

^d Statistical significance.

Both, Talc type and its dose showed a highly significant effect too, although explained a lower variability percent.

3.1. Effect of pectin concentration on emulsifying activity (EA)

Figure 1 shows the changes in EA with increasing pectin concentrations. EA increased with pectin percent, achieving significant differences between the higher pectins concentrations (1.5 and 2 %) and the rest. However pectin content higher than 1.5 % did not produce significant raise. For the control, without pectin addition, EA was not detected although a thin emulsion was formed after mixing. This emulsion may be due to virgin olive oil phospholipidic components that show amphiphilic character [29]. However, these emulsions were unstable and could be separated into two layers after centrifugation. Pinoti *et al.* [30] proposed that pectin molecules adsorbed to the surface of the oil droplets of emulsion could act as polymer bridges holding the droplets together. Once pectins are strongly adsorbed to the oil-in-water interface, they can stabilize emulsions for long periods probably enhancing the electrostatic repulsion among the emulsified droplets [6]. Therefore pectin may be considered the main responsible of the oil emulsified during processing olive ‘difficult pastes’. This short-term stability can be explained by the fact that emulsions formed between oil and water are thermodynamically unstable systems that break down over time.

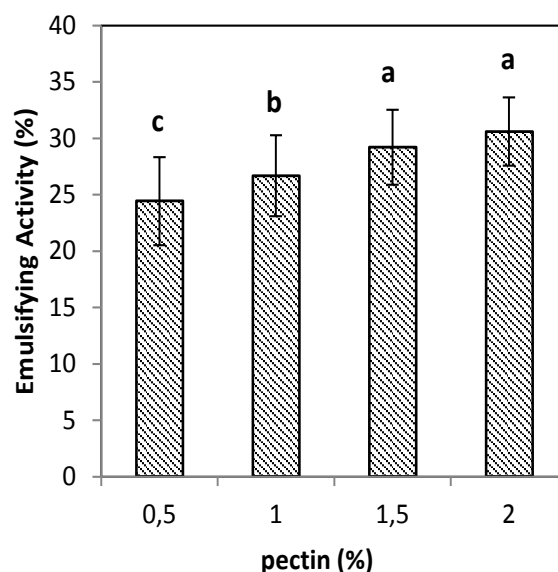


Figure 1 Effect of pectin concentration on the EA considering the four types and doses of MNT

Different letters means significance differences at *p: 0.05, **p: 0.01; ***p: 0.001.

3.2. Effect of MNT dose on the emulsifying activity (EA)

Other significant factor affecting to the EA is the MNT dose added to the emulsion. Because pectin concentration was the main responsible of EA variability and its interaction between MNT dosage and MNT type was significant, a separated ANOVA analysis for each pectin concentration was established (Table 3) in order to clarify the results discussion.

As can be seen, independently of the pectin concentration, the physicochemical characteristics of MNT used as well as its dose affected significantly ($p \leq 0.001$) to the EA. Moreover, the main factor explaining the variability of EA values for all the tested pectin concentrations was the MNT dose.

Table 3 Partial means squares from analysis for the effect of MNT physicochemical characteristics and dosage on the EA for each of the percentages of pectin (0.5%, 1%, 1.5% and 2%).

Pectin dose		Total	MNT (%) (A)	MNT type(B)	A × B	Error
	DF ^a	47	3	3	9	32
0.5%	MS ^b	215.747	171.077***	36.234***	6.925***	1.511
	SST ₀ ^c		70.06	14.84	8.51	6.60
1%	MS ^b	196.036	156.167	32.184	6.095	1.590
	SST ₀ ^c		69.84***	14.39***	8.18***	7.58
1.5%	MS ^b	155.5227	85.8794***	62.7089***	5.5870**	1.3474
	SST ₀ ^c		47.78	34.89	9.33	8.00
2%	MS ^b	128.6811	76.9103***	46.767***	4.4200***	0.8741
	SST ₀ ^c		52.69	31.84	9.08	6.39

^a Degree of freedom; ^b Mean squares; ^c Partial mean square for the effect, expressed as percentage, of the total corrected sum of square; * Significance level p: 0.05; ** Significance level p: 0.01; *** Significance level p: 0.001

Considering the pool of MNT and pectin concentrations, the addition of MNT at doses between 0.25 and 1% reduced the emulsifying effect of the pectins (Fig. 2) although in general, significant differences could be detected only for the highest MNT dose.

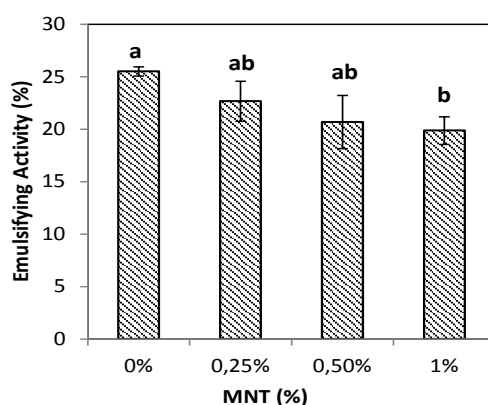


Figure 2 Effect of MNT dosage on the EA considering the four coadjuvant and the five pectins concentrations

Different letters means significance differences at *p: 0.05, **p: 0.01; ***p: 0.001.

In Figure 3 can be observed how the four MNTs, at different doses, affect to EA for each pectin percent.

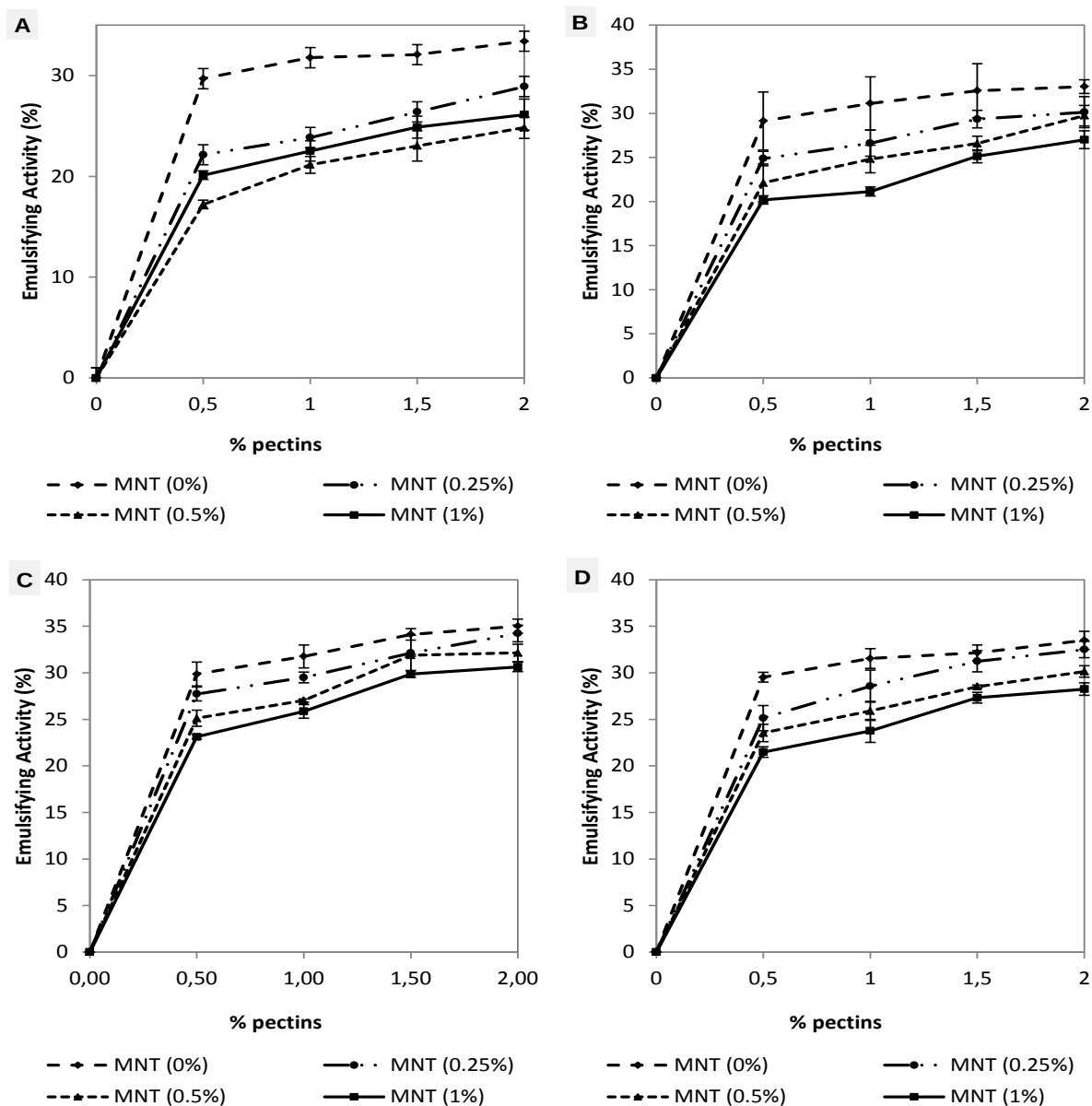


Figure 3. Effect of the physicochemical talc characteristics (used at different doses) and pectin concentration on the emulsifying activity of 'Hojiblanca' virgin olive oil

(A): MNT1: (4% (CaCO₃); 2.4μm); (B): MNT2: (0.8% (CaCO₃); 7.1μm); (C): MNT3: (0.5% (CaCO₃); 13μm); (D): MNT4: (1.1% (CaCO₃); 16.3μm).

MNT1 produced the most important decrease in EA even at low doses; the best reduction was achieved at 0.5%. MNT3 showed lesser EA reduction even for the greatest dose. The effectiveness of the MNTs was lowered as pectin percent was

increased in the emulsion. The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions could be explained by its hydrophobic character which is responsible for the surface activity of pectin substances. In fact, the hydrophobic or ionic face of the talc would be in an unstable state and would seek to react with ions of the opposite charge in order to return to their stable state. As pectins are anionic hydrocolloid emulsifiers [31], they represent a negative charge, acting as a strong anchor point at the oil-in-water interface; therefore producing the attraction of the positive face of talc particle and the formation of pectin-talc complex [32]. Therefore, the addition of MNT to the oil-in-water emulsions may generate electrostatic interactions between the coadjuvant and pectins because they are two oppositely-charged components.

As can be observed in Figure 4, the emulsified layer decreases when MNT was added.

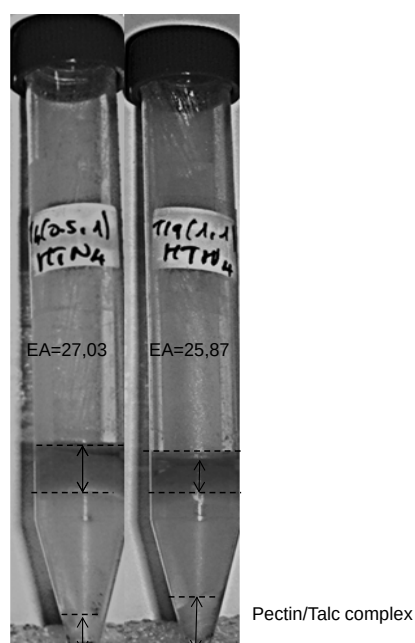


Figure 4. Visual observation of 1% pectin oil-in-water emulsion with addition of MNT at dose of 0.5% (T1) and 1% (T2) MNT

This suggests that there was enough talc present with positive charge to completely compensate the negative charge of the pectin. It can lead to a macroscopic phase separation and formation of pectin/talc complex that sediments after centrifugation.

The pectin molecules adsorbed to the surface of the oil-in-water system are lowered, giving the breaking of the emulsions and the decrease of the EA caused by pectins. It depends on the MNT dose and its physicochemical characteristics. These results are in agreement with previous works [33] that described when the amount of positive charge on the talc and negative charge on the pectin are equal, the full charge compensation could lead to aggregation of the soluble complexes and, finally, to complex coacervation/precipitation. Pectin-MNT complexation may affect to the pectin adsorption rate at oil-in-water interfaces. Various factors may contribute to this: (i) due to complexation, the positive talc particles are partitioning over polysaccharide bound and the free state, implying that less talc is 'available' for direct adsorption; (ii) the bound state diffuses much more slowly than the free state, because of the larger hydrodynamic radius of the pectin 'carrier' and (iii) the attachment of the bound talc to the oil-in-water interface may be hindered by the presence of the surrounding pectins [34].

3.3. Effect of MNT physicochemical characteristics on emulsifying activity (EA)

When the MNTs assayed were compared, considering the pool of MNT and pectin doses, (Fig. 5) significant differences were not found between them. The highest value of EA was obtained using MNT 4, characterized by the highest particle size (D50, 16.3 μm) and a carbonate rate relatively low (1.1%). The lowest EA value was obtained using MNT1 characterized by the highest carbonate rate (4%) and the lowest particle size (2.4 μm). These findings confirm the results found by others authors [25, 26] reporting as MNT physicochemical characteristics play an important role in breaking oil-in water emulsions and then, on oil yield. Therefore the efficiency of talc to break down emulsions is not only affected by the dose applied to the emulsion but also by its mineralogical composition, morphology and particle size distribution (PSD).

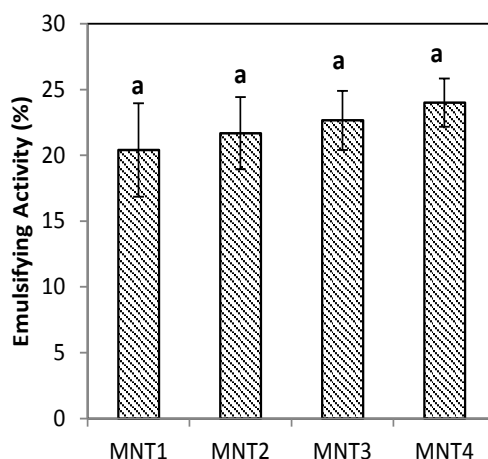


Figure 5. Effect of MNT physicochemical characteristics on the EA considering the four MNT doses and the five pectins concentrations

Different letters means significance differences at *p: 0.05, **p: 0.01; ***p: 0.001.

The excellent effectiveness of MNT1 was due to its fine particle size and its high carbonate content. MNT1 had the lowest D 50 and thus the greatest active surface area which let to adsorb a great amount of pectin and water molecules. Furthermore, this talc (MNT 1) had the highest rate of carbonate enhancing the breaking of oil-in-water emulsion by releasing oil droplets that merge into larger drops.

In order to confirm these results and explore the influence of physical and chemical characteristics of the MNT on the EA, the effect of these two parameters on emulsions has been analyzed.

Increased particle size seems to have a greater negative effect on EA and thus on oil extraction. For each MNT dose, EA showed a rising trend as particle size increased (Fig. 6A). The surface hydrophobicity of MNT increases as particle size was smaller due to an increase in the value of contact angles [35]. Therefore, the high hydrophobicity of MNT1 was predominantly due to the high surface area generated by its smaller particle size.

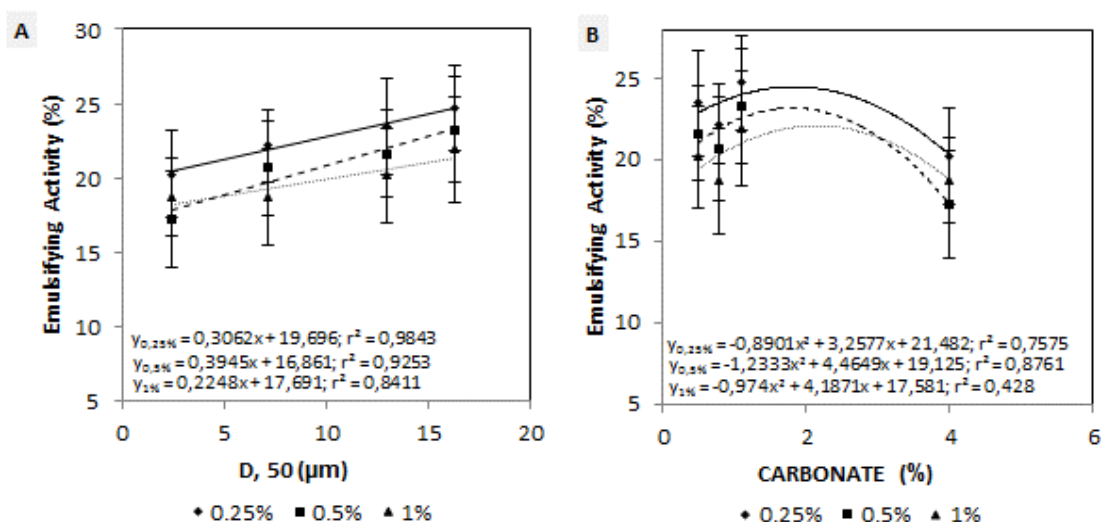


Figure 6. Correlation between EA and MNT physicochemical characteristics applied at different doses

(A): Particle Size: D, 50; (B): Carbonate rate

MNT for oil mill contains significant amounts of by-minerals such as carbonate. Several studies have showed that this component plays a major role in breaking down emulsions during olive paste kneading step [4]. In Figure 6B, is shown as the use of different MNT doses induced an increase in the EA as the MNT carbonate rate increased in the range 0.5 – 1.1%. For higher carbonate content (4%) a marked EA decrease was obtained. Therefore, MNT containing high carbonate content showed a better capacity to break oil-in-water emulsions. Carbonate is a rich-calcium component and therefore can enhance the formation of electrostatic complexes between the anionic pectic and calcium anions [36].

4. CONCLUSIONS

Results showed the effect of pectins on the oil-in-water interface giving an increase of the EA. It can confirm the role of pectins making oil-in-water emulsion during processing olive ‘difficult pastes’. However, this emulsifier effect of pectins can be weakened by the addition of MNT.

The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions could be explained by its hydrophobic character which is responsible for the surface activity of the pectin substances. The addition of MNT to the oil-in-water emulsions generated the apparition of electrostatic interactions between the coadjuvant and pectins due to their opposite charges. After olive paste centrifugation, the formed complex is sedimented, leading to a reduction of the pectin molecules adsorbed in the surface of the oil-in-water system; thus generating the break of the emulsions and the decrease of the EA caused by the pectic polysaccharides.

The effectiveness of MNT to breaking emulsions depended not only on the dose but also on its physicochemical characteristics. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the lowest EA for a dose of 0.5%. Likewise, the effect of MNT physicochemical characteristics depended on the dose applied to the oil-in-water emulsion. Therefore a higher efficiency for other MNTs with lower carbonate rate and larger particle can be achieved by applying higher MNT doses.

5. REFERENCES

- [1] Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oil. *Food Chem.* 2001, 72, 19-28.
- [2] Di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M., Serraiocco, A., Influence of malaxation time of oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y Aceites.* 2002, 53, 179-186.
- [3] Clodoveo, M.L., Dipalmo, T., Schiano, C., La Notte, D., What's now, what's new and what's next in virgin olive oil elaboration system? A perspective on current knowledge and future trends. *J. Agri. Eng.* 2014, 14, 49-59.

- [4] Espínola, F., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *J. Food Eng.* 2009, 92, 112-118.
- [5] Moya, M., Espínola, F., Fernández, D., De Torres, A., Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T., Castro, E., Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *J. Food Eng.* 2010, 97, 57-63.
- [6] Dickinson, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloid.* 2003, 17, 25-39.
- [7] Aguilera, MP., Beltrán, M., Sánchez, S., Uceda, M., Jiménez., Kneading olive paste from 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food. Eng.* 2010, 97, 533-538.
- [8] Mínguez-Mosquera, I, Galardo, L., Roca, M., Pectinesterase and Polygalacturonase in changes of pectic Matter in Olives (cv. Hojiblanca) intended for mill. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 93-99.
- [9] Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., Lucera, L., Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 57–67.
- [10] Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C., Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agric. Food. Chem.* 1996, 44, 3930-3934.
- [11] Regulation EEC 1513/2001 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union Commission. *Off. J. Eur. Commun.* 2001, 201.
- [12] Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A.G., Mariscal, C., García, J.M., Salt improves physical extraction of olive oil. *Eur. Food. Res. Tech.* 2007, 225, 359-365.
- [13] Pérez, A.G., Romero, C., Yousfi, K., García, J.M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjuvant. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 2008, 85, 685-691.

- [14] Koprivnjak, O., Bubola, K. B., & Kosić, U., Sodium chloride compared to talc as processing aid has similar impact on volatile compounds but more favourable on ortho-diphenols in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2015, DOI: 10.1002/ejlt.201500014.
- [15] Noubigh, A., Abderrabba, M., Provost, E., Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics.* 2006, 39, 297-303.
- [16] Ben Bahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., Bouaziz, M., Optimization of malaxing conditions using CaCO_3 as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT- Food. Sci. Technol.* 2015, 1-10.
- [17] Carrapiso, A.I., García, A., Petró, J., Martín L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2013, 115, 583-588.
- [18] Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortíz, A., Morales, J., Frías, L., Fernández, A., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas, 1998, Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía.
- [19] Ben-David, E., Kerem, Z., Zipori, I., Weissbein, S. Basheer, L., Bustan, A., Dag, A., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from irrigated orchards. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2010, 112, 1158-1165.
- [20] Clodoveo, M.L., Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future. An overview. *Trends. Food. Sci. Tech.* 2012, 25, 13-23.
- [21] Jenkins, P., and Ralston, J., The adsorption of polysaccharide at the talc-aqueous solution. *Colloids Surf. A: Physical and engineering aspects.* 1998, 139, 27-40.
- [22] Morris, G.E., Fomasiero, D., and Ralston, J., Polymer depressant at the talc-water interface: adsorption isotherm, microflotation and electrokinetic studies. *Int. J. Miner. Process.* 2002, 30, 1-17.

[23] Moore, D.M., and Reynolds, R.C.J., X-Ray Diffraction and the Identification of Clay Minerals, Oxford University Press (Inc). Oxford New York (United States) 1989.

[24] Yahia, A., Al-Wakeel, M.L., Technical note talc separation from talc-carbonate ore to be suitable for different industrial applications, Central Metallurgical R and D Institute, September, 1999.

[25] Sánchez, S., Pacheco, R., La Rubia, Sánchez A., Pereira M. G., Aplicación de distintos talcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: Acta del Olivar. Fundación para la Promoción, el Desarrollo del Olivar y del Aceite de Oliva (Ed.), *Simposium Científico-Técnico. Expoliva*, Jaén (Spain) 2007, pp 497-502.

[26] Alba, J., Moyano, J., Martínez, F., Hidalgo, F., Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. *XII Simposium Científico-Técnico. Expoliva*, Jaén (Spain) 2005.

[27] Uceda, M., Frías, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. Proceeding II *Seminario Oleícola Internacional. Córdoba* 1975.

[28] Dalev, P.G., Simeonova, L.S., Emulsifying properties of protein-pectin complexes and their use in oil contain foodstuffs. *J.Sci. Food. Agric.* 1995, 68, 203-206.

[29] Pichot, R., Watson, R.L., Norton, I.T., Phospholipids at the interface: Current Trends and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 11767-11794.

[30] Pinotti, A., Belvilacqua, A., Zaritzki, N., Optimization of the flocculation stage in a model system of food emulsion waste using chitosan as a polyelectrolyte. *J. Food. Eng.* 1997, 32, 69-89.

[31] Moreau L., Kim, H.J., McClement DJ., Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membranes. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6612-6617.

- [32] Weinbreek, F., Nieuwenhuijse, H., Robjin, G.W., De Kruif, C.G., Complex formation of whey proteins: Exocellular saccharide EPS B40. *Langmuir*. 2003, 9, 9404-9410.
- [33] Ganzevles, R.A., Martien, A., Stuart, C., Van Vilet, T., and Jongh, H.H.J., Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air–water interface. *Food Hydrocolloid*. 2006, 20, 872-878.
- [34] Ganzevles, R.A., Polysaccharide charge density regulating protein adsorption to air/water interfaces by protein/polysaccharide complex formation. *J. Phys. Chem. B*. 2007, 111, 12969-12976.
- [35] Öksüz, M., Eroglu, M., Yildirim, H., Effect of talc on the properties of polypropylene/ethylene/diene terpolymer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 101, 3033-3039.
- [36] Nguyen, H.V., Savage, G.P., The effect of temperature and pH on the extraction of oxalate and pectin from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.), golden kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.), kiwiberry (*Actinidia arguta*) and persimmon (*Diospyros kaki*). *Int. J. Food. Sci. Tech.* 2012. 48, 794-800.

CAPÍTULO 2

Virgin olive oil yield as affected by physicochemical talc properties and dosage

Authors: Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Maria P. Aguilera², Rafael Pacheco³, and Gabriel Beltrán¹,

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain.

²Technological Center of Olive Goove and Oil, Citoliva Foundation, Scientific Technological Park GEOLIT, Mengíbar, Jaén, Spain.

³Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

European Journal of Lipid Science and Technology

Accepted: July 20, 2016

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2016, 118, 0000–0000

Research Article

Virgin olive oil yield as affected by physicochemical talc properties and dosage

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Maria P. Aguilera², Rafael Pacheco³ and Gabriel Beltrán¹

¹ IFAPA Center “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. Ctra. Bailén-Motril, Mengíbar (Jaén), Spain

² Technological Center of Olive Grove and Oil, Citoliva Foundation, Scientific-Technological Park GEOLIT, Mengíbar, Jaén, Spain

³ Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering, University of Jaén, Jaén, Spain

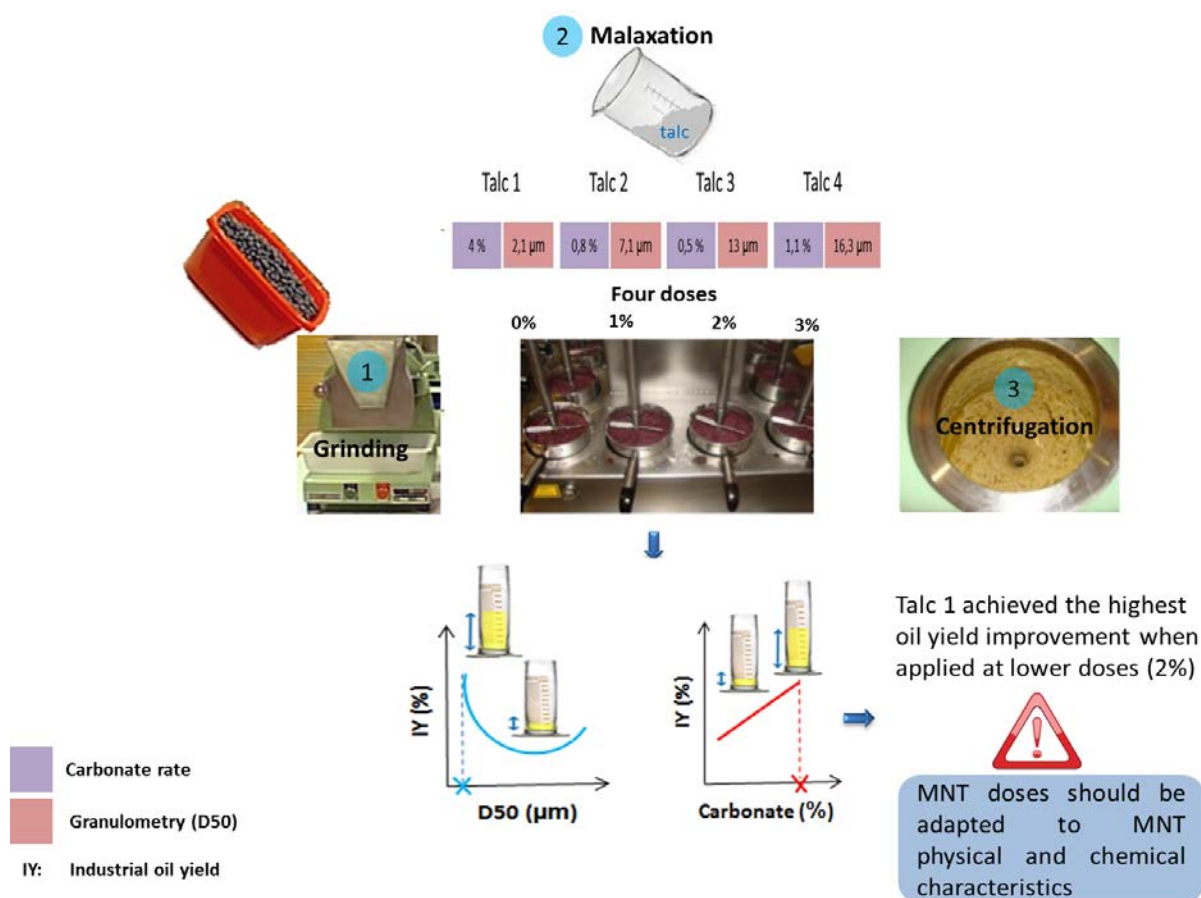
ABSTRACT

The aim of this work was to assess the effect of physicochemical characteristics of micronized natural talc (MNT) and its dosage on the industrial oil yield (IY) during virgin olive oil (VOO) extraction of Hojiblanca fruits. For this purpose, laboratory scale experiments were performed testing four commercial MNTs differing in their particle size (D50) and carbonate rate at doses ranging from 0% to 3%. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the highest improvement of the IY for a dose of 2%. It was also found that the effect of particles size and carbonate rate depends on the MNT dose, being much more pronounced at lower doses and that the use of MNTs with low carbonate levels or high particle size could be compensated using higher doses of talc.

Practical applications: This study provides deeper insights into the clarification of the effect of the addition of different doses of MNT, with different physicochemical characteristics on oil yield of ‘Hojiblanca’ olive fruits. The information contained in this study should be taken into account to choose the suitable MNT dose considering its physicochemical characteristics in order to improve the oil yield for the so-called ‘difficult pastes’.

Keywords: Carbonate rate / Micronized natural talc / Particle size / Process industrial yield / Talc dose

Abbreviations: analysis of variance; DF: degree of freedom; D 50: particle size diameter; FW: fruit weight; IY: process industrial yield; MNT: micronized natural talc; M: moisture content; MS: mean squares; OFDW: fruit oil content on dry weight basis; OFFW: fruit oil content on fresh weight basis; P: statistical significance; r^2 : coefficient of determination; RI: ripening index; S BET: specific surface area; SD: standard error; SST0: partial mean square for the effect, expressed as percentage of the total corrected sum of squares; SW: stone weight; T: temperature; X Carb: percentage of carbonate content in the talc.



The process oil yield as affected by physicochemical talc properties.

1. Introduction

Virgin olive oil is extracted from olive fruit using only mechanical processes including olives crushing, malaxation of resulting pastes and separation of the oily phase essentially by pressure or centrifugation [1].

Oil contained within the mesocarp cells is released during the crushing and malaxing process. In some cases, oil is retained within the cell walls rather than being released during the crushing and malaxation [2]. Such pastes are called 'fluent' or 'difficult', and are typically obtained from varieties as the Spanish 'Hojiblanca' and 'Picual', and occasionally from other varieties when freshly harvested olives are processed [3]. Among the factors affecting to extractability of the olive paste can be considered the pectic substances derived from cell wall polysaccharides. These substances are natural emulsifier agents present in olives. They promote emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action [4] as confirmed by Sadkaoui *et al.* (2015) [5] who established that increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity. These emulsions are surrounded by lipoproteic membranes preventing the merging of the oil droplets spread in the malaxed olive paste [6]. This phenomenon eventually leads to the production of intermediate phases of very similar density to oil and water difficult to separate and then, affecting the oil mill working capacity and increasing the oil losses in in the pomace [7]. In order to break these emulsions and improve the oil yield, different strategies have been successfully developed such as increasing time and temperature of the malaxation and using technological coadjuvants. Regarding the use of technological coadjuvants, a number of trials proved that the addition of enzymes during malaxation step determines an increase in oil extraction yield [8; 9]. However, the use of technological coadjuvants [3] with chemical or biochemical activity is forbidden by European regulations on virgin olive oil production [10]. The use of talc powder [11; 12; 13], salt [14; 15] and calcium carbonate [16] has been proposed as physical acting coadjuvants alternative to enzymes. Actually, micronized natural talc, the natural form of the hydrated magnesium silicate, $\text{Mg}_3(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH}_2)$, is the most widely used coadjuvant for oil extraction [11; 13] due to its exclusively physical action [17]. According to Caponio *et al.* (2016) [18], this mineral

is widely used due to its intrinsic properties such as chemical inertness [19]. Talc shows both hydrophilic and hydrophobic behavior at its breaking surfaces. After milling, charged and non-charged surfaces are formed as a consequence of particle breaking [20]. This mineral has been found to destabilize emulsions making solid/liquid separation easier and increases the oil yield; reduces notably the amount of fine solids in the oil and does not produce any changes in physical, chemical or organoleptic properties of the oil [2]. At the end of the extraction process, the talc ends up in the olive pomace, because of its specific weight (2.8 g/cm^3), while the oil is free of this substance [18]. However, because talc is a natural product, its physicochemical characteristics vary depending on the deposit and the production location. Each talc mine has its own characteristics and that is why talc grades differ in their performance in the end applications. Among the most studied MNT characteristics, particles size and carbonate rate may affect substantially the industrial oil yield [21; 22; 23].

The current work was carried out under controlled laboratory scale conditions in order to gain a better understanding of the effect of different doses of MNTs with different physicochemical characteristics on the industrial oil yield during virgin olive 2.1. Raw material

Olive trees (*Olea europaea*, L.) of 'Hojiblanca' cultivar with a similar crop load were selected. The trees were spaced $7 \times 7 \text{ m}$ and grown in the experimental orchard of IFAPA "Venta Del Llano" Mengíbar, Jaén (Spain) using standard growing techniques. The study was performed during 2009/10 crop year. A lot of 200 kg of olives was harvested by hand, homogenised, cleaned and processed immediately. 100 fruits were taken at random in order to determine their fresh weight, stone weight and their ripening index determined according to the method described by Uceda and Frías [24].

Some fruits were destoned and the flesh (pulp) was separated. Fruit and flesh were crushed and 60 g of olive paste were dried in a forced air oven at 105°C for 24 hours. The dried paste was weighed and the moisture content recorded. The oil content in the fruit was determined using a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) fat analyzer mq 10NMR (Bruker, Spain) and expressed as a percentage on both a fresh and a dry

weight basis. The equipment was calibrated periodically by Soxhlet analyses using n-hexane as extracting solvent. Characteristics of the olive fruit used for the experiment are given in Table 1. All the analysed parameters were those normally detected in olives harvested at a ripening index of 4.5.

Table 1 Initial composition of '*Hojiblanca*' olive fruit employed in the technological assays

RI	M (%)	OFFW (%)	OFDW (%)	FW (g)	SW (g)
4.5	53.87	20.45	44.34	3.70	0.66

RI: ripening index; M: moisture content; OFFW: fruit oil content on fresh weight; OFDW: fruit oil content on dry weight; FW: fruit fresh weight; SW: stone weight.

Four commercial MNTs have been used; their main physical and chemical characteristics are shown in Table 2.

Table 2 Basic data of the micronized natural talc (MNT) used in the experiment

Coadjuvant	Carbonate (%)	Medium particle size D50 (µm)	Density (g/cm ³)	Specific surface B.E.T (m ² /g)
MNT 1	4	2.4	2.77	7
MNT 2	0.8	7.1	2.78	9
MNT 3	0.5	13	2.77	7
MNT 4	1.1	16.3	2.78	6

B.E.T, Brunauer, Emmett and Teller method is the most widely used procedure for the determination of the surface area of solid materials.

2.2. Processing and olive oil extraction conditions

Experiments were performed at laboratory scale, using Abencor extraction unit (Abencor series 100, MC2 ingeniería y Sistemas, S.L. Seville, Spain), simulating commercial oil extraction systems. 64 samples (16 treatments × 4 replicates) were processed. Olives were crushed using a 6 mm sieve diameter. The olive paste was then malaxed in a thermo-beater at 28°C for 45 min. In the experiment a factorial design was selected considering two variables: type of MNT (MNT1; MNT2; MNT3 and MNT4) and MNT doses (0, 1%, 2% and 3%). Four replicates were carried out for each treatment. The MNT, when applied, was added at the beginning of malaxation.

The process industrial yield (IY) was defined as the percentage of oil obtained using the Abencor laboratory oil extraction system from 700 to 800 g of olives paste. The volume of olive oil was measured on graduated cylinder and the oil yield was calculated using the olive oil density of 0.915 kg/L Eq. (1). Results were expressed as percent.

$$IY = \left[\frac{(OV \times 0.915)}{WOP} \right] \times 100 \text{ Eq. (1)}$$

Where OV is the volume of olive oil obtained from the Abencor system (L) and WOP is the weight of olive fruit paste used (kg).

2.3. Statistical analysis

In the Tables, results are expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was applied. Tukey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). These determinations were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3. RESULTS AND DISCUSSION

From the ANOVA (Table 3) was observed as both MNT dose and MNT type showed a very level of significance on the process industrial yield (IY). However MNT dose could explain the highest percent of variability (55 %) over the value achieved by MNT type (12.4 %). Interaction between both factors was not significant. These results agreed with previous works [2, 22].

These results agree with previous works [12; 25, 26] that reported higher yields when MNT was used. The capacity of talc to increase oil yields could be explained by its exclusively physical action since it adsorbs the droplets of oil retained in the cell walls, forming larger drops, thereby facilitating the oil extraction [6]. In the olive paste oil and water can get entrapped in agglomerating microgels.

Table 3 Partial mean squares from analysis for the effect of talc physicochemical characteristics and dosage on the process industrial yield (IY) of '*Hojiblanca*' fruits

	Total	MNT(T)	Dose (D)	T×D	Error
DF^a	63	3	3	9	48
MS^b		6.47	28.62	1.12	0.86
SST₀^c		12.39	54.81	6.46	26.34
P^d		0.0003	0.0000	0.2579	

^a Degree of freedom; ^b Mean squares; ^c Partial mean square for the effect expressed as percentage of the total corrected sum of square; ^d Statistical significance.

In general, the addition of MNT improved the oil yield in all cases when compared to control without MNT addition (Table 4).

Table 4 Effect of MNT dose and physicochemical characteristics on the process industrial yield (IY)

MNT	Carbonate (%)	D 50 (μm)	MTN (%)	Oil yield (%)	Improvement respect to the control (%)
MTN 1	4	2.4	0	8.34±0.40	-
			1	11.27±0.56	26
			2	11.84±0.03	29.56
			3	11.80±0.03	29.32
MTN 2	0.8	7.1	0	8.34±0.95	-
			1	9.08±1.02	8.15
			2	10.77±1.00	22.56
			3	10.11±1.63	17.51
MTN 3	0.5	13	0	7.49±0.48	-
			1	8.86±0.33	15.46
			2	10±0.33	25.1
			3	11.15±0.33	32.83
MTN 4	1.1	16.3	0	8.42±0.28	-
			1	9.42±0.32	10.62
			2	10.99±0.35	23.38
			3	10.98±0.86	23.32

D 50: particle size; MNT: micronized natural talc; MNT 1, (4% (CaCO₃); 2.4mm); MNT 2, (0.8% (CaCO₃); 7.1 mm); MNT 3, (0.5% (CaCO₃); 13mm); MNT 4, (1.1% (CaCO₃); 16.3mm)

Additionally, both olive paste and talc have lipophilic characteristics, therefore, they tend to combine with or retain the oil. The talc helps counteract the paste further releasing oil into an extractable form, breaks up these micro gels and release the oil

[27]. It also prevent the formation of oil-in water emulsions and breaks up emulsions previously formed, allowing the oil to be extracted [5, 28; 29].

Because of the higher effect of MNT dose on oil yield, MNT dose effect was analysed for each MNT independently. It could be observed as the four MNTs behaved differently depending on the dose applied to the olive paste (Table 4). The highest IY values were obtained for MNT1 which produced a lineal increase of the IY as talc was higher. The lowest values were obtained when MNT3 was added at doses ranging between 1% and 2%. Similar trend was observed for the trials carried out with MNT2 and MNT4 only up to the dose of 2 % beyond which either a stabilization (MNT 4) or a slight decrease of the IY (MNT 2) was observed. Considering the pool of four MNTs together (Figure 1), the addition of MNT at doses ranging between 1 and 2% gave a rise in the IY, while greater doses (3%) did not produce any significant variation on the IY. The doses for talc addition referred in the literature for olive oil extraction range between 0.5 and 2% [28; 29]. However excessive doses can have a negative effect on the extraction process [28].

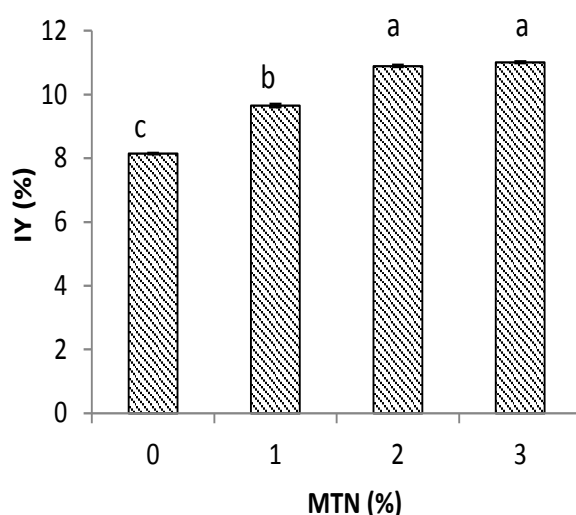


Figure 1 Effect of the MNT dose on the process industrial yield (IY) of '*Hojiblanca*' fruits considering the four MNTs together.

Different letters means significant differences at p , 0.05

In general, at lower doses (1% and 2%), MNT1 showed to be the best coadjuvant in term of extraction efficiency while MNT3 gave the worse results (Table 4). Considering the pool of MNT doses, among the MNT assayed can be observed as MNT 1 gave the highest oil yield achieving significant differences respect to MNT2 and MNT3 (Figure 2).

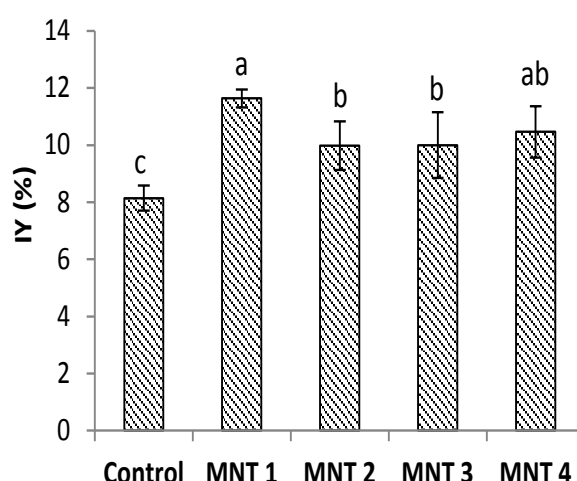


Figure 2 Effect of MNT physicochemical characteristics on the process industrial yield (IY) considering the four MNT doses together.

Different letters means significant differences at p , 0.05

Table 4 shows the percentage of the IY improvement obtained for each talc dose compared to the control. Results indicated that the oil yield improvement was not the same for the different MNTs. The most efficient talc, with an IY improvement of 26% at low dose (1%) was MNT1; while using the same dosage, MNT2 and MNT4 improved the IY only by 8.15 and 10.62%, respectively.

These differences observed in the IY as a response to MNT doses of each MNT tested may be explained by their different physicochemical properties (Table 2) which vary with their original deposit and preparation process. These results agree with those found by others authors [5; 22; 23] reporting as MNT physicochemical characteristics

such as the particle size (D 50) and the carbonate rate play an important role in breaking oil-in water emulsions and then improving the oil extraction process.

Lower D 50 and thus, greater active surface area allow a better adsorption of the droplets of oil retained in the cell walls, forming larger drops, thereby facilitating the extraction of this oil. Higher carbonate rate allows the enhancement of the breakdown of oil-in-water emulsions by releasing oil droplets that merge into larger drops as described by Alba *et al.* (2005) [23] and Sadkaoui *et al.* (2015) [5].

When IY is represented as function of carbonate content (Figure 3A) can be observed that IY increased as the carbonate rate in the talc was higher.

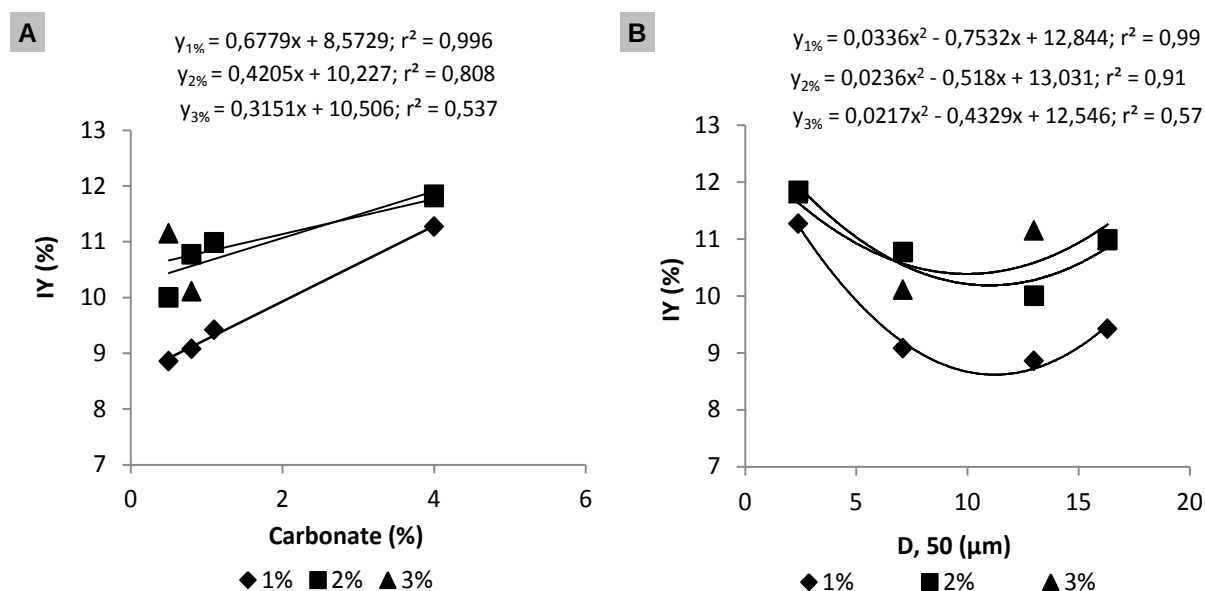


Figure 3 Correlation between the process industrial yield (IY) and MNT physicochemical characteristics applied at different doses. (A) Carbonate rate; (B) particle size.

Furthermore, the effect of carbonate rate depended on the talc dose being much more pronounced at lower doses. The highest IY value was obtained using the higher MNT concentration (2 and 3%) of MNT with the highest carbonate rate (4%) while the lowest value was achieved using the smallest concentration (1%) of MNT with the lowest

carbonate rate (0.5%). Therefore, MNTs with lower carbonate rate need higher doses to achieve IY similar to those obtained from low carbonate rate MNT.

Considering the particle size (Figure 3B), higher D 50 seems to have a negative effect on the IY although it depended on the talc dose. At 1%, the extraction efficiency showed highest differences for smallest particle size. For higher doses, differences between MNT with higher carbonate rate and the others was lesser. This result suggests that higher doses are recommended to improve the extraction efficacy when MNT with high D 50 are used. In general, IY was greater when MNT with small particle size and high carbonate rate are used. This results confirms those published by Alba *et al.* (2005) [23], Sánchez *et al.*, (2007) [22] and Sadkaoui *et al.* (2015) [5] reporting that MNT containing high carbonate content and low D 50 shows a better capacity to break oil-in-water emulsions and gives higher oil yields.

According to Öksüz *et al.* (2006) [30] the surface hydrophobicity of the MNT increases as particle size is smaller due to an increase in the value of contact angles. Based on this finding, it can be deduced that MNT 1 had the highest hydrophobic surface area. Likewise, Casanova *et al.* (2007) [31] found that a decrease in particle size produces an increase in the surface area (SBET) of the adsorbed oil. Therefore, IY may have a direct relationship with the SBET of the talc. Because the effectiveness of the MNT depended not only on its surface area but also on its carbonate fraction (XCarb) (as observed in this work) it's possible to bring this two terms together as SBET/ XCarb in order to study its influence on the IY.

Considering the four MNTs together, Figure 4 shows as the increase of SBET/ XCarb induced a lineal decrease of the IY, then a close relationship between the IY and the SBET/ XCarb was obtained ($p \leq 0,01$) with a r^2 value of 90%.

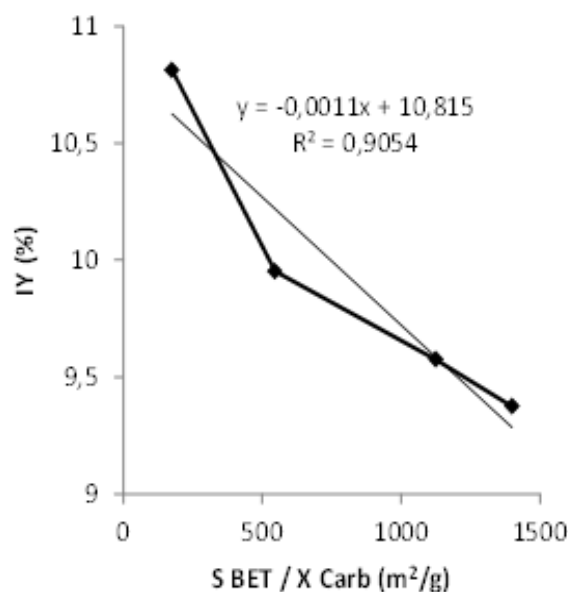


Figure 4 The process industrial yield (IY) as a function of the specific surface area/weight carbonate fraction.

4. CONCLUSION

The use of MNT improves the IY. In general, the use of MNT doses ranging between 1 and 2% gave rise to a lineal increase of the IY whereas higher doses did not improve the oil extractability. The effectiveness of MNT to increase the IY depended not only on the dose but also on its physicochemical characteristics. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the highest improvement of the IY and oil loss for a dose of 2%. Besides, it was found that low carbonate levels or high particle sizes could be compensated with higher doses of talc. Therefore, MNT doses should be adapted to MNT physical and chemical characteristics in order to optimize the oil yield. These results can be easily scaled for its application at industrial scale since Abencor system has been considered as a useful method for olive oil extraction studies.

5. REFERENCES

- [1] Servili, M., Piacquadio, P., De Stefano, G., Taticchi, A., Sciancalepore, V., Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, 104, 483–489.
- [2] Alba-Mendoza, J., Ruiz-Gomez, A., Hidalgo-Casado, F., in: Erickson, D. R., (Ed.), *Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices*, American Oil Chemistry Society, Champaign, Illinois, USA 1990, pp. 341–347.
- [3] Aguilera, M.P., Beltrán, M., Sánchez, S., Uceda, M., Jiménez, A., Kneading olive paste from “Picual” fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food. Eng.* 2010, 97, 533–538.
- [4] Dickinson, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloid.* 2003, 17, 25–39.
- [5] Sadkaoui, A., Jimenez, A., Pacheco, R., Beltran, G., Effect of micronized natural talc physicochemical characteristics and dose on the breakdown of oil-in-water emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2015, 118, 545–552.
- [6] Clodoveo, M.L., Durante, V., La Notte, D., Punzi, R., Gambacorta, G., Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 2013, 115(9), 1062–1069.
- [7] Canamasas, P., Use of coadjuvants in olive oil extraction. In: *Australian and New Zealand Olive Grower and Processor* 2006, pp. 29–32.
- [8] Ranalli, A., De Mattia, G., Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1105–1113.
- [9] Sharma, R., Sharma, P.C., Rana, J.C., Joshi, V.K., Improving the olive oil yield and quality through enzyme-assisted mechanical extraction, antioxidants and packing. *J Food Process Preserv.* 2013, 157–166.

[10] European Union Commission, Regulation EEC 1513/2001. Amending Regulations 136/66/EEC and 1638/98/EC as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union

Commission. Off. J. Eur. Commun. 2001, L201, 4–7.

[11] Carrapiso, A.I., García, A., Petró, J., Martín L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 2013, 115, 583-588.

[12] Ben David, E., Kerem, Z., Zipori, I., Weissbein, S., Basheer, L., Bustan, A., Dag, A., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from irrigated orchards. Eur. J. Lipid Sci. Tech. 2007, 225, 359-365.

[13] Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortíz, A., Morales, J., Frías, L., Fernández, A., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas, 1998, Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía.

[14] Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A.G., Mariscal, C., García, J.M., Salt improves physical extraction of olive oil. Eur. Food. Res. Tech. 2007, 225, 359-365.

[15] Pérez, A.G., Romero, C., Yousfi, K., García, J.M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjuvant. J. Am. Oil. Chem. Soc. 2008, 85, 685-691.

[16] Espínola, F., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. J. Food Eng. 2009, 92, 112-118.

[17] Espínola, F., Manuel, M., Torres, A., Castro, E., Comparative study of coadjuvants for extraction of olive oil. Eur Food Res Technol. 2015, 241:759–768.

[18] Caponio, F., Squeo, G., Dionzo, G., Pasqualone, A., et al., Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality. J. Sci. Food Agric. 2016, 96, 3292–3299.

- [19] Nkoumbou, C., Villieras, F., Njopwouo, D., Ngoune, C.Y., Barres O., Pelletier, M., Razafitianamaharavo, A., Yvon, J., Physicochemical properties of talc ore from three deposits of Lamal Pougue area (Yaounde Pan-African Belt, Cameroon), in relation to industrial uses. *Appl. Clay. Sci.* 2008, 41, 113-132.
- [20] Rotenberg, B., Patel, A.J and Chandler, D., Molecular explanation for why talc surfaces can be both hydrophilic and hydrophobic. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 20521-20527.
- [21] Moya, M., Espínola, F., Fernández, D., De Torres, A., Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T., Castro, E., Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *J. Food Eng.* 2010, 97, 57-63.
- [22] Sánchez, S., Pacheco, R., La Rubia, Sánchez A., Pereira M. G., Aplicación de distintos talcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: *Acta del Oliva. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.)*, Simposium Científico-Técnico. Expoliva, Jaén (Spain) 2007, pp 497-502.
- [23] Alba-Mendoza, J., Moyano., J., Martínez, F., Hidalgo, F., Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. XII Simposium Científico-Técnico. Expoliva, Jaén (Spain) 2005.
- [24] Uceda, M., Frías, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba (Spain) 1975.*
- [25] Caponio, F., Monteleone, J.I., Martellini, G., Summo, C., Paradiso, V.M., Gomes, T., Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from Coratina cultivar after production and during storage. *J. Oleo. Sci.* 2014, 63, 1125-1132.
- [26] Caponio, F., Squeo, G., Monteleone, J.I, Paradiso, V.M., Pasqualone, A., Summo, C., First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield,

chemical composition and volatile compounds of the oils. *LWT - Food Sci Technol.* 2015, 64, 439-445.

[27] Martínez Moreno, J.M., *Fundamentos fisico-químicos de la técnica oleícola*. Ed. CSIC. Madrid (Spain) 1972.

[28] Uceda, M., Jimenez, A., Beltran, G., Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites*. 2006, 57, 25–31.

[29] Cert, A, Albam J., León-Camacho, M., Moreda, W, Pérez-Camino, MC., Effect of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3930-3934.

[30] Öksüz, M., Eroglu, M., Yildirim, H., Effect of talc on the properties of polypropylene/ethylene/diene terpolymer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 101, 3033-3039.

[31] Casanova, H., Orrego, J.A., Zapata, J., Oil absorption of talc minerals and dispersant demand of talc mineral non-aqueous dispersions as a function of talc content: a surface chemistry approach. *Colloids and surfaces A: physicochem. Eng. Aspects*. 2007, 299, 38-44.

CHAPTER 3

Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during 'Hojiblanca' virgin olive oil extraction

Authors: Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain.

²Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

European Journal of Lipid Science and Technology

Accepted: June 28, 2016

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2016, 118, 0000–0000

Research Article

Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during “Hojiblanca” virgin olive oil extraction

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹

¹ IFAPA Center “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain

² Department of Chemical, Environmental and Material Engineering, University of Jaén, Jaén, Spain

ABSTRACT

This work studies how using MNT affects cell wall polysaccharides and proteins of ‘Hojiblanca’ paste during virgin olive oil extraction. Four doses of MNT were assessed: 0, 0.25%, 0.5% and 1%. Three pectic fractions were extracted from alcohol insoluble solids (AIS): water-soluble pectin (WSP), chelate-soluble pectin (CSP) and non-soluble pectin (NSP). In general, the content of the three pectic fractions decreased throughout the kneading step. This indicated a significant degradation and solubilisation of pectins during processing. The same trend was observed for protein content and total pectin content while AIS yield increased. Addition of MNT at doses lower than 0.5% favored the formation of a chemical bound through electrostatic interactions between proteins and pectic polysaccharides which are held together and adsorbed onto the talc surface giving a decrease in their content. Higher MNT doses (1%) produced the opposite behavior. The lowest dose of MNT (0.25%) reduced the oil losses in the pomace. A certain tendency for the loss of oil in the pomace to decrease as the amount of total pectin and protein decreased was observed, indicating that the oil yield is at least in part, related to the pectin and protein content depending on the dose of MNT added during malaxation step.

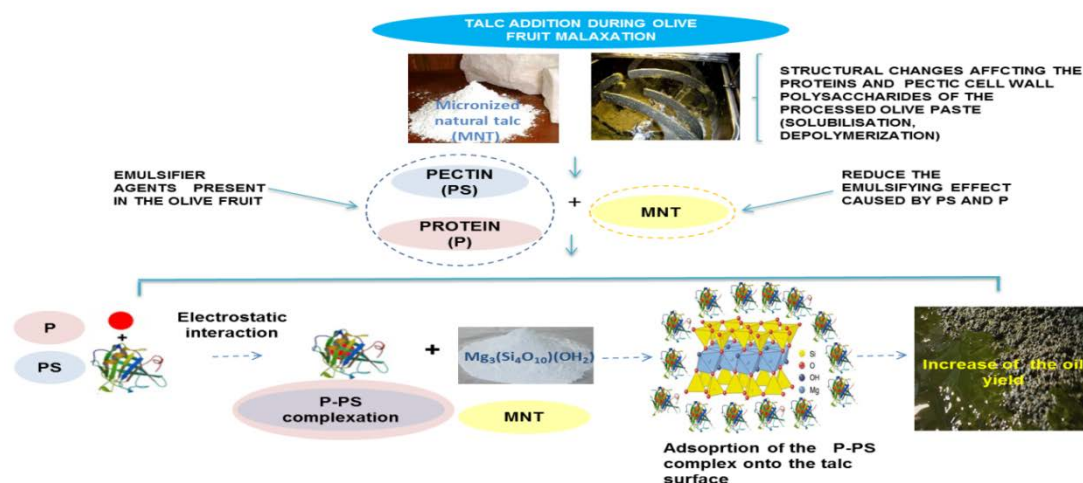
Practical application: We have demonstrated that the use of talc during the malaxation step greatly lessens the effect of the pectic substrates and proteins, principal emulsifier agents that influence the formation of oil-in-water emulsions during oil extraction process and enhance the extraction of the oil from the mesocarp cells by

reducing its loose in the pomace. Excess of talk addition presented a reverse effect, though. It is therefore of the utmost importance that the information contained in this study is fully taken into account to establish the suitable dose of talc that should be applied when difficult pastes are formed during malaxation step and which at least partially depends on the content of proteins and pectin compounds of the processed olive paste.

Keywords: oil yield, micronized natural talc, pectin, protein, electrostatic interaction

Abbreviations: AIS - alcohol insoluble solids, AK - after kneading, ANOVA - analysis of variance, BSA - bovine serum albumin, CSP - chelate-soluble pectin, CWP - cell wall protein, GA - galacturonic acid, MNT - micronized natural talc, NMR - nuclear magnetic resonance, NSP - non-soluble pectin, PG - polygalacturonase, PM - pomace moisture, PME - pectinmethylesterase, PODW - pomace oil content on dry weight, POFW - pomace oil content on fresh weight, P-PS - protein-polysaccharide complex, Pr - protein, TP - total pectin, VOO - virgin olive oil, WSP- water-soluble pectin.

Graphical Abstract:



Proteins and pectic cell wall polysaccharides as affected by talc addition during virgin olive oil extraction.

1. INTRODUCTION

Virgin olive oils are obtained from the fruit of the olive tree solely by mechanical or other physical means under conditions that do not lead to alteration in the oil [1]. It involves three successive operations: olive crushing, kneading of olive paste and separation of the oil by pressure or centrifugation [2]. The objective of fruit milling is breaking the plant tissues in order to liberate the oil drops contained in the mesocarp cells. Olive paste malaxation helps the small oil droplets formed during the milling to merge into larger drops [3]. The efficiency of kneading operation depends on olive paste rheological characteristics and kneading variables such as time, temperature and technological coadjuvant addition [4]. During oil extraction process, olive paste shows some physicochemical changes in the structural constituents of the cell wall and intercellular tissues. The resulting texture and other characteristics of the processed tissue are different from those of untreated plant tissue [5].

Pectins are components of the fruit cell walls that make important contributions to the olive paste texture [6]. They are bound to cellulose microfibrils in the cell wall and during processing; their structures are broken by naturally occurring enzymes. Mínguez-Mosquera *et al.* (2002) [6] reported that pectinases are responsible for the changes occurring in the pectic composition of olive fruits during processing. During fruit milling and/or paste malaxation a significant part of the oil may be emulsified and then, it could not be extracted by centrifugation. This lower oil yield is characteristic of the so-called “difficult pastes” [4, 7]. The high pectin and protein content of unripe olive fruits may contribute to the formation of these emulsions [8, 9].

To break down such emulsions, some technological coadjuvants have been successfully developed, e.g. cellular walls degrading enzymes [10] using a combination of pectolytic, cellulolytic and hemicellulolytic plant enzymes which degrades these cell walls or the vegetable colloids (pectins, hemicelluloses, etc.) and allows a significant improvement of the oil extracted from these “difficult” pastes [10]. Nevertheless, the use of technological coadjuvants producing a chemical or biochemical actions is forbidden by European Regulations on virgin olive oil production [1]. The use of talc powder [11; 12; 13; 14], salt [15; 16] and calcium carbonate [17]

has been proposed as physical acting coadjuvants alternative to enzymes. The addition of these physical coadjuvants in olive oil processing during the malaxation phase is known to promote the breakdown of oil/water emulsions and consequently make oil extraction easier, thus increasing the yield [18]. However, calcium carbonate and salt are not permitted for use as processing aids in the production of virgin olive oil according to European standards [1]. Actually, micronized natural talc, the natural form of the hydrated magnesium silicate of particle size lower than 40 μm , $\text{Mg}_3(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH}_2)$, is the most widely used coadjuvant for oil extraction [19; 11; 14] due to its exclusively physical action [20]. This coadjuvant has been authorized and regulated by the Spanish Ministry of Health [21] and due to its exclusive physical action does not contradict to the EU restrictions. The talc has a laminate microcrystalline structure with a neutral electric charge and a high lipophilic character (that is, a high capacity of absorption of oil) [20]. It is added to the olive paste during the malaxation process at different doses between 0.3% and 1% of the weight of the olive being milled to help for processing these difficult pastes [22]. This treatment achieves an effective physical blockage of the emulsifying action of the cell wall derivatives, producing higher oil yields and oils with lower water and suspended solids content [19]. Even though the improvement in oil yield reached by this coadjuvant, the main disadvantage is that talc can adsorb a third part of its weight in oil [23]; therefore, an excessive amount of talc may produce a big loss of oil since the oil disappears during the centrifugation together with the solid residues [20].

The technological effect of this coadjuvant may be attributed to the adsorption of proteins and polysaccharides such as pectins [24, 25], however, the mechanism of adsorption of these polymers at the talc-aqueous-oily solution interface is poorly understood.

So far as can be ascertained, no quantitative study has been established on the relative merits of MNT as technological aid in decreasing the emulsifying effect of pectin and protein compounds, principal emulsifying agents of the olive fruit.

This study was aimed to provide deeper insights into the clarification of the effect of the addition of micronized natural talc (MNT) at different doses on the content of pectin and protein compounds, during ‘Hojiblanca’ olive oil extraction at industrial scale.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Raw material

For this work, olive trees (*Olea europaea*, L.) of ‘Hojiblanca’ cultivar with a similar crop load were selected. The trees were spaced 7×7 m and grown in the experimental orchard of IFAPA Center in Cabra, Córdoba (Spain) using standard growing techniques. The study was performed during 2012/13 crop year. 6000 kg of olives were harvested by mechanical shaker with a ripening index of 4.53 determined according to the method described by Uceda and Frías (1975) [26].

2.2. Olive oil extraction conditions

The oil extraction was carried out at industrial scale in the IFAPA ‘Venta Del Llano’ oil mill. The olives were leaf-removal and not washed. Olive batches of 600 kg were crushed in a metallic hammer mill with a sieve size of 6 mm, filling each batch a malaxer container. The IFAPA ‘Venta Del Llano’ oil mill (Pieralisi, Spain) was equipped with a thermobeater formed by three containers, a two–three phases horizontal centrifuge SC-90 (working at two phases way) with a theoretical processing capacity of 45000 kg/day and a vertical centrifuge for oil cleaning P1500. The process was controlled and monitored by Procioleo automation software (Procisa, Seville). The olive paste was loaded at 950 kg/h in the horizontal centrifuge. Talc was added at the beginning of the malaxation phase by an automatic MNT dispenser previously calibrated. Four doses of Micronized natural talc (MNT) were added (0%, 0.25%, 0.5% and 1%). Talc characteristics (Microtalc FC8-AW, Mondo Mineral, Spain) were as follows: average particle size, 2.4 μm ; percentage of carbonate (mainly of calcium), 4%; specific area, 7 m^2/g and density, 2.77 g/cm^3 . The olive paste was kneaded at 27 °C for 60 minutes.

2.3. Sampling

Olive paste samples were collected just crushed and at the end of malaxation for each experiment of MNT doses. Pomace samples were taken from the horizontal centrifuge

outlet for the last 15 min of each assay in order to accurate the stabilization of the decanter performance. All samples were collected by triplicate. Replicates were taken at 5 min intervals.

2.4. Oil and moisture content

Crushed olives and pomace were weighted (30 g) and dried until constant weight in an oven at 105°C. The moisture was expressed as percent. Oil content was analysed by a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) fat analyzer mq 10NMR (Bruker, Spain) and were expressed as percent on dry weight basis. The equipment was calibrated periodically, for both fruit and pomace, by Soxhlet analyses using n-hexane as extracting solvent.

2.5. Olive paste analysis

2.5.1. Extraction of Alcohol-Insoluble Solids

Alcohol insoluble solids (AIS) were prepared following the procedure previously described by Levi *et al.* (1988) [5]. 5 g of olive paste was grinded in a polytron three times with 70% EtOH followed by two extractions with acetone. The AIS were dried at room temperature until constant weight. AIS content was expressed as percent on a fresh matter basis.

2.5.2. Fractionation of pectic polysaccharides

Fractions of different cell wall components were obtained by sequential chemical extraction of the cell wall material (AIS) using water (to extract water-soluble pectins, WSP), 0.1 M buffer Tris/HCl and 0.2% EDTA (to extract ionically bound pectins or chelate-soluble pectin, CSP) and 0.05 M NaOH (to obtain covalently bound pectins or non-soluble pectin fraction, NSP) as described previously by Levi *et al.* (1988) [5]. Total pectin content was obtained summing the three pectic fractions.

2.5.3. Galacturonic acid analysis

Pectin fractions, extracted as described above, were analyzed for galacturonic acid (GA) content using m-hydroxydiphenyl (MHDP) following the procedure used by Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) [27] and modified by Kinter and Van Buren

(1982) [28]. Absorbance was measured at 520 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio, Spain). Results were expressed as milligram of GA per 100 grams of AIS.

2.5.4. Extraction and quantification of total protein in the Alcohol Insoluble Solids

Aliquots of AIS (15 mg) were homogenized for 30 sec in an Eppendorf tube with 1.5 mL of NaOH 1M and heated in a water bath at 100 °C for 10 min. The suspension was centrifuged twice at 13200 g for 10 min. The crude extract used for the determination of total protein content in the AIS was quantified using the dye-binding method of Bradford (1976) [29] using BSA (bovine serum albumin) as standard. Proteins are expressed as milligrams per gram of AIS.

2.6. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed. When a significant F value was found, Turkey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Changes in cell wall components during malaxation

The influence of malaxation process using different amounts of talc doses on the content of alcohol insoluble solids, pectic cell-wall polysaccharides and proteins in the olive paste was studied.

3.1.1. Alcohol Insoluble solids (AIS)

As can be observed in Table 1, AIS of olive paste samples before kneading accounted about 35.3 % and increased after kneading step with a final paste showing an AIS value of 40 % probably due to a decrease in the soluble solid content of the processed olive paste [30]. These changes during kneading may affect substantially the rheological properties of the malaxed paste [5], its behavior during the solid-liquid separation step and its oil yield.

The use of MNT affected significantly the alcohol insoluble solids content of the malaxed olive paste (Table 2).

Table 1 Effect of malaxation on the alcohol insoluble solids (AIS), total pectin (TP) and cell wall proteins content of olive paste

	Before Kneading	After Kneading
AIS (%)	35.3±1.2 ^{†b*}	40±1.4a
TP (mg/100gAIS)	1738±79a	1275±83b
Pr (mg/gAIS)	7.83±0.10a	7.10±0.22a

* Different letters within a row mean significant differences ($p < 0.05$) with respect to process step

[†] Mean ± SD (n= 3)

Table 2 Partial mean squares from analysis of the effect of MNT addition on alcohol insoluble solids, pectic fractions, proteins content of the malaxed olive paste and moisture and oil content of the pomace

Parameter	DF ^a	Total 11	MNT 3	Error 8
AIS_{AK}	MS^b		35.22	16.68
	SST₀^c		88.74	11.26
	P		0.0004	
WSP_{AK}	MS^b		22313.7	2061.8
	SST₀^c		80.23	19.77
	P		0.0034	
CSP_{AK}	MS^b		16801.7	361.5
	SST₀^c		94.57	5.43
	P		0.0000	
NSP_{AK}	MS^b		35119.4	4275.4
	SST₀^c		75.49	24.51
	P		0.008	
TP_{AK}	MS^b		149912	10824
	SST₀^c		83.85	16.15
	P		0.0016	
Pr	MS^b		0.75	0.006
	SST₀^c		97.90	2.10
	P		0.0000	
PM	MS^b		1.87	0.38
	SST₀^c		64.95	35.05
	P		0.03	
Podw	MS^b		3.11	0.58
	SST₀^c		66.74	33.26
	P		0.03	

^a degree of freedom; ^b Mean square; ^c Partial mean square for the effect expressed as percentage of the total correct sum of squares; P: statistical significance

The highest AIS value (40 %) was obtained for the control carried out without talc addition (Figure 1).

The addition of MNT up to 0.5% reduced the AIS, while greater dose (1%) led to its increase. These results indicate that the use of MNT at doses ranging between 0.25% and 0.5% resulted in a greater adsorption of alcohol-insoluble polymers onto the talc surface when compared to higher doses (1%) [24].

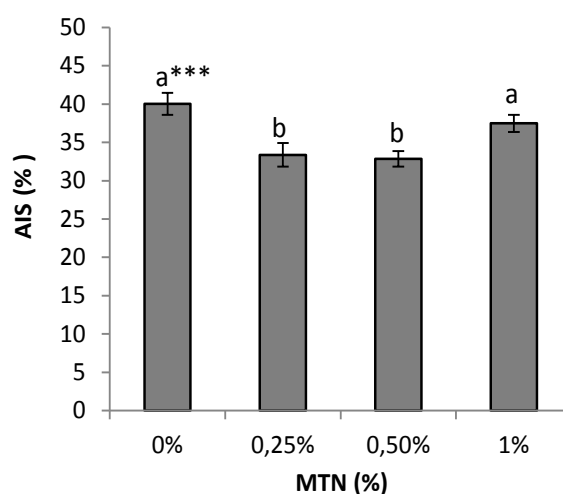


Figure 1 Effect of MNT addition on the alcohol insoluble solids (AIS) content of olive paste during malaxation

Significant differences at *p: 0.05, **p: 0.01, ***p: 0.001

3.1.2. Pectic cell wall polysaccharides

The distribution of the GA in the different pectin fractions during olive paste malaxation is shown in Figure 2. For the three studied fractions, a decrease was observed throughout the olive paste kneading. Before malaxation, among the pectic cell wall polysaccharides, CSP was found to be the minor fraction (around 424 mg GA / 100 g AIS) showing a slight decrease ($p \leq 0.05$) after malaxation (359 mg GA / 100 g AIS). Similar decreases in the content of CSP have been reported for Jalapeño peppers as a consequence of processing [31]. WSP was detected at higher content than CSP in

all the analyzed olive pastes. Its content varied between 473 mg GA / 100 g AIS in olive paste before kneading and 434 mg GA / 100 g AIS after kneading.

The lower amount of CSP comparing to WSP could be explained by a decreased ionic cross-linking as a result of the increased degree of methyl esterification during processing. Before kneading, both soluble fractions (WSP and CSP) represent pectins that have been solubilized from cell wall during ripening process, mainly composed by the initially soluble material and pectins solubilized from the tightly cell wall-bound fractions. The decrease observed for both of them after malaxation indicates that chemical changes occur in the pectin cell wall polysaccharides leading to their solubilization [32].

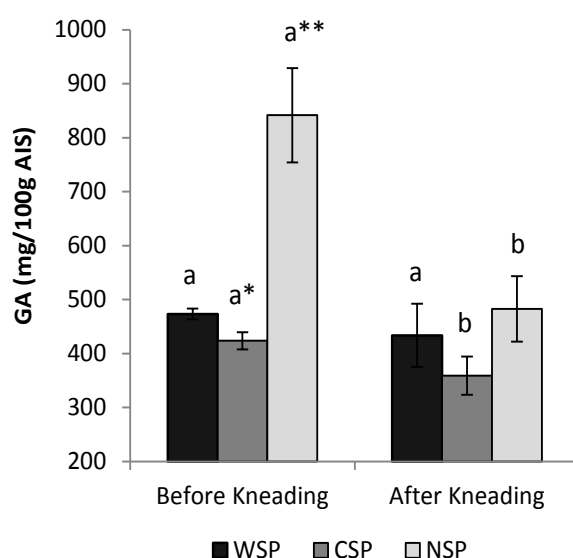


Figure 2 Effect of malaxation on the pectin fractions content of olive paste: WSP, CSP, NSP

Significant differences at *p: 0.05, **p: 0.01, ***p: 0.001

In regard to NSP (Figure 2), considered as the main pectic fraction, it showed a similar reduction in its content after malaxation. This phenomenon was also observed in broccoli and was attributed to the conversion of protopectin into soluble pectin by the solubilization and/or β -eliminative depolymerization of this material [33].

Total pectin content (TP) decreased after olive paste kneading (Table 1) and results are in agreement with those published by Cámara Hurtado *et al.* (2002) [32] who noticed a loss of pectin content accompanied by a steady and substantial decrease in pectin polymer size during processing. The fact that the malaxed paste showed lower pectin content than that before kneading suggests that olive paste heating during malaxation may produce depolymerization of these compounds. Significant correlations were found between NSP fraction and WSP ($r^2 = 0.76$), CSP ($r^2 = 0.98$) and TP ($r^2 = 0.99$) probably associated with their degree of solubilization [6]. Generally, de-esterified pectins mainly composed by NSP are less susceptible to degradation and less soluble [34]. From these observations and the results of previously reported works, it can be deduced that during malaxation, specific biochemical and/or chemical transformations occur in the pectin cell wall polysaccharides of the olive paste. Three different mechanisms have been proposed to explain these structural alterations: (1) the activity of endogenous pectin degrading enzymes including pectinmethylesterase (PME) and polygalacturonase (PG) [35, 6], (2) depolymerization by β -elimination [36] and (3) acid hydrolysis [37]. The significance of these biochemical processes depends mainly on enzymatic levels in olives, characteristic of each olive cultivar as well as some other factors exogenous to the paste itself [38]. However, the modification of the chemical characteristics of pectin by processing induces alterations in its functional properties such as rheological behavior and gelling ability [39] affecting to its capacity to bind with MNT. In fact, as shown in Table 2, the use of MNT affected significantly the content of pectic substances following the same trend observed for AIS (Table 3).

The addition of MNT up to 0.5% produced a decrease in the three pectic fractions and the total pectin content in the malaxed olive paste. This could be explained by the occurrence of electrostatic interactions between the coadjuvant and pectins because of their opposite charge leading to higher adsorption of pectic polymers onto the talc surface [40]. In this case, there was enough talc present with positive charge to completely compensate the negative charge of the pectins. However, increasing the dose of talc to 1% resulted in a decrease in pectin adsorption onto the talc surface due to the apparition of free pectic polysaccharides that couldn't be complexed with MNT.

Table 3 Effect of talc addition on pectin fractions and total pectin content of olive paste after malaxation

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
WSP (mg/100gAIS)	434±59 [†] a*	293±39b	244±51b	261±26b
CSP (mg/100gAIS)	359±35a	236±11b	220±7b	354±4a
NSP (mg/100gAIS)	483±61ab	387±55b	348±23b	590±62a
TP (mg/100gAIS)	1275±83a	915±76b	812±76b	1206±88a

* Different letters within a row mean significant differences ($p < 0.05$) with respect to process step

[†] Mean $\pm$ SD (n= 3)

As pectins are anionic hydrocolloid emulsifiers [41], they interact with the positive face of the talc particles [40]. Formation of pectin-MNT complexes contributes to the weakening of the emulsifying effect caused by pectic polysaccharides affecting to VOO extractability and oil yield [40].

Changes in the pectic fractions content of the malaxed olive paste using different MNT doses respect to that obtained before kneading are shown in Table 4.

Table 4 Changes in the pectin fractions content after malaxation using different doses of MNT

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
WSP (%)	8.37±0.1*	10.9±0.1	17.8±0.3	22.5±0
CSP (%)	15±0.1	7.9±0.13	-11.6±0.12	-11.6±0.10
NSP (%)	42.7±0.05	37.5±0.17	7.0±0.07	1.0±0.24
TP (%)	26.7±0.06	24.2±0.11	7.7±0.08	4.4±0.11

* Mean $\pm$ SD (n= 3)

Addition of MNT during malaxation allowed a reduction of most of the pectic fractions content. As MNT dose was increased, the reduction percentage of NSP and TP was lower. For WSP fraction, the opposite occurred with an increase in the reduction percent of between 10.9 and 22.5%. The best reduction was achieved for NSP fraction at 0.25% while the lowest one was achieved for the same fraction at 1%. This result seems to indicate that NSP showed higher capacity to bind and adsorb onto talc particles at lower doses, while higher doses decreased its adsorption properties. However CSP increased about 11.6% when MNT doses of 0.5% and 1% were added

showing its highest adsorption at lower doses (0.25%). All these differences indicate that during kneading step, the use of MNT differently altered the content of each pectin type suggesting that the chemical characteristics of the pectic compound considerably affects to its adsorption onto the talc particles.

3.1.3. Cell wall proteins (CWP)

Cell wall proteins (CWP) are essential constituents of the olive fruit involved in modifications of cell wall components, wall structure, signalling, and interactions with plasma membrane at the cell surface [42]. Table 1 shows the effect of olive paste malaxation on the cell wall proteins. Protein content of AIS in the olive paste before kneading was around 7.83 mg / g AIS and decreased until 7.10 mg / g AIS after kneading. This decrease after malaxation may be explained by their complexation with pectic polysaccharides [43]. In this case, the attraction involves positively charged local patches on the protein interacting with the anionic polysaccharide [44, 45]. Formation of protein-polysaccharide (P-PS) complexes depends on many factors such as pH, ionic strength, protein to polysaccharide ratio, total solid concentration, charge density molecular weight and conformation [46]. Leroux *et al.* (2003) [47] found that some pectin fractions are able to improve the emulsification of oil in water, presumably as a consequence of their protein content, low degree of esterification and low molecular weight. The ability of pectins to interact with proteins as a function of their esterification degree and ions content, which are ripening-dependent, has been recently documented [34]. Electrostatic interactions between pectic polysaccharides and proteins may improve the stability of oil-in-water emulsions [48] formed during kneading step. Therefore, an adsorption of proteins-pectin complexes with MNT during olive paste kneading may occur as described for MNT-pectins complex.

The use of MNT affected significantly the protein content of the malaxed olive paste (Table 2). The adsorption of the proteins onto talc was enhanced with doses ranging between 0.25% and 0.5%. Greater dose (1%) resulted in high protein content (Figure 3). We can deduce from this result that an excess of MNT could not adsorb protein and pectic polysaccharides, remaining oil-in-water emulsions during kneading and then reducing the process oil yield.

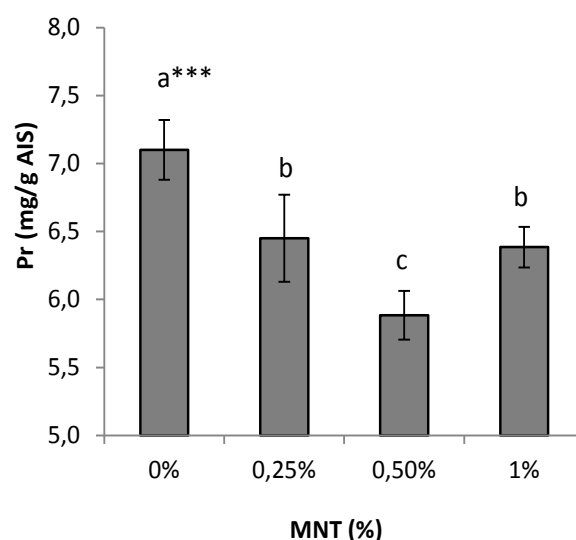


Figure 3 Effect of MNT addition on the cell wall protein content of olive paste during malaxation

Significant differences at *p: 0.05, **p: 0.01; ***p: 0.001

3.2. Changes in moisture and oil content of the olive pomace during malaxation

Table 5 reports moisture (PM) and oil content of the olive pomace obtained in this work.

Table 5 Effect of talc addition on oil and water content of pomace

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
PM (%)	63±0.3 [†] ab*	63.3ab±0.6ab	63.7a±0.9a	61.8ab±0.5b
PODW (%)	13.6±0.7a	11.3±0.7b	11.6±1.2ab	12±0.2ab

*

Different letters within a row mean significant differences (p<0.05) with respect to process step

[†] Mean ± SD (n= 3)

Oil yield is usually expressed as pomace oil content on fresh weight (POFW), the main oil mill by-product, although when expressed on dry weight basis is not affected by the water addition in the process. Therefore results and discussion will be based on pomace oil content on dry weight (PODW). The results showed that MNT affected significantly to PM and the PODW of the pomace (Table 2). MNT led to an increase of the oil extraction yield (p≤0.05). These results agree with previous studies carried out on other cultivars such as 'Picual' [4] and 'Coratina' [7]. The addition of MNT up to

0.25% decreased the PODW, while higher doses led to its increase. As observed, the use of talc during malaxation step greatly lessens the effect of the pectic substrates and proteins of the olive paste facilitating the release of the cellular oil. The loss of oil in the pomace was lower as the amount of total pectin and protein decreased. Correlations between PODW content and TP content ($r^2 = 0.62$) and protein content ($r^2 = 0.83$) were observed, indicating that the differences observed for PODW are, at least in part, related to the content of the pectin and protein fractions and then to the dose of talc added to the olive paste. During malaxation, the degree of esterification of the pectins contributes to the modulation of their binding to cations [49] and therefore to their complexation with proteins and their adsorption capacity with MNT particles. The high hydrophilic nature of pectin [50] and protein substances [51] enhances their solubility in the water-rich phase of the olive paste favoring their adsorption onto the talc surface through electrostatic interactions which could lead to the weakening of their emulsifying activity and increase the process oil yield.

4. CONCLUSION

During the olive paste processing, the content of the different pectin fractions as well as that of cell wall proteins changed strikingly. Malaxed olive pastes were characterized by lower amounts of WSP, CSP, NSP and proteins and higher amount of AIS. This indicates that substantial degradation and solubilization of pectic cell wall polysaccharides and proteins occur during processing. The use of MNT during kneading process markedly reduced the pectin as well as protein content in the olive paste, principal emulsifier agents implied in the formation of oil-in-water emulsions during oil extraction process. This reduction may be explained by the apparition of attractive interactions between protein and pectic polysaccharide in the olive paste during malaxation which are held together and adsorbed onto the talc. This gave rise to their complexation and their elimination with pomace residue. Addition of the MNT in a range of 0.25-0.5% increased the adsorption tendency of the proteins and pectic cell wall polysaccharides onto the talc surface while greater dose (1%) resulted in a decrease in their adsorption capacity. Similar changes were observed for oil content of the pomace residue. Our results highlight the importance of protein and pectic

compounds in the talc/cell wall material interactions and how MTN addition helps to break down emulsions during kneading process enhancing the separation and the extraction of the oil from the mesocarp cells and reducing its loose in the pomace.

5. REFERENCES

- [1] European Union Commission, Regulation EEC 1513/2001. Amending Regulations 136/66/EEC and 1638/98/EC as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union Commission. *Off. J. Eur. Commun.* 2001, 201.
- [2] Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C., Effect of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agr. Food Chem.* 1996, 44, 3930-3934.
- [3] Uceda, M., Jiménez, A., Beltrán, G., Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites.* 2006, 57(1), 25-31.
- [4] Aguilera, M.P., Beltrán, G., Sánchez-Villasclaras, S., Uceda, M., Jiménez, A., Kneading olive paste from 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food Eng.* 2010, 97, 533-538.
- [5] Levi, A., Ben-Shalom, N., Plat, D., Raid, D.S., Effect of blanching on pectin constituents and related characteristics of dehydrated peaches. *J. Food Sci.* 1988, 53, 1187–1190, 1203.
- [6] Mínguez-Mosquera, I., Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 93-99.
- [7] Caponio, F., Monteleone, J., Martellini, G., Summo, C., Paradiso, V.M, Pasqualone, A., Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from Coratina cultivar after production and during storage. *J. Oleo Sci.* 2014, 63(11), 1125-1132.

- [8] Martínez-Moreno, J.M., Pereda, J., Gómez-Herrera, C., Janer del Valle, C., Estudios físico-químicos sobre las pastas de aceitunas molidas. XX. Viscosidades de los Alpechines. *Grasas Aceites*. 1964, 15, 226-232.
- [9] McColloch, R. J., Neilsen, B. W., Beavens, E. A., Factors influencing the quality of tomato paste: II. Pectic changes during processing. *Food Technol*. 1950, 4, 339–345.
- [10] Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Lucera, L., Del Re, P., Enhancing the quality of virgin olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing. *Eur Food Res Technol*, 2003, 216, 109–115.
- [11] Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortíz, A., Morales, J., Frías, L., Fernández, A., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas, 1998, Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía.
- [12] Ben David, E., Kerem, Z., Zipori, I., Weissbein, S., Basheer, L., Bustan, A., Dag, A., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from irrigated orchards. *Eur. J. Lipid Sci. Tech*. 2007, 225, 359-365.
- [13] Fernandez, D.G., Espínola, F., Moya, M., The influence of different technological coadjuvants on the quality and yield of virgin olive oil using response surfaces methodology. *Grasas y Aceites*. 2008, 59, 39–44.
- [14] Carrapiso, A.I., García, A., Petrón, J., Martín L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol*. 2013, 115, 583-588.
- [15] Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A.G., Mariscal, C., García, J.M., Salt improves physical extraction of olive oil. *Eur. Food. Res. Tech*. 2007, 225, 359-365.
- [16] Pérez, A.G., Romero, C., Yousfi, K., García, J.M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjuvant. *J. Am. Oil. Chem. Soc*. 2008, 85, 685-691.
- [17] Espínola, F., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *J. Food Eng*. 2009, 92, 112-118.

- [18] Caponio, F., Squeo, G.m Difonzo, G., Pasqualone, A., Summo, C., Paradisco, V.M, Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality? *J Sci Food Agric*. 2016, 96, 3292-3299.
- [19] Alba, J., Muñoz, E., Martínez, J.M., Obtention of olive oil use of additives facilitating its extraction. *Alimentaria*. 1982, 138, 25-55.
- [20] Espínola, F., Manuel, M., Torres, A., Castro, E., Comparative study of coadjuvants for extraction of olive oil. *Eur Food Res Technol*. 2015, 241, 759–768.
- [21] Ministry of Health, Spain. Boletín Oficial del Estado. 1986. 19, 3089–3090.
- [22] Clodoveo, M.L., Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future. An overview. *Trends Food Sci. Tech*. 2012, 25, 13-23.
- [23] Moya, M., Espínola, F., Fernández, D., De Torres, A., Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T., Castro, E., Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *J. Food Eng*. 2010, 97, 57-63.
- [24] Liu, G., Freng, Q., Ou, L., Lu, Y., Zhan, G., Adsorption of polysaccharide onto talc. *Miner. Eng*. 2006, 19, 147-153.
- [25] Arseguet, D., Baboulene, M., Adsorption of various enzymes onto talcs scope and limitations of this new immobilization system. *Biocatal. Biotransfor*. 1995. 12(4), 267-279.
- [26] Uceda, M., Frías, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. Proceeding *II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba*. 1975.
- [27] Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., New methods for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem*. 1973, 54, 484-489.
- [28] Kinter, P.K., Van Buren, J.P., Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxyphenyl method. *J. Food Sci*. 1982, 47, 756-760.
- [29] Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976, 72, 248–254

- [30] Berry, S.Z., Uddin, M.R., Breeding tomato for quality and processing attributes. In Monographs on theoretical and applied genetics, Kallo, G. Ed., vol. 14, Springer, Berlyn, Gemany, 1991, pp. 99-119.
- [31] Gu, Y. S., Howard, L. R., Wagner, A. B., Physicochemical factors affecting firmness of pasteurized Jalapeno pepper rings. *J. Food Quality*. 1999, 22, 619–629.
- [32] Cámara Hurtado, M., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Changes in cell wall pectins accompanying tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) paste manufacture. *J Agr. Food Chem*. 2002, 16, 50(2), 273-278.
- [33] Christiaens, S., Mbong, V. B., Van Buggenhout, S., David, C. C., Hofkens, J., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E., Influence of processing on the pectin structure–function relationship in broccoli purée. *Innov. Food sci. & Emerg. Technol*. 2012, 15, 57–65.
- [34] Ramos, O. P., Ornelas, J.J., Ruiz, S., Zamudio, P.B., Cervantes, B., Gardea, A. A., Pérez, J.D., Ibarra, V., Reye, J., Effect of ripening and heat processing on the physicochemical and rheological properties of pepper pectins. *Carbohydr. Polym*. 2015, 115, 112-121.
- [35] Duvetter, T., Silas, D.N., Van Buggenhout, R., Jolie, R., Van Loey, A., Hendrickx, M., Pectins in processed fruit and vegetables: Part I: Stability and catalytic activity of pectinases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2009, 8, 75-85.
- [36] De Roeck, A., Sila, D.N., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrichx, M., Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chem*. 2008, 107, 1225-1235.
- [37] Diaz, J.V., Anthon, G.E., Barrett, D.M., Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *J Agr. Food Chem*. 2007, 55(13), 5131-5136.
- [38] Gómez, C.H., Matter transfer during virgin olive oil elaboration, *Grasas Aceites*. 2007, 58(2), 194-205.

- [39] Sila, D. N., Smout, C., Elliot, F., Van Loey, A., Hendrickx, M., Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *J. Food Sci.* 2006, *71*, 1–9.
- [40] Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., Beltrán, G., Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 2015, doi: 10.1002/ejlt.201500112.
- [41] Moreau, L., Kim, H.J., McClement, D.J., Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membrane *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 6612-6617.
- [42] Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezika, R.F., Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Sci.* 2006, *11*, 33-39.
- [43] Dickinson, E., Protein-stabilized emulsions. *J. Food Eng.* 1994, *22*(1-4), 59-74.
- [44] Nguyen, T.Q., Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulphate and diethylaminoethyl dextran. *Macromol. Chem. Physic.* 1986, *187*, 2567-2578.
- [45] Park, J.M., Muhoberac, B.B., Dubin, P.L., Xia, J., Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules.* 1992, *25*, 290-295.
- [46] Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J., Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 1998, *38*(8), 689-753.
- [47] Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J., Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloid.* 2003, *17*, 455–462.
- [48] Li, J.L., Cheng, Y.Q., Wang, P., Zhao, W.T., Yin, L.J., Saito, M., A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: Generation of an enzymatically cross linked beet pectin layer using horseradish peroxidase Masayoshi Saito. *Food Hydrocolloid.* 2012, *26*, 448-455.

- [49] Khotimchenko, M. Y., Kolenchenko, E. A., Khotimchenko, Y. S., Khozhaenko, E. V., Kovalev, V. V., Cerium binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010, 77, 104–110.
- [50] Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., Lorenzo, G.D., Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci*. 2013, 4, 49.
- [51] Garay, A.A., Colmenero, J.M.F., Garciarrubio, A., Covarrubias, A.A., Highly hydrophilic proteins in Prokaryotes and Eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem*. 2000, 275, 5668-5674.

SECCIÓN II

CAMBIOS BIOQUÍMICOS E INVOLUCRACIÓN DE LA PECTINMETILESTERASA EN LA DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR Y LA BIOSÍNTESIS DE METANOL, DURANTE LA MADURACIÓN DE TRES VARIEDADES DE ACEITUNA: 'ARBEQUINA', 'PICUAL' Y 'HOJIBLANCA'

CAPÍTULO 4

Involvement of pectin methylesterase in the regulation of pectic cell wall disassembly, methanol accumulation and softening of olive fruit during ripening

Authors: Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain.

²Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Journal of the Science of Food and Agriculture

Submitted (under revision): September 15, 2016

Involvement of Pectin methylesterase in the Regulation of Pectic Cell Wall Disassembly, Methanol Accumulation and Softening of Olive Fruit during Ripeness

ABSTRACT

Background. Methanol oxidation to CO₂ could result in the incorporation of methanol carbon into metabolites via the Calvin-Benson cycle. The role of pectin methylesterase (PME) in methanol accumulation in olive fruit has not been firmly established. In this work, we investigated whether this enzyme is involved in pectin degradation and methanol accumulation during olive fruit ripening of three of the major olive cultivars for oil extraction in Spain: ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’.

Results. For the three studied olive cultivars, PME activity increased as ripening progressed reaching a maximum at veraison stage followed by a marked decrease and then remained unchanged until the end of fruit ripeness. The same trend was observed for total pectin content, methanol content and 4,5 unsaturated uronides content. Interestingly, the degree of esterification and fruit firmness showed a progressive decrease and for the latter parameter most of this decline occurred when the highest activity of PME was detected.

Conclusion. We provide biochemical evidence that a major source of methanol in olive fruit may be pectin methyl esters that are de-esterified to methanol and pectic substances by a PME-catalyzed reaction. We also suggest that PME-generated methanol may be a by-product of cell wall disassembly that mainly occurs at veraison stage.

Keywords: olive fruit / ripening process / pectinmethylesterase / pectin / methanol / degree of esterification / cell wall disassembly

INTRODUCTION

The maturation of the olive (*Olea europaea* L.) is a slow and long process that takes several months and varies according to the latitude of the growing area, variety, water availability, temperature and growing practices ¹.

During the course of ripening process, olive fruit undergoes a number of external modifications in skin, pulp color and firmness, including changes in fruit composition.

The first stage of olive ripening is known as the green stage corresponding to green mature fruits which have reached their final dimensions. Afterwards, chlorophylls in the skin are gradually replaced by anthocyanins giving the transition to a 'spotted', 'purple' and 'black' stage ¹. At the veraison stage, the phase between the yellow green and purple skin, softening, cell expansion and oil accumulation in the mesocarp cell vacuoles are observed ².

In fruit tissues, adjacent cells are linked by the pectin-rich middle lamella. During fruit ripeness, the polysaccharides forming the cell wall (cellulose, hemicelluloses and pectins) depolymerize ³. One of the effects of these biochemical changes in both the cell wall and the middle lamella is a decrease in firmness. Thus the structural changes occurring in the cell wall and the middle lamella during ripening lead to cell separation, tissue weakening, rupture and release of the cell content, giving the fruit juiciness ⁴. Marin-Rodriguez et al. ⁵ reported that fruit softening is mainly associated with cell wall disassembly and modification in the pectin fraction. These changes are presumably the results of both enzyme-catalyzed and non-enzymatic mechanisms.

Chemical β -elimination is one of the mechanisms of non-enzymatic degradation of pectins. The rate of this reaction is accelerated with increasing the methylation degree, temperature and pH ^{6, 7}.

Enzyme-catalyzed changes in cell wall structure and composition are considered as the major factor in fruit softening, although turgor loss and starch degradation during ripening might contribute to this process ⁸. There are several enzymes able to modify

cell wall structure such as pectin methylesterase (PME) (EC, 3.1.1.11). Studies have shown that this enzyme is involved in fruit softening, abscission and senescence, cell wall maturation and regeneration, cell growth, plant responses to infection and salinity stress ⁹. It produces the de-esterified fraction of pectins and generates the fixed negative charges that originate a Donnan potential between the inside and the outside of the cell wall matrix ¹⁰. A major source of methanol in fruits may be pectin methyl esters that are de-esterified to methanol and pectic substances by a PME-catalyzed reaction ¹¹ as described in developing tomato fruit relating both PME activity and methanol production ^{12, 13}.

Studies about pectin methylesterase (PME) have been very limited especially in olive fruit. Furthermore, its role in methanol accumulation in this non-climacteric fruit has not been established despite olive cell wall disassembly plays an important role in the ease of oil extraction ¹⁴.

This study was conducted to investigate changes in pectic substances and the activity of PME in order to determine its involvement in pectin degradation, methanol accumulation and loss of firmness during the fruit ripening of three olive cultivars for oil extraction: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The study was carried out for the crop year 2012/2013. Olive trees of three olive cultivars, 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' were selected by their crop load homogeneity. Twelve trees for each olive cultivar were pooled into three groups of four trees. The trees were spaced 7 × 7 m and grown in the experimental orchard of IFAPA Venta del Llano in Mengibar, Jaén, Spain, under irrigation and traditional techniques.

Olive Samples

Two kilograms of olives were collected from each pool of trees for each olive cultivar at each sampling date. Sampling was carried out every two weeks, at nine harvest

dates from the beginning of October until the end of January. Fruit ripening index was measured according to the method proposed by the Estación de Olivicultura y Elaiotecnía ¹⁵. The fruit sampling dates and ripening index are shown in Table 1. After harvesting, the fruits were washed using Milli-Q water, dried with filter paper, and processed immediately (15 min) to avoid any alteration.

Table 1 Ripening index of Olive Fruits from ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’ cultivars

Olive cultivar	Oct 1 ^a	Oct 15	Oct 29	Nov 12	Nov 26	Dec 10	Dec 20	Jan 8	Jan 21
‘Arbequina’	0.74	1.27	2.08	2.63	3.43	3.81	4.03	5.27	5.31
‘Picual’	0.17	1.03	3.37	4.34	4.65	5.22	5.94	6.67	6.70
‘Hojiblanca’	0.08	0.87	2.02	2.10	2.25	3.25	3.25	5	5.09

^a Harvest dates for the three olive cultivars

Fruit Firmness

Olive firmness (kg.cm⁻²) was measured at middle region of each fruit subjected to axial puncture by making three perforations with a penetration probe (a Bertuzzi FT-327 model with a 0.5 cm⁻² head and 0-13 kg.cm⁻² scale). For each olive variety, 18 fruits for each harvesting date were measured (six fruits for each repetition).

Enzyme assay

Enzyme extraction. A modified method of Olías et al. ¹⁶ was used. For pectin methylesterase extraction, fresh destoned olive fruits were homogenized in an Ultra-Turrax T-25 at 24000 rpm for 2 min with 20 mM of sodium phosphate buffer, pH = 7, containing 60 mM NaCl, 0.5M phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) and 20% hydrated polyvinylpyrrolidone (PVPP) with a fruit buffer ratio of 1:4. The homogenized fruit is vacuum-filtered through Miracloth filter and centrifuged at 20000 g for 20 min using High speed refrigerated bench top centrifuge SIGMA 3-30KS. The intermediate aqueous phase is the enzymatic extract. All operations were carried out at 4 °C. The protein concentration in the enzymatic extract was determined according

to the method of Bradford (1976)¹⁷ using a calibration curve made with bovine serum albumin (BSA).

Measurement of PME activity. The PME activity was determined by methanol production. The methanol content was estimated as the amount of formaldehyde produced from methanol by alcohol oxidase from *Pichia pastoris*, applying a modification of the method of Klavons and Bennett (1986)¹⁸. The absorbance was measured at 412 nm. A calibration curve, using methanol as a standard, was prepared ranging from 0 to 435 nmoles/mL of methanol. One unit of specific PME activity was defined as the amount of enzyme forming $1\text{Umol MeOH} \times \text{mg protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Total pectin content.

Pectic polysaccharides were extracted from alcohol insoluble solids (AIS) following the procedure previously described by Levi *et al.*¹⁹. The AIS were prepared by grinding 5 g of the sample in a polytron three times with 70% EtOH followed by two extractions with acetone. The AIS were dried at room temperature until constant weight.

Total pectin (TP) fraction of AIS was extracted using concentrated sulfuric acid as described by Ahmed and Labavitch²⁰. Aliquots of the pectic digestion were assayed for galacturonic acid quantification using m-hydroxydiphenyl (MHDP) following the procedure used by Kinter and Van Buren²¹. Absorbance was measured at 520 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio, Spain). Results were expressed as milligram of galacturonic acid (GA) per 100 grams of AIS.

Methanol analysis in cell wall extracts

Sample of AIS were dispersed in water, vortexed for 1 min and sonicated for 10 min in a water bath. Saponification of the polysaccharides was processed with a modification of the method described by Waldron and Selvendran²². The polysaccharides were saponified with 2 mol/L NaOH for 1 h at 20 °C with occasionally shaking. The sample was neutralized by the addition of 2 mol/L HCl and allowed to equilibrate at 25°C in a water bath for 15 min. The resulting solution was filtered through a glass fiber filter.

The amount of released methanol was determined according to Klavons and Bennett (1986) ¹⁸ method. The absorbance of the blank sample was subtracted from the absorbance of each sample. Results were expressed as micromoles of methanol per gram of AIS (Umol MeOH/g AIS).

Determination of degree of esterification (% DE) of pectin

The DE of the olive pectin was determined by taking the ratio of moles of methoxyl groups to the moles of anhydrous galacturonic acid as previously described by Fertontaniet *al.*²³.

$$DE = \left[\frac{\frac{N_{MeOH}}{AIS}}{\frac{N_{GA}}{AIS}} \right] \times 100$$

Where N_{MeOH} is the number of moles of methanol, N_{GA} is the number of moles of galacturonic acid and AIS is the amount (g) of alcohol insoluble solids.

The degree of esterification was expressed as moles of methanol per 100 moles of GA (mol MeOH/100 mol GA).

β-elimination

β-elimination produces a double bond in a galacturonic residue when a pectin glycosidic bond is broken. To quantify the extent of β-elimination, the absorbance of diluted samples of pectic extracts at 235 nm was measured. The concentration of 4,5-unsaturated uronides (UU) was calculated using an extend coefficient of $5412 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ²⁴. Results were expressed as moles of unsaturated uronides per grams of AIS (mol UU/g AIS).

Data Analysis

Data were reported as mean value of three repetitions and standard deviation. ANOVA was performed to establish the effect of the cultivar and ripening stage on the different

analyzed parameters. Tukey's test was applied to establish differences between means, $p = 0.05$. Statistical analyses were performed with Statistix 9.0 software.

Pearson correlation analysis at 5% probability level was performed using the XLSTAT-PRO (2014.6) software.

RESULTS AND DISCUSSION

The link between the production of methanol, loss of fruit firmness and the activity of pectin methylesterase was examined during the course of ripening process of three olive cultivars: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'. In Fig. 1 can be observed the variation of PME activity in the fruits from the olive cultivars analysed.

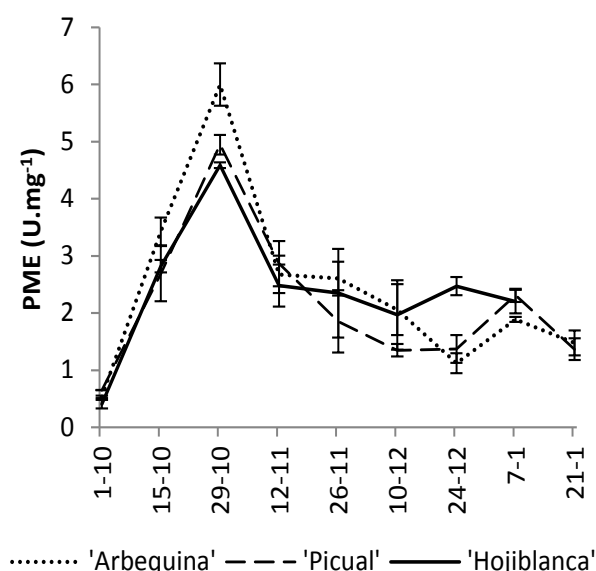


Fig. 1 Changes in pectin methylesterase (PME) activity during fruit ripening from the olive cultivars 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'.

Data are mean $\pm$ SD (n=3)

When ANOVA was performed, the harvest date was observed to be the main factor responsible for the variability of PME activity, although the cultivar and the interaction between the two above- mentioned factors showed significant influence as well (Table 2).

Table 2 Partial Mean Squares from Analysis of Variance for the effect of Cultivar and Harvest date on PME activity, total pectin (TP), methanol (MeOH), 4,5 unsaturated uronides content (4,5 UU), degree of esterification (DE) and fruit flesh firmness (FIR) from the olive cultivars 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'.

Parameter	DF ^a	Total	Cultivar	Harvest date	Cul × HD	Error
		80	2	8	16	54
PME	MS ^b		0.51	15.04	0.49	0.13
	SST ₀ ^c		0.75	88.39	5.80	5.05
	<i>p</i>		0.0239	0.0000	0.0001	
TP	MS ^b		980	24523	1428	39
	SST ₀ ^c		8.14	81.50	9.49	0.86
	<i>p</i>		0.0000	0.0000	0.000	
MeOH	MS ^b		143.83	702.53	25.40	2.78
	SST ₀ ^c		4.45	86.94	6.29	2.32
	<i>p</i>		0.0000	0.0000	0.0000	
4,5 UU	MS ^b		0.00369	0.02349	0.00252	0.0005
	SST ₀ ^c		2.67	67.97	14.60	14.76
	<i>p</i>		0.0112	0.0000	0.0005	
FIR	MS ^b		1.61	5.11	0.27	0.02
	SST ₀ ^c		6.52	82.51	8.66	2.31
	<i>p</i>		0.0000	0.0000	0.0000	
DE	SST ₀ ^c		38.52	82.65	4.02	0.80
	MS ^b		9.11	78.16	7.60	5.13
	<i>p</i>		0.0000	0.0000	0.0000	

^aDF, degree of freedom; ^bMS, mean squares; ^cSST₀, partial mean square for the effect expressed as percentage of the total corrected sum of square

The three cultivars exhibited similar pattern in the variation of enzyme activity. In general, very low PME activity was found in unripe fruits followed by a slight increase at the beginning of maturation and then, a fast increase was detected at the third harvest date (veraison stage). This raise was about 91% for 'Arbequina' and 'Hojiblanca' olive cultivars and 87% for 'Picual' olive cultivar. The highest PME activity (6 U.mg⁻¹) was recorded for 'Arbequina' olive cultivar whereas 'Hojiblanca' showed the lowest value (4.59 U.mg⁻¹). These differences in PME activity between cultivars were previously described for apricot ²⁵ and cherry ²⁶.

From the veraison stage, PME activity decreased markedly and then remained unchanged until the fruits reached their full maturity. The reductions for 'Picual' and

'Hojiblanca' olive cultivars were of 42% and 46% respectively, whereas 'Arbequina' showed a higher loss (55%). The increase of PME activity during veraison stage agreed with that previously described for non-climacteric fruits such as raspberry²⁷. In general, the de-esterification of pectin by PME may be considered as a prerequisite for ripening-associated changes in cell wall pectin substances²⁸ as described in our study since similar trends were observed in changes of PME activity and total pectin content (TP) during fruit ripeness (Figs. 1, 2A).

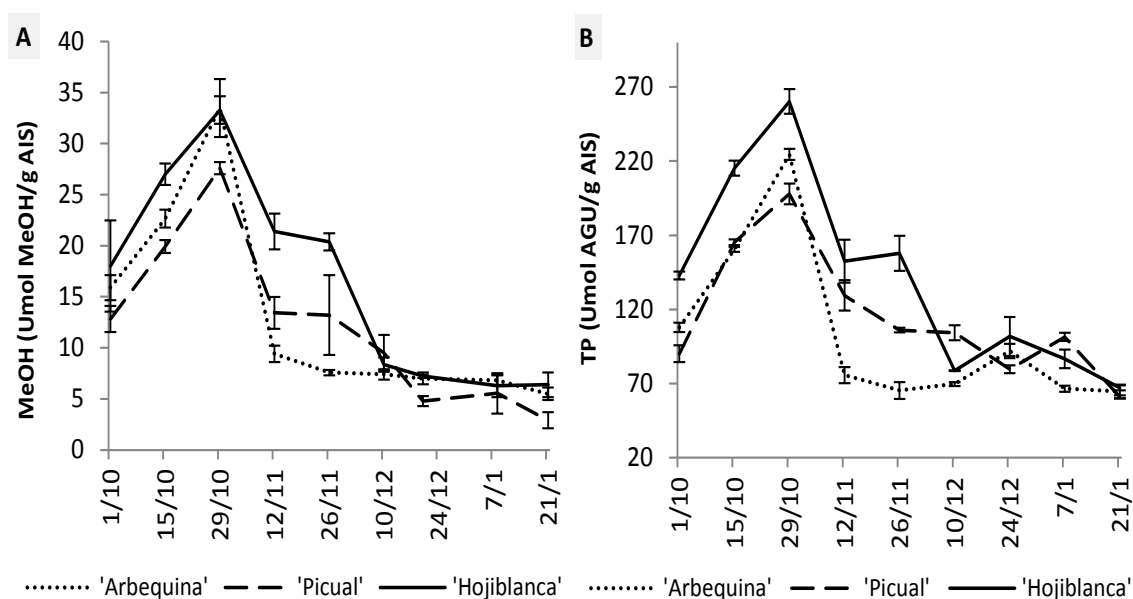


Fig. 2 Variation of total pectin (TP) and methanol (MeOH) content in fruits from 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars during ripening process.

Data are mean $\pm$ SD (n=3)

For non-climacteric fruits^{29, 30} was described as the maximum activity of PME during fruit maturation coincided with the concentration of methyl esters of the carboxylic groups. This trend was observed in our experiments since the highest PME activity was found for high esterification degree of the pectins (Fig. 3). Deuel and Stutz³¹ reported how the activation of PME requires highly esterified pectins. It catalyzes the de-esterification of galacturonosyl residues to generate methanol within the cell wall,

thus demethoxylation of pectins may be, at least in part, a metabolic origin of methanol¹⁶.

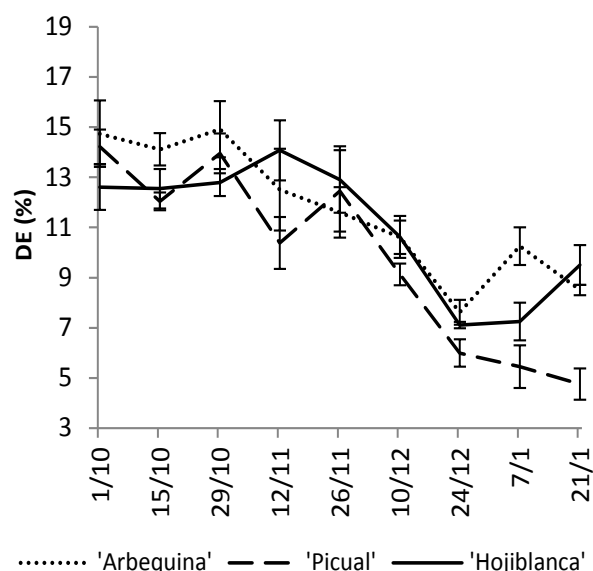


Fig. 3 Changes in the degree of esterification (DE) in fruits from 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars during ripening process.

Data are mean $\pm$ SD (n=3)

Total pectin (TP) and methanol contents were significantly affected by harvesting date (Table 2). Both parameters showed similar variation during fruit ripeness. Unripe fruits showed a basal level of total pectin and methanol that increased as maturation goes on. For both, maximum levels were reached at veraison stage, followed by a reduction and remaining stable until the full maturity as observed for PME activity (Figs. 2A, 2B).

Dependence between the induction of PME activity and the pectin concentration can be explained by the similar evolution of PME and TP. For the cultivars studied, the maximum PME activity was achieved at veraison stage. This may explain the high levels of methanol and pectic substances achieved at this ripening stage derived from pectin methyl esters by a PME-catalyzed reaction. The lower methanol amounts observed for immature fruits and fruits harvested between their purple color and black color stage compared with those at veraison stage may reflect the inaccessibility of cell

wall pectin methyl esters as substrate for PME at these maturation stages. According to Fischer and Bennett ³², the activity of several cell wall hydrolases, including polygalacturonase, (PG) reduces the availability of pectinic substrate for PME and therefore the production of methanol. Pearson's correlation showed a significantly ($p < 0.05$) high relationship (0.96) between total pectin and methanol content (Table 3) and between total pectin content and PME activity. These results support the hypothesis that methanol can be synthesized by a PME-catalysed reaction.

Table 3 Person's correlation coefficient between PME activity, fruit firmness and some cell wall components in fresh olive fruit

Variables	PME	MEOH	TP	4,5 UU	FIR
PME	1				
MEOH	0,687	1			
TP	0,692	0,962	1		
4,5 UU	0,674	0,718	0,715	1	
FIR	-0,028	0,588	0,508	0,267	1

Values in bold are different from 0 with a significance level $\alpha = 0.05$

Additionally, for all the studied cultivars the concentration of the unsaturated uronides, obtained from β -elimination, showed the same variation that PME activity, total pectin and methanol concentration (Fig. 4).

Significant correlations between unsaturated uronides and PME activity (0.67) and between the former, methanol and total pectin content (0.72) were observed (Table 3). Therefore, the degradation of pectin compounds may result from a synergic action between a non-enzymatic reaction through β -elimination producing unsaturated uronides and an enzymatic reaction governed by PME activity.

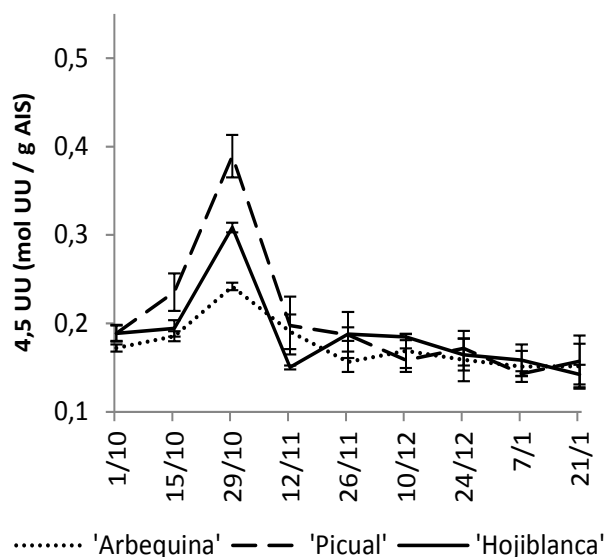


Fig. 4 Changes in 4,5-unsaturated uronides (4,5 UU) content in fruits from 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars during ripening.

Data are mean $\pm$ SD (n=3)

Several studies have reported the involvement of PME in the softening of many fruits during the maturation ³³. Taylor *et al.* ³⁴ established a correlation between plum texture and PME activity. In our study, a close association between the decrease observed in the fruit firmness, the degree of esterification (DE) and PME activity during fruit ripening was detected.

Olive firmness showed a progressive reduction during ripening being more important between the veraison and the black color stages (Fig. 5) as reported for guava ³⁵.

At the beginning of ripening process, 'Hojiblanca' olives showed the highest firmness whereas the lowest was found for 'Arbequina'. The reduction of firmness was faster for 'Picual' and 'Hojiblanca' fruits whereas a slower decrease was observed for 'Arbequina'. These important differences observed in the loss of fruit firmness between olive cultivars may result from differences in the patterns of cell wall disassembly and the reduction of cell to cell adhesion due to middle lamella dissolution ³⁶. Pearson's correlation revealed a moderate positive correlation between fruit firmness and total

pectin content (0.51) and between the former and methanol content (0.59) suggesting that PME-generated methanol may result from cell wall disassembly and contribute actively to the loss of fruit firmness during the course of ripening process.

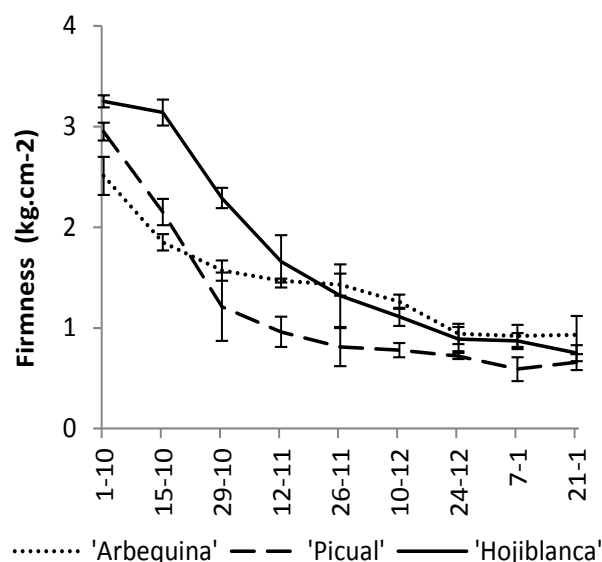


Fig. 5 Changes in fruit flesh firmness in fruits from 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars during ripening.

Data are mean $\pm$ SD (n=3)

According to Boeriu *et al.*³⁷ the chemical composition of pectins (i.e. degree of esterification) and the interaction with other cell wall polysaccharides and glycoproteins determine the firmness of the fresh and processed plant tissue. For all studied olive cultivars, an almost complete loss of fruit firmness for low PME activity was observed in ripen and over-ripen fruits. Therefore, several mechanisms operating independently or synergistically, but influenced by PME activity, may be responsible for this loss of tissue integrity at advanced ripening stages. It is likely that the continuous action of several cell wall hydrolases, including PG, on structurally altered cell walls results in the loss of fruit integrity at advanced ripening stages³². According to Buescher and Hobson³⁸, an increase in PG activity due to reduced bound Ca^{2+} levels may be partly responsible for the loss of tissue integrity.

Mínguez-Mosquera *et al.*¹⁴, studying the modifications caused by the endogenous pectinolytic activities in the pectic fraction of 'Hojiblanca' olive fruits, demonstrated that during ripening PME activity increased up to a maximum when anthocyanin synthesis in the fruit became marked (turning color stage). From then, PME activity decreased. When anthocyanin formation began, PG activity in the ripe-green fruit decreased abruptly and then increased, reaching a maximum in the ripe-black fruit. This could justify the reduction of texture and pectin contents of the olives during ripening. The same association between PME activity and loss of fruit firmness was reported in apple³⁹.

The degree of esterification (DE) did not follow the variation observed for PME activity. It decreased between the green and the black color stages (Fig. 3). The decrease of DE during fruit ripeness has largely been described in many others fruits. De-esterification is presumed to be primary the consequence of PME activity which removes the methyl ester groups from the C6 position on the galacturonosyl residues of pectic polysaccharide backbones⁴⁰. Furthermore, changes in the DE seem to be cultivar-dependent. At the beginning of ripening process, DE remained stable for four weeks for 'Arbequina' and 'Picual' olive cultivars and for 6 weeks for 'Hojiblanca', then decreased markedly and most of this decline occurred at the second half of December. From this harvesting date, DE decreased continuously for 'Picual' cultivar, whereas for 'Arbequina' and 'Hojiblanca' showed an increase. The slight increase in DE values observed for 'Arbequina' and 'Hojiblanca' olive cultivars may be explained by a loss of homogalacturonan fragments of low methylesterification from the cell wall or during sample preparation⁴¹. Working on grape berries, Barnavon *et al.*⁴² attributed the differences observed in the patterns of evolution of DE and PME activity to the presence of other PME isoforms and a precise regulation mechanism of the activity of these isoenzymes which could be expressed at specific stages of development.

The low DE values observed for those fruits of 'Picual' and 'Hojiblanca' cultivars harvested between the ripe green and the veraison stage (Fig. 3) could be responsible for the late activation of PME at and its lower activity compared with 'Arbequina'. Furthermore, the amount of unsaturated uronides in the pectin solution was much

higher in 'Picual' olive cultivar harvested between the ripe green and the veraison stage (Fig. 4). Because the activation of the endogenous PME is generally carried out at lower DE, the pectin breakdown in 'Picual' olive fruits seems to be mainly due to a non-enzymatic degradation through a β -elimination reaction, and, to a lesser extent by an enzymatic degradation causing lower DE and therefore lower PME activity (Fig. 1). The low extent of non-enzymatic degradation (Fig. 4) and the high PME activity (Fig. 1) observed for fruits of 'Arbequina' cultivar harvested at their veraison stage compared with the other cultivars indicate that the degradation of the pectic substrates for its fruits is mainly due to PME- catalyzed reaction. Besides, the lower enzymatic and non-enzymatic activity observed for 'Hojiblanca' olive fruits may partially explain their higher firmness compared with that observed for fruits of 'Arbequina' and 'Picual' cultivars (Fig. 5).

Therefore, during olive fruit ripening, PME activity may change varying the firmness of the fruit. Olive PME activity was found to be low at early fruit developmental stages and increases during the veraison stage, contributing to the fruit softening. Thus PME activity and its influence on fruit firmness affect to the rheological behavior of the olive paste during the industrial process of olive oil extraction. According to Clodoveo *et al.*⁴³, three main factors are crucial in establishing the final quality of VOO when harvesting the fruits: the harvesting time, the harvesting methods, and the post harvesting storage. Olive fruit texture may have a great influence on its behavior during transport and processing. The soft texture of olive fruits render them susceptible to mechanical wounds during processing. When the outer skin of olive fruit is damaged, fungi and bacteria can enter, leading to a rapid decay and increased water loss from the damaged area causing a gradual disintegration of the cell wall structure. The rate of respiration may also increase resulting in a rise in temperature in the transport containers or in the storage hoppers. All these alterations can affect the quality of the oil producing oils with high acidity, low stability⁴⁴, low polyphenols content and off-flavors⁴³. Therefore, these data indicate that depending on the cultivar characteristics, the knowledge of the PME activity and related pectin concentration may be considered

as an efficient tool to establish the optimal picking date in order to preserve the fruit integrity and then, the quality of the VOO.

CONCLUSION

In this study we provide evidence that methanol production in olive fruit is regulated by PME. For all studied cultivars, fruit ripening was accompanied by an increase in the abundance of PME activity reaching a maximum at veraison stage followed by a marked decrease and remained unchanged until the end of fruit ripeness. The same trend was observed in total pectin, methanol and unsaturated uronides contents. The close correlation between PME activity and levels of methanol and pectin in the primary cell wall indicates that PME is the primary biosynthetic pathway of methanol production in olive fruit and that demethoxylation of pectins is, at least in part, a metabolic origin of this component. Results also suggests that during ripening process degradation of cell wall pectic polysaccharides is, *inter alia*, the result of a synergistic action between a non-enzymatic reaction through a β -elimination mechanism resulting in the formation of unsaturated uronides and an enzymatic reaction mainly governed by PME activity giving methanol and others pectic compounds. Furthermore, it was found that PME seems to be involved in changes of the degree of esterification (DE) and loss of fruit firmness which showed a progressive decrease during ripening process and most of this decline occurred when the highest activity of PME was detected.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a MAEC-AECID grant (Cultural and Scientific Relations Office of the Spanish Agency for International Cooperation) and the research Projects FEDER P10-AGR-6099 (Junta de Andalucía) and PP.AVA.AVA201601.12 co-financed at 80% by FEDER Programa Operativo de Andalucía 2014-2020.

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Boskou D, Characteristics of the olive tree and olive fruit, in: *Olive oil Chemistry and Technology* (Second Edition). Ed. by Boskou D. AOCS Press, Champaign, Illinois, pp 13-21 (2006).
- 2 Bianco L, Alagna F, Baldoni L, Finnie C, Svensson B, Perrotta and Proteome G, Regulation during Oleaeuropaea fruit development. *PLOS ONE* **8(1)**: 553-563 (2013).
- 3 Huber DJ, The role of cell wall hydrolase in fruit softening. *Hort Rev* **5**: 169-219 (1983).
- 4 Brownleader MD, Jackson P, Mobasheri A, Pantelides T, Sumar S, Trevan M and Dey PM, Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr* **39**: 149–164 (1999).
- 5 Marín-Rodríguez MC, Orchard J and Seymour GB, Pectate-lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot* **53**: 2115–2119 (2002).
- 6 Be Miller JN and Kumari GV, β -elimination in uronic acids: evidence for an ElcB mechanism. *Carbohydr Res* **25**: 419-428 (1972).
- 7 Kiss J, β -eliminative degradation of carbohydrates containing uronic acid residues. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **29**: 229-303 (1974).
- 8 Lazan H and Ali ZM, Cell wall hydrolases and their potential in the manipulation of ripening of tropical fruits. *Asean Food J* **8**: 47–5 (1993).
- 9 Gaffe J, Tieman D M and Handa AK, Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. Effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene. *Plant Physiol* **105**: 199-203 (1994).
- 10 Noat G, Crasnier M and Ricard J, Ionic control of acid phosphatase activity in plant cell wall. *Plant Cell Environ* **3**: 225-229 (1980).

- 11 Goldberg R, Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Physiol Plantarum* **61**(1): 58-63 (1984).
- 12 Harriman RW, Tieman DM and Handa AK, Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, non-ripening and never ripe tomato fruits. *Plant Physiol* **97**: 80-87 (1991).
- 13 Frenkel C, Peters JS, Tieman DM and Tiznado, MF, Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *J Biol Chem* **273**: 4293-4295 (1998).
- 14 Mínguez-Mosquera I, Gallardo-Guerrero L and Roca M, Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling. *J Am Oil Chem Soc* **79**: 93-99 (2002).
- 15 Uceda M and Frias L, Harvest dates. Harvest dates: evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality, in *Proceedings of Segundo Seminario Internacional*, Cordoba (1975).
- 16 Olías JM, Pérez AG, Ríos JJ and Sanz LC, Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *J Agric Food Chem* **41**: 2368-2373 (1993).
- 17 Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254 (1976).
- 18 Klavons, JA and Bennett RD, Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J Agric Food Chem* **34**: 597-599 (1986).
- 19 Levi A, Ben-Shalom N, Plat D and Raid DS, Effect of Blanching and Drying on Pectin Constituents and Related Characteristics of Dehydrated Peaches. *J Food Sci* **53**: 1187–1190 (1988).

- 20 Ahmed AER and Labavitch JM, A simplified method for accurate determination of cell wall bromide content. *J Food Biochem* **1**: 361 (1977).
- 21 Kinter PK and Van Buren JP, Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxyphenyl method. *J Food Sci* **47**: 756 (1982).
- 22 Waldron KW and Selvendran RR, Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiol Plantarum* **80**: 568–575 (1990).
- 23 Fertonani HCR, Scabio A, Canterischemin MH, Carneiro EBB, Nogueira A and Wosiacki G, Influence of acid concentration on extraction and quality of apple pomace pectin. *Semin Ciênc Agrár* **27(4)**: 599-612 (2006).
- 24 Krall SM and McFeeters RF, Pectin hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *J Agric Food Chem* **46(4)**: 1311-1315 (1998).
- 25 Abaci ZT and Asma BM, Changes in some enzymatic parameters of six cultivars during ripening. *Anadolu J Agr Sci* **29(3)**:174-178 (2014).
- 26 Barrett DB and Gonzalez C, Activity of softening enzymes during cherry maturation. *J Food Sci* **59(3)**: 574-577 (1994).
- 27 Iannetta PPM, Van den Berg J, Wheatley RE, Mc Nicol RJ and Davies HV, The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubusidaeus*) fruit ripening. *Physiol Plantarum* **105**: 338–347 (1999).
- 28 El Rayah A and LABAVITCH JM, Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit. *Plant Physiol* **65**: 1014-1016 (1980).
- 29 Supriyadi M, Suzuki M, Wu S, Tomita N, Fujita A and Watanabe N, Biogenesis of Volatile Methyl Esters in Snake Fruit (*Salaccaedulis*, Reinw) cv. Pondoh. *Bio Sci Biotechnol Biochem* **67 (6)**: 1267–1271 (2003).

- 30 Perez AG, Rios JJ and Olías JM, Aroma components and free amino acids in strawberry variety chandler during ripening. *J Agric Food Chem* **40**: 2232-2235 (1992).
- 31 Deuel H and Stutz E, Pectic substance and pectic enzymes. *Adv Enzymol* **20**: 341-382 (1958).
- 32 Fischer RL and Bennett AB, Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 675-703 (1991).
- 33 Yao BN, Tano K, Konan HK, Bédié GK, Oulé MK, Nevry RK and Arul J, The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carcica papaya* L. var solo 8. *J Food Sci Technol* **51(11)**: 3309-3316 (2014).
- 34 Taylor MA, Rabe E, Dodd MC and Jacobs G, Effect of storage regimes on pectolytic enzymes, pectic substances, internal conductivity and gel breakdown in cold storage 'Songold'. *Plums Ibid* **69**: 527-534.
- 35 Bashir HA and Abu-Goukh AA, Compositional changes during ripening of guava fruit. *Food Chem* **80(4)**: 557-563 (2003).
- 36 Brummell DA and Harpster MH, Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**: 311–340 (2001).
- 37 Boeriu CG, Stolle-Smith T and Van Dijk C, Characterization of cell wall pectins by near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spec* **6**: 299–301 (1998).
- 38 Buescher RW and Hobson GE, Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruit tissue by polygalacturonase. *J Food Biochem* **6**: 147-160 (1982).
- 39 Segonne SM, Bruneau M, Celton JM, Le Gall S, Allami MF, Juchaux M, Laurens F, De Orsel M and Renou JP, Multiscale investigation of mealiness in apple: an atypical role for a pectin methylesterase during fruit maturation. *BMC Plant Biol* **14**: 375 (2014).

- 40 Steele NM, McCann MC and Roberts K, Pectin modification in cell-walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. *Plant Physiol* **114**: 373–381 (1997).
- 41 Brummell DA, Dal Cin V, Crisosto CH and Labavitch JM, Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J Exp Bot* **55**: 2029–2039 (2004).
- 42 Barnavon L, Doco T, Terrier N, Ageorges A, Romieu C and Pellerin P, Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochem* **58**: 693–701 (2001).
- 43 Colodoveo ML, Hachicha R, Kotti F, Scarascia M and Gargouri M, Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities. *Comp Rev Food Sci Food Safety* **13**: 135-154 (2014).
- 44 García JM, Gutiérrez F, Castellano JM, Perdiguero S, Morilla A and Albi MA, Influence of storage temperature on fruit ripening and olive oil quality. *J Agric Food Chem* **44**: 264-267 (1996).

SECCIÓN III

ASOCIACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS PÉCTICOS DE LA PARED CELULAR Y LA EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TEXTURALES Y REOLÓGICAS DE LA PULPA, DURANTE LA MADURACIÓN DE TRES VARIEDADES DE ACEITUNA: 'ARBEQUINA', 'PICUAL' Y 'HOJIBLANCA'. INFLUENCIA SOBRE EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

CAPÍTULO 5

Pectic cell wall polysaccharides and oil content modulate the rheological behavior of the olive fruit pulp during ripening process

Authors: Abir Sadkaoui¹, Cassandre Leverrier³, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gérard Cuvelier³ and Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía, Mengíbar, Jaén, Spain.

²Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

³UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France.

Food Hydrocolloids

Submitted (under revision): November 14, 2016

Pectic cell wall polysaccharides and oil Content modulate the rheological behavior of the olive fruit pulp during ripening process

ABSTRACT

This work was initiated to establish the effect of fruit ripeness on pectic cell wall composition as well as the rheological behavior of the olive pulp paste of three of the major olive (*Olea europaea* L) cultivars in Spain: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'. *The* rheological measurements were carried out using a stress-controlled rheometer with a six-blade vane geometry.

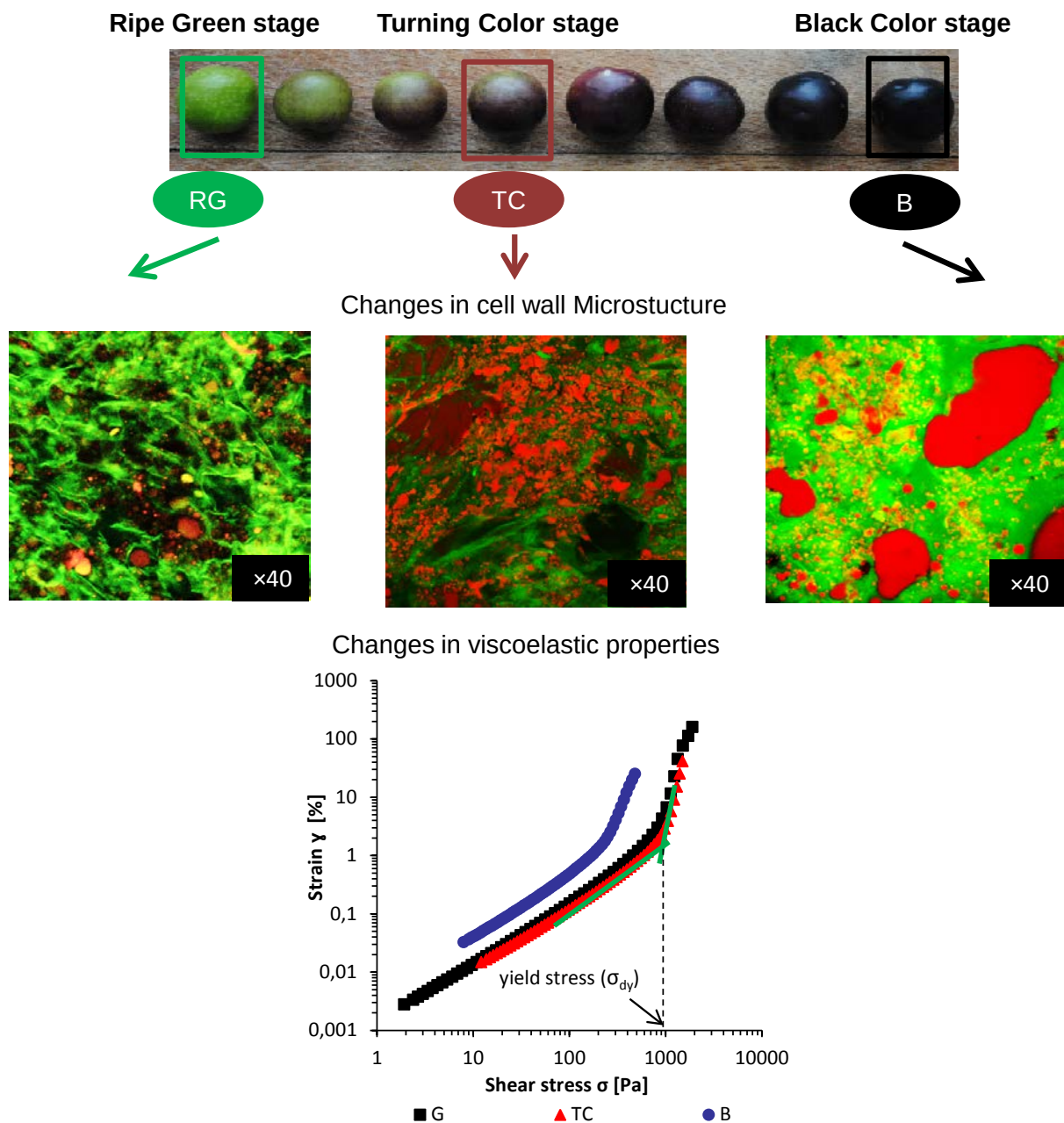
Results revealed that for all cultivars, olive pulp pastes showed a solid-like behavior under a yield stress (viscoplastic behavior), typical of concentrated suspensions, which evolved markedly as ripening progressed. A large decrease of the dynamic modulus and yield stress is observed with ripening for the three cultivars showing that their structures were not affected in the same way. The partial solubilization of pectic polysaccharides within the cell wall matrix prominently affects the mechanical behavior of the fruit by causing an intensive softening and loss of cell wall elasticity and cohesion and consequently facilitating the release of the mesocarpic oil from the cell wall of the fruit.

Keywords: olive pulp paste / pectic polysaccharides / rheological behavior / dynamic modulus / yield tress

Chemical compounds studied in this article

Hydroxyacetone (PubChem CID: 8299); Ethanol (PubChem CID: 702); Tris (Hydroxymethyl)aminomethane (PubChem CID: 6503); Chloridric acid (PubChem CID: 28153); Ethylenediaminetetraacetic (PubChem CID: 6049); Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798); Sulfuric acid (PubChem CID: 1118); Polygalacturonic acid (PubChem CID: 445929); m-Hydroxydiphenyl (PubChem CID: 11381); Tetraborate decahydrate (PubChem CID: 57357412).

Graphical Abstract:



Changes in cell wall microstructure and viscoplastic properties of three olives cultivars 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' harvested at different stages of ripening.

1. INTRODUCTION

The olive fruit is a very important crop in Spain, particularly in Andalucía, where olives provide the basis for two important industries: olive oil and table olive production (Jiménez *et al.*, 2001). The study of olive fruit shows a great interest because of its influence on the quality of the fruit as well as on the oil yield due to cell wall components during VOO extraction process (Fernández-Díez, 1979).

The structure of the cell wall material and how it is disintegrated and swollen during fruit ripening is of key importance to control the rheological behavior of the olive paste during kneading as it supports the turgor pressure due to its elasticity and mechanical resistance (Jarvis, 2011). These characteristics are, *inter alia*, due to the chemical composition and functional properties (rheological performance, hydration properties) of the pectic polymers that constitute the cell walls (Leverrier, Almeida, Espinosa-Muñoz, & Cuvelier, 2016; Toivonen & Brummell, 2008). Several works have already been carried out in order to characterize the pectic cell wall polysaccharides from fresh olives, among them Coimbra, Waldron, & Selvendran (1994) reported changes in the composition and solubility of these compounds during maturation that play a major role in olive texture (Mafra *et al.*, 2001). Recently, Sadkaoui, Jiménez, Pacheco, & Beltrán, (2015, 2016) found as high pectin content in the olive paste contribute to the formation of oil-in-water emulsions affecting markedly its rheological behavior and lowering the oil yield. Therefore, the knowledge of the rheological behavior of this material is crucial for oil yield assessment and calculations in engineering processes, such as: flow calculation. It is also essential for the design, sizing and selection of proper equipment for the olive oil industry, such as settling and centrifugation devices, including pumps, pipes, filtration systems, etc (Gila, Jiménez, Beltrán & Romero., 2015).

One of the rheological parameter of great interest for VOO extraction process is the yield stress which means the stress that must be exerted simply to move one fluid layer past another (Charm, 1962). The most common method used to determine the yield stress of food suspensions is by extrapolating the stress-strain rate flow curve to zero strain rate through the use of an appropriate model (Tattersall, 1976) such as Casson,

Herschel-Bulkley and Mizrahi-Berk models (Qiu & Rao, 1988). The most widely used model for flow of a viscoelastic material is Bingham's linear approximation (Barnes, Hutton, & Walter, 1989). Although the simplicity of the Bingham model is attractive, the stress–strain rate relationship of concentrated suspensions, such as olive paste from unripe fruits, is highly pseudoplastic and only approximates linearity at very high shear rates (Saak, 2000). Besides, the yield stress value estimated from flow curves depends on the estimation equation model (Canet, Alvarez, Fernández, & Luna, 2005); consequently, it is interpreted as a model parameter. Therefore, it makes more sense to determine the actual yield stress value which is a physical property of the olive pulp paste itself determined by mean of oscillatory strain sweeps (Hoffmann & Rauscher, 1993). Furthermore, this dynamic rheological measurement may be useful for oil yield control during extraction process. However, as can be ascertained, there is a lack of knowledge about the effect of the fruit maturity stage on the degradation of the cell wall polysaccharides which considerably affects the textural and rheological properties of olive paste during malaxation step.

In this work has been studied the contribution of primary cell wall pectic polysaccharides degradation to the dynamic rheological properties of the olive paste of three of the major olive cultivars cultivated in Spain: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

The study was carried out for the crop year 2013/2014. Olive trees of three olive cultivars 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' were selected by their crop load homogeneity. Twelve trees for each olive cultivar were pooled into three groups of four trees. The trees were spaced 7 × 7 m and grown in the experimental orchard of IFAPA Venta Del Llano in Mengibar, Jaén, Spain, under irrigation and traditional techniques.

2.2. Olive Samples

Two kilograms of olives were collected from each pool of trees of each olive cultivar. Sampling was carried out every two weeks at three harvest dates from mid-October until mid-January. Fruit ripening index was measured according to the method proposed by the Estación de Olivicultura y Elaiotecnía (Uceda & Frías, 1975). The fruit sampling dates and ripening index are shown in Table 1.

Table 1 Harvest dates and fruit ripening stages for the three olive cultivars studied

	14/10/2013	13/12/2013	13/01/2014
Cultivar	RG	TC	B
'Arbequina'	0.69	2.45	4.99
'Picual'	0.08	2.22	6.59
'Hojiblanca'	0.05	1.88	4.72

RG: Ripe Green stage; TC: Turning Color stage; B: Black color stage

2.3. Process industrial yield

The process industrial yield (IY) was defined as the percentage of oil obtained using the Abencor laboratory oil extraction system (Abengoa, Seville) from 700 to 800 g of olives paste. The volume of olive oil was measured on graduated cylinder and the oil yield was calculated using the olive oil density of 0.915 kg/L Eq. (1). Results were expressed as percent.

$$IY = \left[\frac{(OV \times 0.915)}{WOP} \right] \times 100 \text{ Eq. (1)}$$

Where OV is the volume of olive oil obtained from the Abencor system (L), and WOP is the weight of olive fruit paste used (kg).

2.4. Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) TCS SP2 (Leica, Germany), equipped with UV-vis sources and a motorized focal plane with a (×40) objective was used to visualize the dispersed particles by colouring the cell wall materials and oil drops. The

microscope had three lasers: two helium/neon lasers, used at excitation wavelengths of 633 and 543 nm respectively, and one argon laser used at an excitation wavelength of 488 nm. Images were taken at the three stages of olive fruit ripening: ripe green stage (RG), turning color stage (TC) and Black color stage (B). A two-step labelling process was performed using solution of Red Congo (Sigma Aldrich) and Bodipy 665/676 (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA) to label cell wall and fat phases, respectively. Samples were diluted 20 times with distilled water and they were stained with 40 μL of congo red dye (10g/L) and 2 μL of 2.5 mg mL⁻¹ of Bodipy in dimethylformamide (DMF) at 20°C for 3 h. The stained samples were placed on glass slides covered with the cover slips and finally sealed with self-adhesive layer (0.25 mm thick). Cell wall materials are represented in Green; fat content are represented in red; and finally, a superimposition of the two images where the co-localized fat-cell / wall material areas appeared in yellow. Images shown in the present study are superimpositions and were considered by the authors to be representative of the three replicates.

2.5. Firmness

Olive firmness (kg.cm⁻²) was measured at middle region of each fruit subjected to axial puncture by making three perforations with a penetration probe (a Bertuzzi FT-327 model with a 0.5 cm⁻² head and 0-13 kg.cm⁻² scale) in each fruit. For each olive variety, 18 fruits from each maturity stage were measured (six fruits for each repetition).

2.6. Olive paste analysis

2.6.1. Extraction of Alcohol-Insoluble Solids

Alcohol insoluble solids (AIS) were prepared following the procedure previously described by Levi, Ben-Shalom, Plat & Raid (1988). 5 g of destoned olive sample (pulp) was grinded in a polytron three times with 70% EtOH followed by two extractions with acetone (Figure 1). The AIS were dried at room temperature until constant weight. AIS content was expressed as percent on a fresh matter basis.

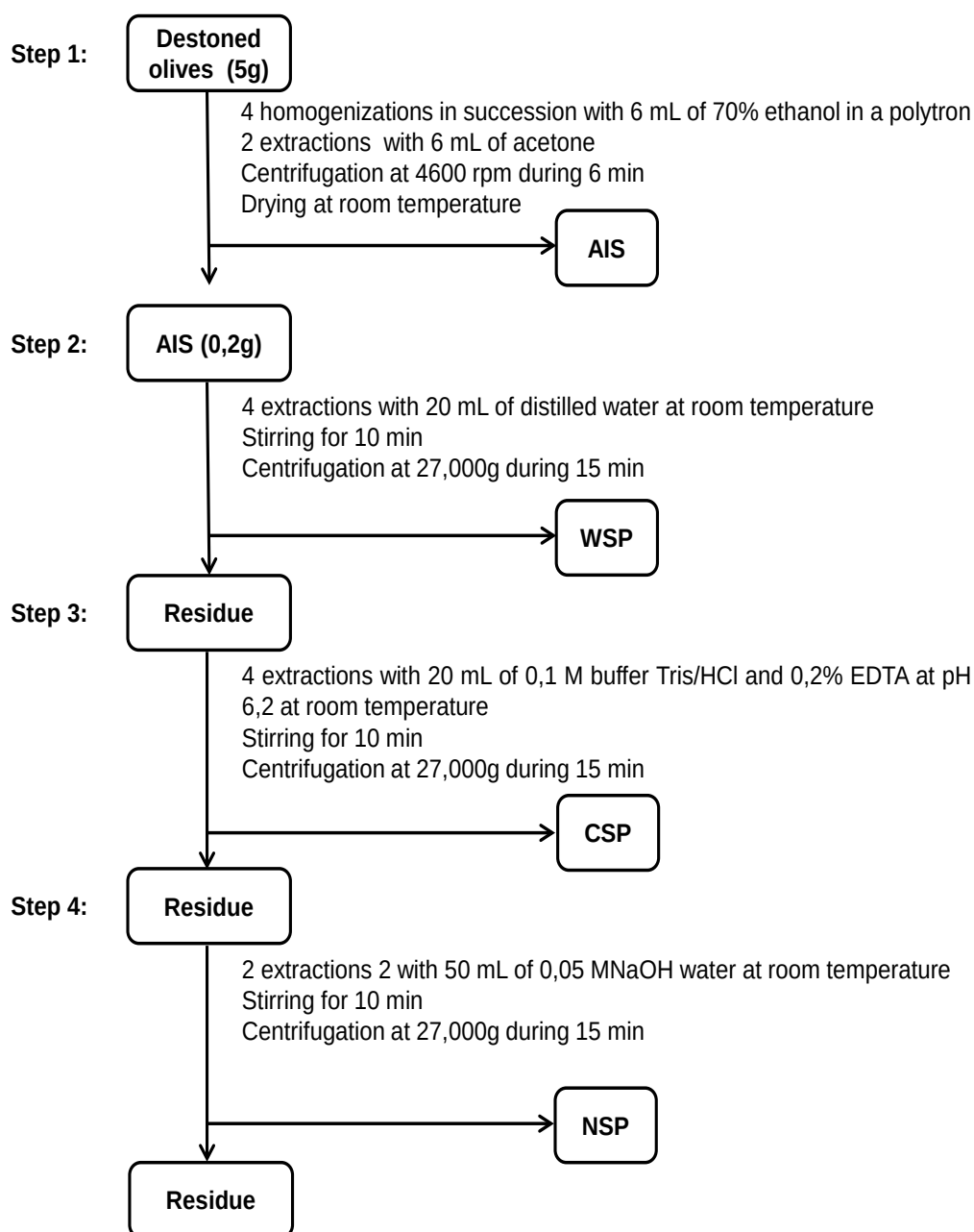


Fig. 1 Flow charts of the procedures for extraction of alcohol insoluble solids and fractionation of the cell wall pectic polysaccharides of the olive fruit

AIS: alcohol insoluble solid; WSP: water-soluble pectin; CSP: chelate-soluble pectin; NSP: non-soluble pectin

2.6.2. Fractionation of pectic polysaccharides

Fractions of different cell wall components were obtained by sequential chemical extraction of the cell wall material (AIS) using water (to extract water-soluble pectin, WSP), 0.1 M buffer Tris/HCl and 0.2% EDTA (to extract ionically bound pectins or chelate-soluble pectin, CSP) and 0.05 M NaOH (to obtain covalently bound pectins or non-soluble pectin, NSP) as described previously by Levi, Ben-Shalom, Plat & Raid (1988) (Figure 1). Total pectin content was obtained summing the three pectic fractions.

2.6.3. Galacturonic acid analysis

Pectin fractions, extracted as described above, were analyzed for galacturonic acid (GA) content using m-hydroxydiphenyl (MHDP) following the procedure used by Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) and modified by Kinter & Van Buren (1982). Absorbance was measured at 520 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio, Spain). Results were expressed as milligram of GA per 100 grams of AIS.

2.7. Rheological measurements

Rheological measurements were carried out using a thermostatically Peltier controlled MCR301 (Anton Paar, Austria). All the samples were analysed at a fixed temperature of 20°C.

Oscillatory tests of olive pulp paste were carried out using a six-blade vane geometry, with an inner radius of 11 mm and a height of 16 mm. The outer stationary cup had an outer radius of 13.92 mm giving a gap of 2.92 mm.

Oscillatory stress sweep tests were performed at an angular frequency of 2 Hz in order to determine the linear viscoelastic domain. Figure 2 shows the corresponding changes in strain with stress amplitude in log scale. All pulp paste samples showed essentially the same rheological behavior, an increasing strain with an increase in shear stress until the observation of a marked increase in the deformation marking the onset of the flow.

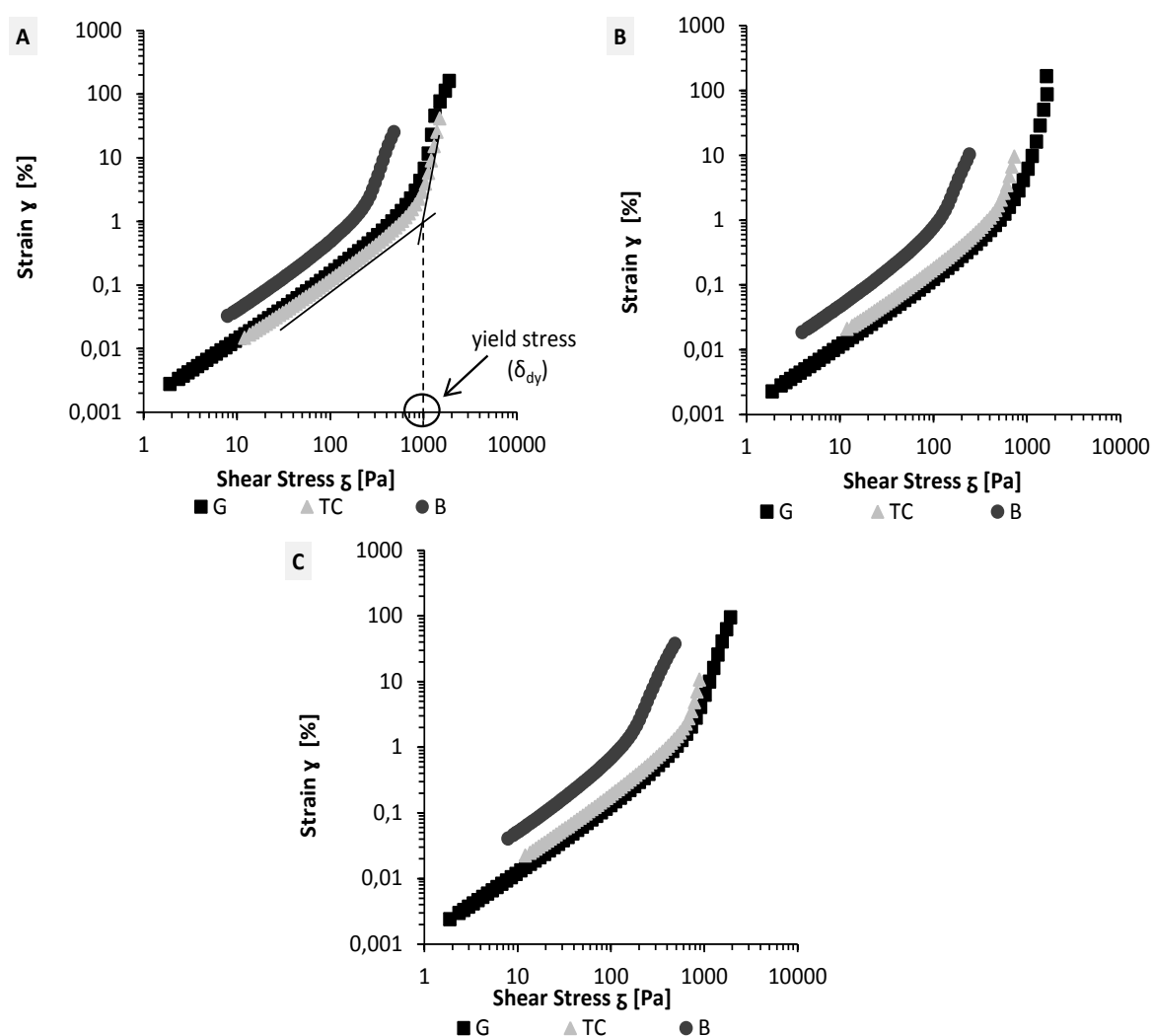


Fig. 2 Strain-stress amplitude curves (logarithmic scales) in oscillatory measurements for olive pulp pastes made from fruits of ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’ olive cultivars harvested at different stages of ripening

(A) “Arbequina”; (B) “Picual”, (C): “Hojiblanca”; RG: Ripe Green stage; TC: Turning Color stage; B: Black color stage

The dynamic yield stress (σ_{dy}) was estimated as the intersection of tangents of two segments of the strain-shear stress curve.

Frequency sweep measurements were performed within the linear viscoelastic region, in the range of 0.5-100 Hz. G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) values were taken at 2 Hz. The damping factor ($\tan \delta$) which measures the relative importance of viscous to elastic contributions for a material at a given frequency was also determined

at the same frequency (2 Hz) as the ratio between the loss and the storage moduli (Eq.2):

$$\tan (\delta)=\frac{G''}{G'}(2)$$

To provide a good repeatability, each treatment was replicated three times. Only the mean values were used to build the curves.

2.8. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed. When a significant F value was found, Turkey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3. RESULTS

3.1. Changes in fruit firmness and cell wall components

As can be observed in Table 2, there was a linear decline in AIS throughout fruit ripening for all cultivars.

This reduction was faster between the ripe green and the turning color stage. According to Ben-Arie & Lisle (1979) the progressive reduction of AIS with advancing fruit ripening reflected in part the loss in pectic substances indicating that large alcohol-insoluble polymers are degraded to alcohol-soluble polymers (El-Zoghbi, 1994) and starch to soluble sugars (Selvaraj & Pal 1989).

Regarding pectic substances (Table 2), for all cultivars there were clear differences in pectin fraction between fruits harvested at their earlier ripeness stage and those harvested at their turning color and black color stages. For 'Arbequina' and 'Picual' cultivars, total pectin content showed a decrease during the ripening period. The same trend was observed for 'Hojiblanca' cultivar remaining constant for the last ripening stage.

Table 2 Changes in pectic components and the process industrial yield of olive fruit during ripening process

Parameter	Cultivar	14/10/2013	13/12/2013	13/01/2014
AIS	Arbequina	29.80±0.10aA	26.97±0.83bA	23.09±0.34cA
	Picual	24.69±0.17aB	22.19±0.17bB	20.36±0.14cB
	Hojiblanca	22.04±0.49aC	20.47±0.21bC	19.56±0.32cC
WSP	Arbequina	356±35bA	479±29aA	512±34aB
	Picual	328±15bA	339±17bB	463±49aB
	Hojiblanca	311±37bA	329±16bB	573±31aA
CSP	Arbequina	241±19bB	318±19aC	340±46aB
	Picual	372±13aA	421±29aB	416±59bC
	Hojiblanca	335±20bA	525±30aA	539±37aA
NSP	Arbequina	947±42aB	399±51bA	326±29bA
	Picual	1011±38aB	477±37bA	271±2cA
	Hojiblanca	1267±35aA	463±57bA	319±24cA
TP	Arbequina	1544±46aC	1196±40bB	1178±29bB
	Picual	1712±55aB	1238±22bAB	1150±28bB
	Hojiblanca	1913±50aA	1316±55bA	1431±86bA
IY	Arbequina	7.99±0.63cA	11.63±0.32bB	13.70±0.14aB
	Picual	5.83±0.09bB	14.42±0.24aA	14.61±0.34aA
	Hojiblanca	3.51±0.08cC	7.93±1.8aC	7.28±0.11bC

AIS: alcohol insoluble solid; WSP: water-soluble pectin; CSP: chelate-soluble pectin; NSP: non-soluble pectin; TP: total pectin; IY: process industrial yield; Values within a common lowercase letter are significantly different ($p < 0.05$) with respect to picking date for each cultivar independently; Values within a column lacking a common uppercase letter are significantly different ($p < 0.05$) with respect to cultivar for each crop year independently.

NSP, the most abundant polysaccharide fraction found at the ripe green stage, progressively decreased during ripeness whereas the soluble pectin fractions (WSP and CSP) increased gradually. Furthermore, for the three studied cultivars, correlation between AIS and TP were found (Figure 3) suggesting that TP reduction corresponded to the decline observed for AIS. This result obviously indicates the importance of pectin solubility in relation to the mechanism of reconversion of the different pectin fractions during fruit ripeness as reported by Pressey, Hinton, & Avants (1971).

Differences in the changing pattern of pectic substances might be at least in part due to different activities of pectic enzymes between the three cultivars, principally PME and PG (Benkova & Markovic 1976).

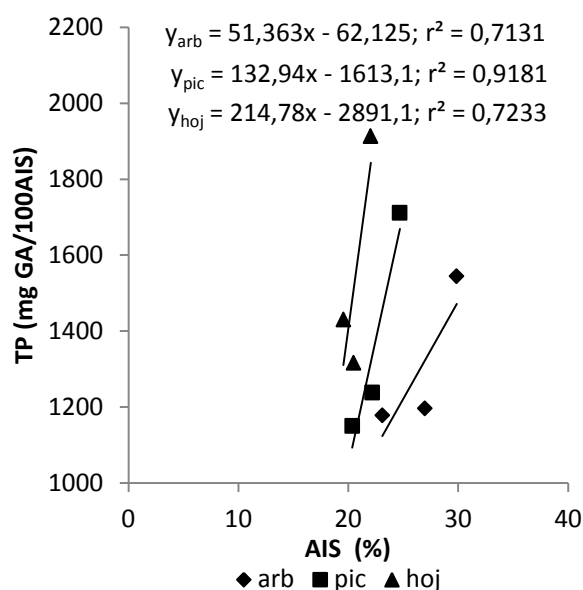


Fig. 3 Correlation between alcohol insoluble solids and total pectin content during ripening process

Process oil yield (IY) increased linearly as fruit ripening progressed as reported by Rotondi & Magli (2004); nonetheless, a slight decrease was observed for mature fruits of 'Hojiblanca' cultivar.

Fruit firmness during ripening is shown in Figure 4. In general firmness decreased as fruit ripeness went on as reported for many other fleshy fruits such as mango (Jha *et al.*, 2013) and cherry (Fils-Lycon & Buret, 1990).

In general, 'Hojiblanca' fruits showed the highest firmness whereas 'Picual' olives were softer at least for the last ripening stages. Differences in the reduction of firmness were observed for the cultivars studied. 'Arbequina' olives did not show any change in fruit firmness between the ripe green and the turning color stages, although a significant reduction was observed for mature fruits (black color stage). For 'Picual' cultivar, the highest softening was observed between the ripe green and the turning color stage achieving a firmness loss close to 60%; then fruit firmness showed a slight decrease for the last ripening stage. 'Hojiblanca' fruits were the firmest at earlier ripeness, then a decrease of about 50% was observed for fruits harvested at their turning color stage.

For the last ripening stage, a reduction of 50% was observed again. Therefore, the fruit softening pattern observed was different for each cultivar.

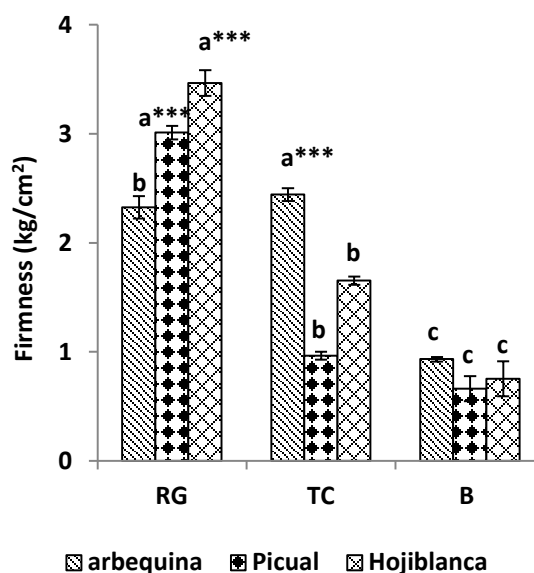


Fig. 4 Changes during ripening process in flesh firmness of fruits from the olive cultivars ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’

Data are mean $\pm$ SD for three sets of observations; RG: Ripe green stage; TC: Turning color stage; B: Black color stage; Different letters for each olive cultivar means significant differences at p , 0.05 between the different ripening stages

Changes in AIS and pectic fractions coincided with a softening reflected in a marked firmness decrease (Figure 4) then a substantial change in the cell wall material was observed. This finding is comparable to results found for apples by Wiley & Worthington (1961) who attributed the softening to a decrease in total AIS and changes in components of AIS, mainly pectins and possibly other substances. Based on observations from other species, a correlation between cell wall swelling and pectin solubilisation has been also established in kiwifruit (Redgwell *et al.*, 1997; Redgwell & Percy, 1992).

During ripening, progressive disruption of the cell wall material was observed. Based on visual observations and confocal micrographs (discussed later), a hypothetical simplified evolution of the analysed samples is illustrated in Figure 5.

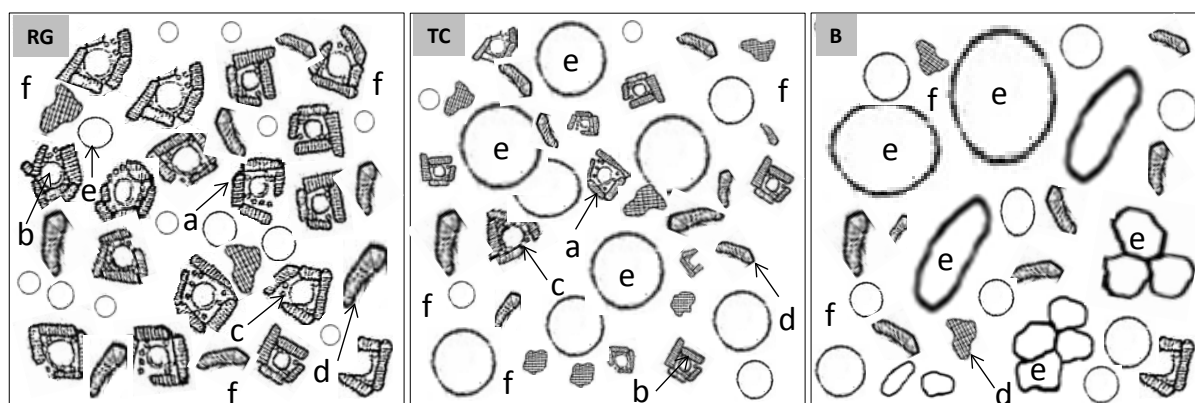


Fig. 5 Schematic representation of olive pulp paste structure during ripening process

a: Fibrous reticular framework of the pseudo-colloidal pulp; b: Small droplets of cellular oil; c: Proportions of occluded vegetation water between the framework and the oil droplets; d: Proportion of lipophilic laminar pulp; e: Big free oil droplets; f: Aqueous phase of free olive vegetation water; RG: Ripe green stage; TC: Turning color stage; B: Black color stage

Samples made from fruits harvested at their ripe green stage are basically composed by large portions of lipophilic laminar and large fragments of pulp with occluded small droplets of oil and vegetation water (Figure 5). As ripening progresses, the physical and chemical characteristics of these systems are highly modified. One of the most important changes was the increase of the cell oil globules and portions of occluded vegetation water from the interior of the cell wall. Besides, the pulp fragments become smaller and the oily globules, together with the vegetation water are incorporated to the free oily must.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) was performed in order to extract more accurate information about the main changes affecting the pulp pastes during the ripening period. As can be seen in Figure 6, pulp tissues for all olive cultivars showed the parenchyma of the green fruits quite compact with small air-filled intercellular spaces which became larger as ripening progressed as a result of a decrease in cell–cell adhesion (Harker & Suthrland., 1993).

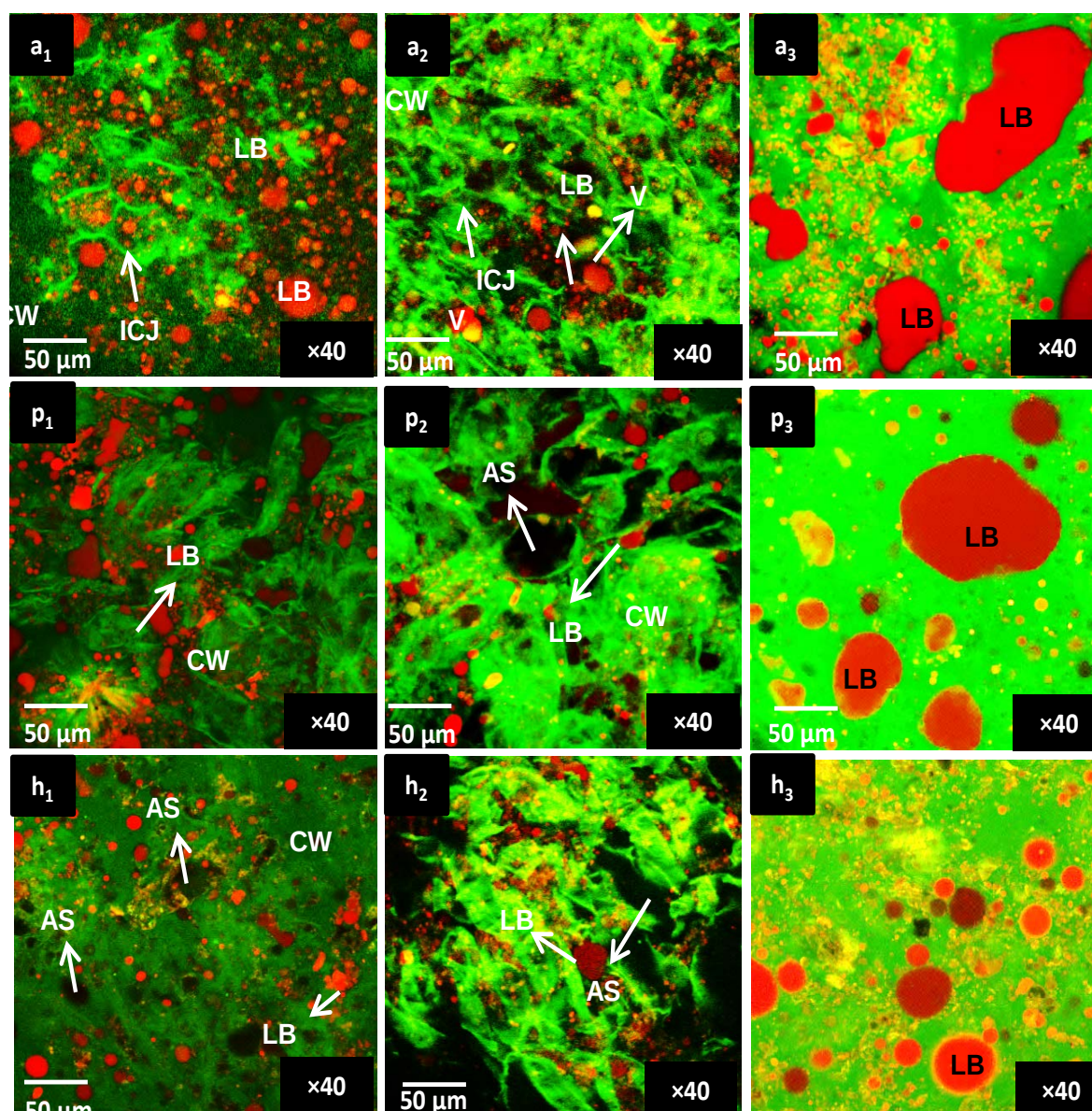


Fig. 6 CLSM micrographs (40×) from olive pulp paste of ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’ olive cultivars during ripening process

Pictures are three-dimensional projections from 60–65 sections; a “Arbequina”; p “Picual”, h: “Hojiblanca”; 1: Ripe green stage; 2: Turning color stage; 3: Black color stage; AS: Air Spaces; CW: Cell Wall; ICJ: Intercellular Junctions; LB: Lipid Body; V: Vacuole

The cells of ‘Arbequina’ tissues (Figure 6a₁) were larger compared to those of ‘Picual’ (Figure 6p₁) and ‘Hojiblanca’ (Figure 6h₁) tissues. Also, closer contacts between the cells of ‘Hojiblanca’ tissues were observed with tighter intercellular spaces (or pores)

while there was more spaces between the cells of 'Arbequina' and 'Picual' tissues. As ripening progressed, these systems differed drastically in their shape and size. The cellular morphology appeared more degraded and the size of the cell lipid bodies and the vacuoles was increased. The air-filled intercellular spaces became larger as a result of a decrease in cell–cell adhesion (Harker & Suthrland., 1993). The cells grow and the cell wall thickness decreases, being the main factors to cause losses in the mechanical properties of the cell wall materials (Gonçalves et al., 2005). Our results are in agreement with those of Mafra et al. (2001) who using a Scanning Electronic Microscopy (SEM) found that during ripening, a progressive disruption of the middle lamella parenchyma cells was observed.

3.2. Association between cell wall degradation and pulp paste rheological properties

Figure 2 reports strain-stress curves showing the location of the yield stress when a linear increase in the stress was applied to the olive pulp paste samples during the course of ripening process. For all cultivars, as the shear stress amplitude increased the strain increased until a critical value recorded as yield stress (σ_{dy}). Therefore, olive pulp pastes showed a solid-like behavior under a yield stress (viscoplastic behavior), typical of concentrated suspensions as previously report by Di Renzo & Colleli (1997).

Besides, it was observed as this viscoplastic behavior evolved markedly as ripeness progressed. For pulp pastes from 'Hojiblanca' and 'Picual' cultivars, the dynamic yield stress (σ_{dy}) gradually decreased during ripeness, whereas for 'Arbequina' cultivar, it was higher at veraison stage than at green and black color stages⁶ (Figure 7). This behavior indicated that olive pulp pastes from mature fruits are more structured and viscous than those made from unripe fruits which are more elastic.

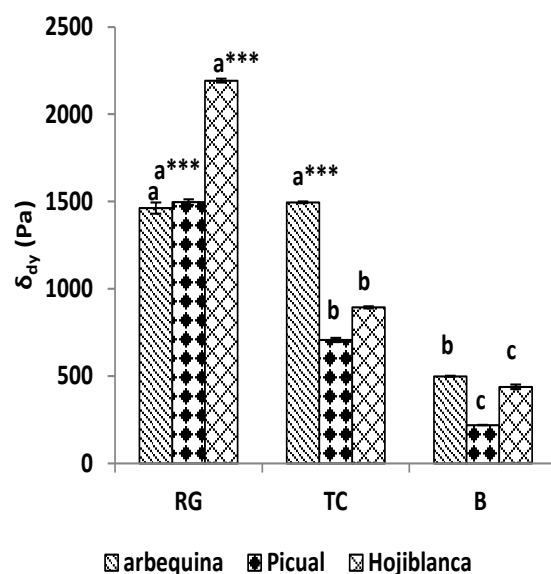


Fig. 7 Changes in the dynamic yield stress (σ_{dy}) of olive pulp pastes made from fruits of 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars harvested at different stages of ripening

Data are mean $\pm$ SD for three sets of observations; RG: Ripe green stage; TC: Turning color stage; B: Black color stage; Different letters for each olive cultivar means significant differences at $p, 0.05$ between the different ripening stages

Dynamic frequency sweep tests were performed in the linear viscoelastic range to determine the frequency dependence of the elastic and viscous moduli. Figure 8 illustrates the mechanical spectra of olives pastes from the olive cultivars studied throughout fruit ripeness

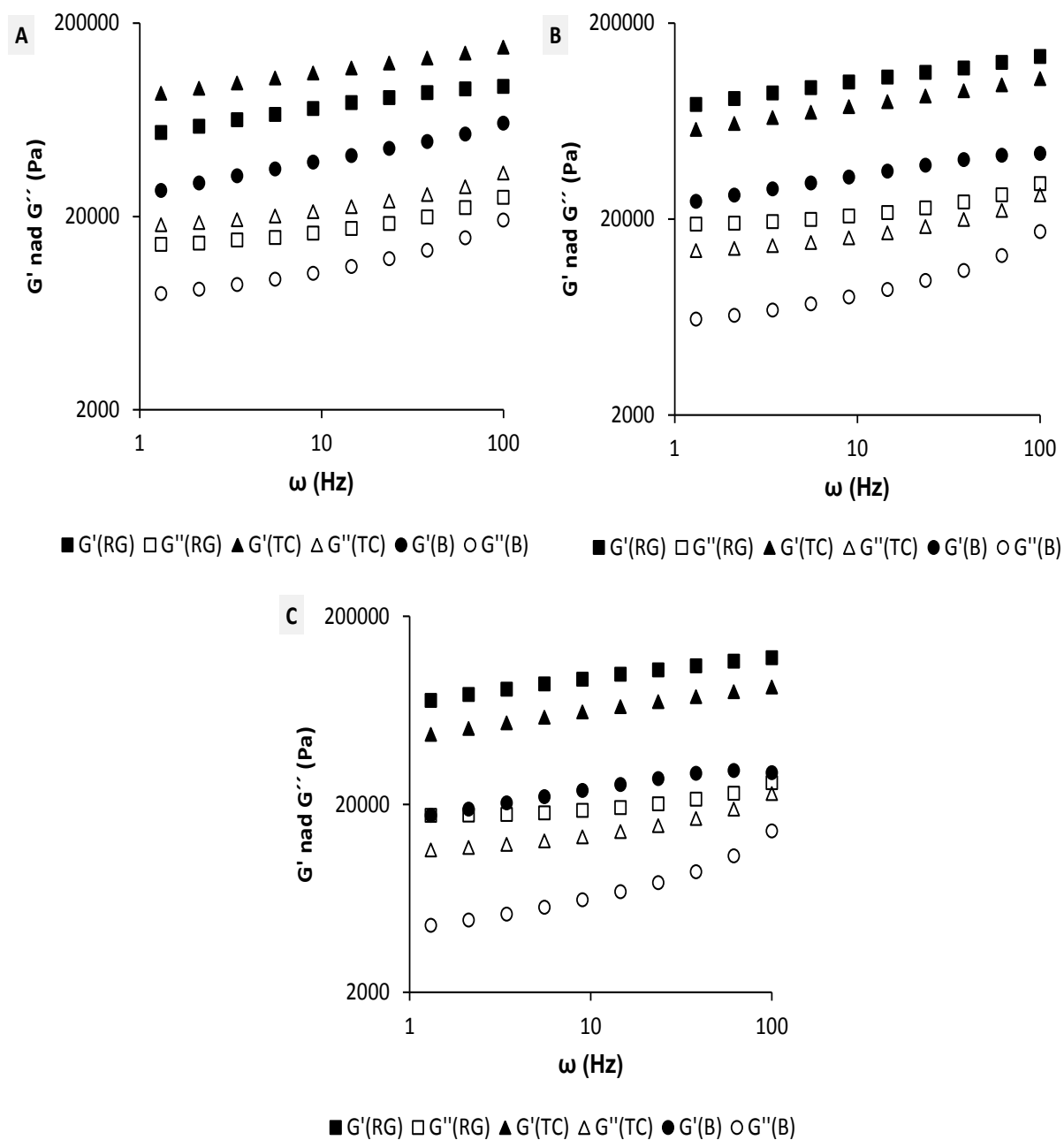


Fig. 8 Changes in linear viscoelastic functions (Elastic modulus G' (filled symbols) and loss modulus G'' (empty symbol)) versus frequency (ω) of olive pulp pastes made from fruits of ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’ olives cultivars harvested at different stages of ripening

(A) “Arbequina”; (B) “Picual”, (C): “Hojiblanca”; RG: Ripe green stage; TC: Turning color stage; B: Black color stage

For all cultivars, G' was substantially higher than G'' in the range of frequency studied. Both moduli increased with frequency indicating that olive pulp pastes corresponded to structured viscoelastic products with soft-solid-like behavior presenting a yield stress typical of concentrated suspensions. Therefore, the attractive forces become dominant due to the strong hydrogen bond and hydrophobic association (Basu, Shivhare, Singh, & Beniwal, 2011). This behavior was similar to that found for other fruits and vegetables pastes (Massa, Gonzalez, Maestro, Labanda, & Ibarz, 2010). Furthermore, a well-developed plateau region in the mechanical spectra, characterized by a low dependence of G' with frequency and a minimum in G'' , was found for olive cultivars studied throughout the different ripening stages.

Figure 9 shows the values of G' and G'' and the damping factor ($\tan\delta$) for a frequency of 2 Hz as a function of ripening stages.

For 'Picual' and 'Hojiblanca' pastes, the magnitudes of both moduli significantly decreased as ripening progressed (Figures 9A, 9B). This moduli reduction indicates that the internal cell wall matrix of the pulp paste became less structured, less elastic and more viscous as a result of a decline in the consistency of the suspension. Nonetheless, for 'Arbequina' olive pulp paste, a marked increase of G' and G'' was observed at the turning color stage probably as a metabolic response of the fruit to the gelling temperature occurred at this stage of ripening and which caused an increase in the dehydration process and affected markedly the mechanical properties of the processed olive pulp pastes.

$\tan\delta$ indicates the relative importance of both viscous and elastic behaviors of materials, whereby $\tan\delta < 1$ exhibits more elastic behavior and may behave like solid, while $\tan\delta > 1$ exhibits more viscous behavior and behaves more like liquid (Fateme, 2006). Results indicated as the range of $\tan\delta$ was < 1 , and then, all olive pastes behaved like a solid. Furthermore for all cultivars, 'olive pulp pastes made from fruits harvested at their ripe green stage were found to have a significantly lower $\tan\delta$ values than those pulp pastes from fruits harvested at their black color stage.

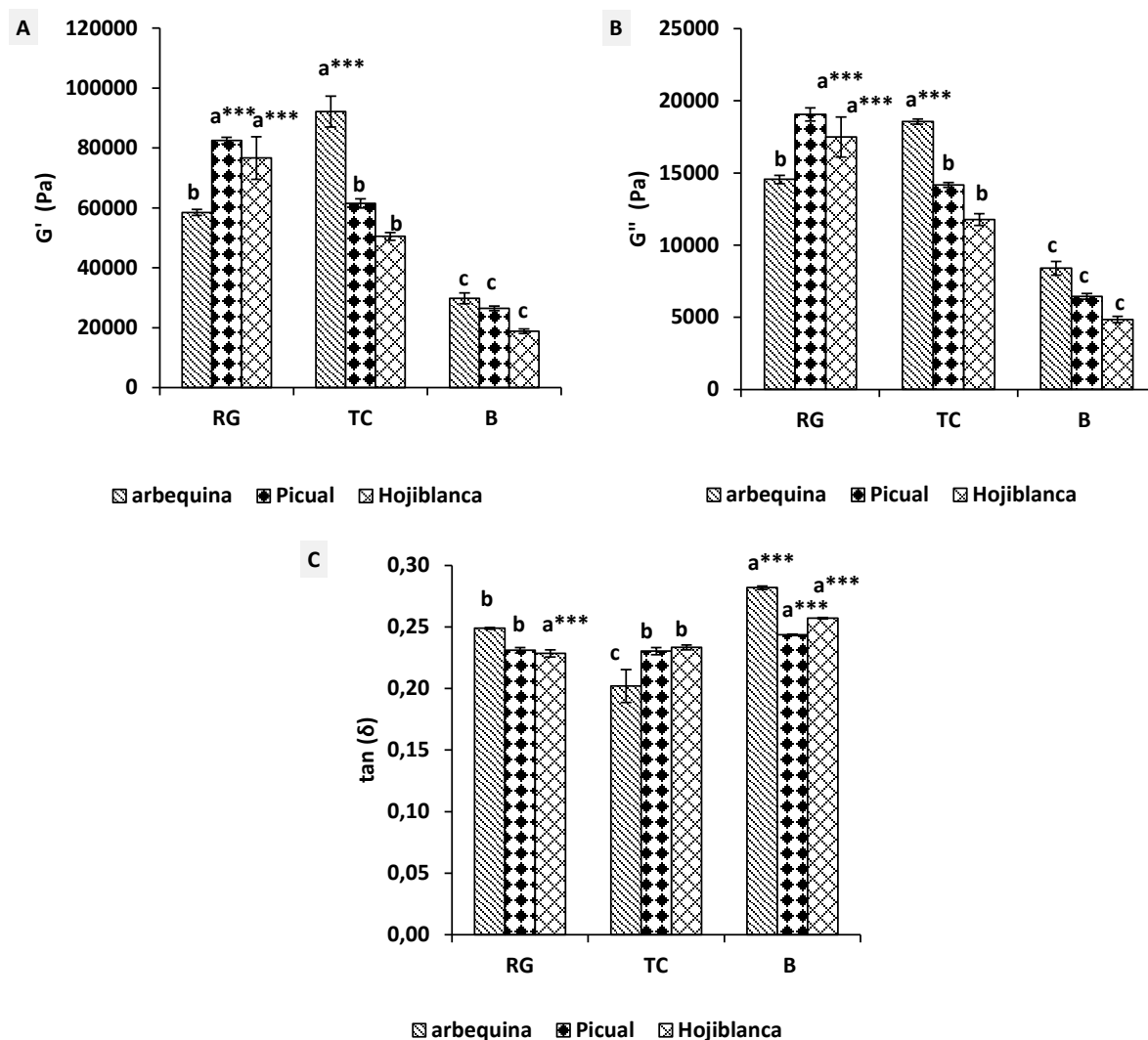


Fig. 9 Changes in some rheological parameters of olive pulp pastes made from fruits of 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' olive cultivars harvested at different stages of ripening

Data are mean $\pm$ SD for three sets of observations; (A): G' : Elastic Modulus; (B): G'' : Loss Modulus; (C): Damping factor; RG: Ripe green stage; TC: Turning color stage; B: Black color stage; Different letters for each olive cultivar means significant differences at p , 0.05 between the different ripening stages

Many researchers agreed that the fruit firmness has a close relationship with its mechanical and rheological properties (Afkari Sayyeh, 2003; Davi, Banks, Jeffery, & Studman (1996). In order to highlight the close relationship between the loss of fruit firmness and the rheological changes during ripening process, correlation between

elastic modulus (G') decrease and fruit firmness (FIR) decrease was carried out. As can be observed in Figure 10, G' and FIR showed highly significant correlation. Our results confirmed those of Kojima, Fujita, & Tanaka (2004) who associated the fruit softening of pears to changes in elastic modulus (G') as a result of the weakening of intercellular bonds/cell walls and/or loss of turgor.

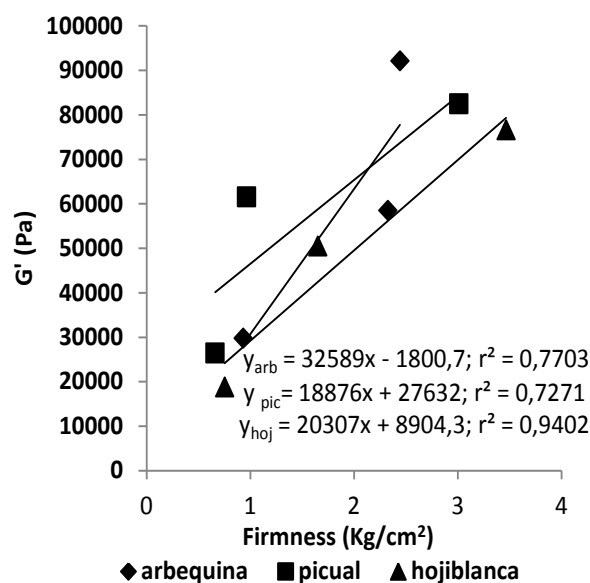


Fig. 10 Correlation between G' and fruit firmness during ripening process

Furthermore, it was observed that for all cultivars the loss of the cell wall integrity was accompanied by an increased concentration of oil (Table 2). Therefore, the sizable alterations of the rheological properties of the olive pulp paste during ripening may be the result of a coordinated interaction between several cumulative factors as the pectic composition and the oil content.

4. CONCLUSION

The main purpose of this research was to study the involvement of pectic cell wall degradation on the alteration of the rheological properties of olive pulp pastes made from olive fruits harvested at different stages of ripening. Results revealed that the structure and the extent of solubilisation of pectic cell wall polysaccharides govern the rheological and textural properties of the olive fruit including, among others, firmness,

elasticity and viscosity. For all cultivars, hard unripe olive fruits are rich in pectin, having firmer tissue and the fruit pulp is more structured and rigid. As ripening progressed, pectin is partially solubilized within the cell wall matrix and a decrease in cell-cell adhesion and cell thickness were observed. It produced a weakness and disruption of the cell wall and middle lamella structures leading to a marked softening of the olive fruit and a decrease of the viscoelastic properties. Furthermore, the gradual increase of the oily fraction also contributed actively to the changes in the viscoelastic properties of the olive pulp paste since olive oil behaves as soft-filler that produces a softer system as oil increases throughout ripeness.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a MAEC-AECID grant (Cultural and Scientific Relations Office of the Spanish Agency for international Cooperation) and the research-project: FEDER AGR-6699 (Junta de Andalucía).

The authors declare no conflicts of interest.

5. REFERENCES

Afkari Sayyah, A. H. (2003). Rheological Properties of Wheat Grain and its Relation to Flour Quality. Ph. D. Thesis, University of Tabiat Modares, Tehran, Iran.

Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walter, K. (1989). An Introduction to Rheology, Elsevier Science, Amsterdam.

Basu, S., Shivhare, U.S., Singh, T.V., & Beniwal, V.V. (2011). Rheological, textural and spectral characteristics of sorbitol substituted mango jam. *Journal of Food Engineering*, 105, 503–512.

Ben-Arie, R., & Lislev, N. (1979). Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiology*. 64, 197-202.

Benkova, L.R., & Markovic, D. (1976). Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 33, 323-385.

Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New methods for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochemistry*, 54, 484-489.

Canet, W., Alvarez, M.D., Fernández, C., & Luna, P. (2005). Comparisons of methods for measuring yield stresses in potato puree: effect of temperature and freezing. *Journal of Food Engineering*, 68, 143-153.

Charm, S.E. (1962). The nature of role of fluid consistency in food engineering applications. *Advances in Food Research*, 11, 356-435.

Coimbra, M. A., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1994). Isolation and characterization of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europea* L.). *Carbohydrate Research*, 252, 245-262.

Davie, I., Banks, N. H., Jeffery, P. B., & Studman, C.J. (1996). Nondestructive measurement of kiwifruit firmness. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24, 151-157.

Di Renzo, G.C., & Colelli, G. (1997). Flow behavior of olive paste. *Applied Engineering in Agriculture*, 13(6), 751-755.

El Zoghbi, M. (1994). Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food chemistry*, 49 (1), 33-37.

Fateme, R. (2006). Development of Short Carbon Fibre Reinforced Polypropylene Composites for Car Bonnet. Thesis, Universiti Putra Malaysia.

Fernández-Diez, M. J. (1979). Texture of table olives and pimentos. *Journal of Texture Studies*, 10, 103-116.

Fils-Lycaon, B., & Buret, M. (1990). Loss of firmness and changes in pectic fractions during ripening and over-ripening of sweet cherry. *Hortscience*, 25(7), 777-778.

Gila, A., Jiménez, A., Beltrán, G., & Romero, A. (2015). Correlation between fatty acid composition of virgin olive oil with thermal and physical properties. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 366-376.

Gonçalves, E. M., Brazao, R., Pinheiro, J., Abreu, M., Silva, C.L.M., Moldao-et al. (2005). Influence of maturity stage on texture, pectin composition and microstructure of pumpkin. In: MERCOSUR congress on process systems engineering, 4, 2005, Rio de Janeiro. Anais: Empromer, 1 CD-ROM.

Harker, F.R., & Suthrland, P.W. (1993). Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines. *Postharvest Biology and Technology*, 9 (4), 269–277.

Hoffmann, H., & Rauscher, A. (1993). Aggregating systems with a yield value. *Colloid & Polymer Science*, 271, 390-395.

Jarvis, M. C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids*, 25, 257–262.

Jha, S.R., Jaiswal, P., Narsaiah, K., Kaur, P.P., Singh, A.K., & Kumar, R. (2013). Textural properties of mango cultivars during ripening. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1047-1057.

Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., & Heredia, A. (2001). Olive fruit cell wall degradation of cellulosic and hemicellulosic polysaccharides during ripening. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 49(4), 2008-2013.

Kinter, P.K., & Van Buren, J.P. (1982). Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxyphenyl method. *Journal of Food Science*, 47, 756-759.

Kojima, T., Fujita, S., & Tanaka, M. (2004). Plant compounds and fruit texture: the case of pear. In *Texture in food, volume 2: solids foods*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 259-263.

Leverrier, C., Almeida, G., Espinosa-Muñoz, L., & Cuvelier, G. (2016). Influence of particle size and concentration on rheological behaviour of reconstituted apple purees. *Food Biophysics*, 11, 235-247.

Levi, A., Ben-Shalom, N., Plat, D., & Raid, D.S. (1988). Effect of blanching and drying on pectin constituents and related characteristics of dehydrated peaches. *Journal of Food Science*, 53, 1187–1190.

Mafra, I., Lanza, B., Reis, A., Marsilio, V., Compestre, C., & De Angelis, M. (2001). Effect of ripening on texture, microtexture and cell-wall polysaccharides composition of olive fruit (*Olea europea*). *Physiologia plantarum*, 111, 439-447. **Massa, A., Gonzalez, C., Maestro, A., Labanda, J., & Ibarz, A. (2010).** Rheological characterization of peach purees. *Journal of Texture Studies*, 41 (4), 532–548.

Pressey, R., Hinton, D.M., & Avants, J.K. (1971). Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *Journal of Food Science*, 36, 1070-1073.

Qiu, C.G., & Rao, M.A. (1988). Role of pulp content and particle size in yield stress of apple sauce. *Journal of Food Science*, 53, 1165-1170.

Redgwell, R. J., MacRae, E., Hallett, I., Fisher, M., Perry, J., & Harker, R. (1997). In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*, 203, 162-173.

Redgwell, R. J., & Percy, A. E. (1992). Cell wall changes during on-vine softening of kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 20, 453-456.

Rotondi, A., & Magli, M. (2004). Ripening of olives var. Correggiolo: Modification of oxidative stability of oils during fruit ripening and oil storage. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2, 193-199.

Saak, A.W. (2000). Characterization and modeling of the rheology of cement paste: with applications toward self-flowing materials. PhD Thesis, Northwestern University.

Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., & Beltrán, G. (2015). Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 545-552.

Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., & Beltrán, G. (2016). Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during 'Hojiblanca' Virgin Olive Oil Extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, doi: 10.1002/ejlt.201600039.

Selvaraj Y., & Pal DK. (1989). Studies on the aroma biogenesis pattern in relation to changes in the physicochemical and biochemical constituents during ripening in fruits of five mango cultivars. Second international symposium on mango, Bangalore, India, 20-24 May, 1985. *Acta Horticulturae*, 231, 461-469.

Tattersall, G.H. (1976). Relationship between the British standard tests for workability and the two-point test. *Magazine of Concrete Research*, 28 (96), 143– 147.

Toivonen, P. M. A., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1–14.

Uceda, M., & Frias L. (1975). Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. Proc. Segundo Seminario Oleicola Internacional, Cordoba, 125–130.

Wiley, R.C., & Worthington, O.J. (1961). Factors influencing apple texture. *American Society for Horticultural Science*, 77, 60-72.

DISCUSIÓN GENERAL

Durante el proceso de maduración de la aceituna, los componentes de la pared celular experimentan notables variaciones estructurales que generan cambios en la textura del fruto generando su ablandamiento (Seymour y Gross, 1996). Una de las modificaciones más notorias está relacionada con la composición de las fracciones pécticas (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). Dado que las pectinas son polímeros naturales, formados por ácido galacturónico polimerizado y parcialmente esterificado con metanol, estas sustancias son sometidas a procesos de despolimerización principalmente controlados por la actividad de ciertas enzimas pectolíticas, que contribuyen al ablandamiento de los tejidos vegetales, y por tanto afecta a las características físicas de la aceituna. Estos cambios físicos en la pared celular del fruto facilitan la rotura de las estructuras celulares provocando la liberación del contenido vacuolar, en este caso del aceite de oliva virgen.

La pectinmetilesterasa (PME) es una de las enzimas pectolíticas implicadas en el ablandamiento de la aceituna durante el proceso de su maduración. Es por ello, que uno de los objetivos de la presente Tesis, ha sido estudiar la posible implicación de esta enzima de la pared celular, en los cambios asociados al proceso de despolimerización de las cadenas pécticas, que contribuyen al ablandamiento y a la pérdida de firmeza durante la maduración de la aceituna.

El estudio se realizó empleando aceitunas de tres variedades: 'Arbequina', 'Picual' y 'Hojiblanca' recolectadas desde el estado verde hasta el maduro.

Conforme avanza la maduración del fruto, los parámetros pomológicos (índice de madurez), texturales (firmeza y grado de esterificación), composicionales (contenido en aceite, pectinas, metanol y urónidos 4,5-insaturados) y bioquímicos relacionados con la actividad de la PME, tuvieron un elevado componente genético.

Las tres variedades exhibieron una variación similar de la actividad de la PME. Los frutos inmaduros muestran una actividad muy baja, que posteriormente aumenta casi linealmente y alcanza un nivel máximo en el estado de envero. De entre las variedades estudiadas, la actividad PME más elevada (6 U mg^{-1}) se observó en los frutos de la

variedad 'Arbequina', mientras que el de más baja se apreció en 'Hojiblanca'. El aumento de la actividad PME durante el envero, concuerda con la observada en otros frutos no climatéricos como la frambuesa (Iannetta *et al.*, 1999). A partir del envero, la actividad PME disminuyó notablemente estabilizándose hasta el final de la maduración. Esta reducción fue más acusada en los frutos de la variedad 'Arbequina'. Las diferencias observadas entre los cultivares, ha sido previamente descrita en otros frutos como albaricoque (Abaci y Asma, 2014) y cereza (Barrett y González, 1994). Los resultados indicaron que la desesterificación de las sustancias pécticas, por la acción de la PME, podría ser un paso previo a los cambios de maduración asociados a los polisacáridos pécticos de la pared celular (El Rayah y Labavitch, 1980).

El contenido de pectinas totales (PT), mostró una evolución similar a la actividad de la PME lo que indicaría una relación entre la inducción de la actividad de esta enzima y la concentración en pectinas, principalmente las metilesterificadas, que representan sus sustratos potenciales. Como se ha descrito anteriormente, la actividad óptima PME coincide con el estado envero lo que explicaría los altos niveles de metanol obtenidos en este estado de maduración del fruto. Los contenidos bajos de metanol observados en los frutos, recolectados entre el estado de envero y maduro, podrían atribuirse a la dificultad para acceder a los esteres metílicos de las pectinas por la PME. Según Fischer y Bennett (1991), la reducción de la disponibilidad de sustratos pectínicos para la actividad de la PME, está inducida por la producción de enzimas hidrolasas en la pared celular. En definitiva, las sustancias pécticas contribuyen significativamente a la actividad PME, confirmando así la hipótesis de que la biosíntesis de metanol está controlada por ésta, que cataliza la hidrólisis de los ésteres metílicos de los ácidos poligalacturónicos, liberando metanol al medio, y convirtiendo a las pectinas en ácidos pécticos.

Aunque no existe acuerdo sobre los mecanismos de degradación de las sustancias pécticas, se establece que la solubilización de estos compuestos, es el resultado de los efectos acumulativos de procesos: enzimáticos y no enzimáticos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, revelaron que para las tres variedades

estudiadas, los urónidos 4,5-insaturados obtenidos por β -eliminación mostraron la misma tendencia que la observada para la actividad de la PME, el contenido del metanol y de la PT. Este resultado sugiere que el proceso de degradación de los compuestos pécticos, podría resultar de una acción sinérgica entre una reacción no enzimática por β -eliminación (induciendo la formación de los urónidos insaturados) y una reacción enzimática, principalmente controlada por la PME, para la producción de metanol y otros compuestos pécticos.

La firmeza, mostró una disminución progresiva durante la maduración de las aceitunas. Una disminución marcada se produjo entre el estado envero y el estado de plena madurez, tal y como se ha descrito para otros frutos como la guayaba (Bashir y Abu-Gouth, 2003). Al comienzo de la maduración, la firmeza fue más elevada en la variedad 'Hojiblanca' mientras que los valores más bajos se obtuvieron en los frutos de la variedad 'Arbequina'. La pérdida de firmeza fue más rápida en las variedades 'Picual' y 'Hojiblanca' siendo más lenta en 'Arbequina'. La diferencia en firmeza observada entre las tres variedades estudiadas, podría atribuirse a la existencia de diferentes patrones de degradación de la pared celular entre las variedades (Pressey y Avants, 1978).

Según Boeriu *et al.* (1998), la composición química de las pectinas (grado de esterificación) y la interacción con los polisacáridos de la pared celular y las glicoproteínas, determinan la firmeza de los frutos. Una pérdida de firmeza, casi completa, fue observada en los frutos maduros para los que no se detectó actividad PME. Es probable que la acción continua de varias hidrolasas de la pared celular, incluyendo PG y PLs, sea el principal factor responsable de la degradación de las paredes celulares, induciendo de esta manera la pérdida de firmeza de los frutos en los estados avanzados de madurez (Fischer y Bennett, 1991).

Buescher y Hobson (1982) describieron que el aumento de la actividad de la PG como resultado de los bajos niveles de puentes cálcicos, puede ser, en parte, responsable de la pérdida de la integridad de los tejidos. Por tanto, la pérdida de firmeza de las aceitunas durante los estados avanzados de madurez, podría ser consecuencia de

varios mecanismos, operando de forma independiente o sinérgica, principalmente controlados por la actividad de la PME.

El grado de esterificación (GE) de las pectinas no siguió la evolución observada para la PME, disminuyendo entre el estado verde y el estado maduro. La disminución del GE ha sido previamente descrita en otros frutos. La desesterificación de las pectinas se debe principalmente a la actividad de la PME, que elimina los grupos de ésteres metílicos de la cadena principal de los polisacáridos pécticos (Steele *et al.*, 1997). Para las tres variedades estudiadas, este parámetro mostró un descenso a medida que progresa la maduración del fruto. Los valores más altos del GE fueron obtenidos en los frutos inmaduros para luego disminuir cuando alcanzaron su estado envero.

En la uva (Barnavon *et al.* 2001), las diferencias observadas en el patrón de evolución de GE se debe a la actividad de la PME, y a la presencia de otras isoformas de esta enzima con un mecanismo de regulación preciso, que en el caso de la aceituna podrían expresarse en unas etapas específicas de la maduración.

Los bajos niveles del GE observados en frutos inmaduros de las variedades 'Picual' y 'Hojiblanca', podrían ser responsables de una activación más tardía de la PME y por tanto, de una baja actividad de esta enzima en dichas variedades. Por otro lado, la concentración de los urónidos insaturados generados por el mecanismo de β -eliminación, fue más alta en los frutos de la variedad 'Picual' recolectados entre el estado verde y el estado envero. En general, la activación de la PME se lleva a cabo en presencia de sustratos pécticos con bajos GE, por lo que la degradación de la pectina en los frutos de la variedad 'Picual', podría resultar principalmente de una reacción no enzimática por β -eliminación y, en menor medida, por una reacción enzimática; esto explicaría los bajos GE y por tanto, la baja actividad de la PME en las aceitunas de dicha variedad. Sin embargo, la baja concentración de los urónidos insaturados y la alta actividad de la PME observada en los frutos de la variedad 'Arbequina', recolectados entre el estado verde y el estado envero, indican que la degradación de los sustratos pécticos de los frutos de la variedad 'Arbequina' se debe principalmente a una reacción catalizada por la PME. La baja actividad enzimática y

no enzimática observada para los frutos de la variedad 'Hojiblanca', podría, al menos en parte, explicar su elevada firmeza en comparación con los frutos de las otras variedades.

Por tanto, la actividad de la PME juega un papel muy importante en la pérdida de firmeza del fruto durante la maduración, lo que podría tener una incidencia directa sobre su comportamiento durante el transporte y el proceso de extracción del aceite. Las aceitunas blandas son más susceptibles a las lesiones mecánicas, que pueden ocurrir en cualquier etapa desde la recolección hasta el procesado del fruto en la almazara. Las aceitunas dañadas por abrasiones del epicarpio, pueden alojar una serie de hongos y bacterias contribuyendo a una descomposición rápida y una pérdida importante del agua de la zona dañada, causando una desintegración gradual de la estructura de la pared celular. Todas estas alteraciones, pueden afectar negativamente a la calidad de los aceites extraídos de estas aceitunas dañadas, que pueden mostrar valores de acidez más elevados, una menor estabilidad oxidativa, una reducción del contenido en polifenoles y podrían mostrar defectos de carácter sensorial. Por tanto, el conocimiento de la actividad de la PME y la concentración de pectina relacionada podría considerarse como una herramienta eficaz para elegir el momento oportuno de recolección del fruto de cada variedad.

Una vez aclarados los factores químicos y bioquímicos implicados en la degradación de las sustancias pécticas del fruto durante su maduración, y cómo se ven afectadas por la variedad, habría que aclarar la implicación de estas sustancias de la pared celular en la formación de pastas difíciles y describir el mecanismo de acción del MTN en la rotura de las emulsiones y su efecto sobre el rendimiento en aceite.

Durante la extracción del aceite de oliva virgen, los agentes emulsionantes son, generalmente, polímeros pécticos de alto peso molecular que derivan de los polisacáridos de la pared celular. Estas sustancias promueven la formación de emulsiones, alterando así las características reológicas de la pasta de aceituna procesada y condicionado en gran medida el porcentaje de aceite obtenido.

En términos reológicos, este tipo de pasta pertenece a los fluidos no newtonianos o fluidos de Bingham, pues al aplicar una tensión se comporta como un semisólido de viscosidad plástica. Estas pastas, también llamadas 'difíciles', provocan la reducción del rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen. Para romper estas emulsiones y recuperar parte del aceite retenido, se utiliza como coadyuvante tecnológico el microtalco natural (MTN), aunque recientemente se ha aprobado la utilización de arcillas caoliníticas. Así, se planteó como otro objetivo de esta Tesis el estudio del mecanismo físico de actuación de cuatro microtalcos comerciales, diferenciados por sus contenidos en carbonato y granulometría, y su efecto sobre la ruptura de las emulsiones aceite-agua, similares a las formadas durante la preparación de la pasta. Para conseguir este objetivo, se evaluó a escala de laboratorio el efecto emulsificante de la adición de diferentes dosis de pectina (0.5%, 1%, 1.5% y 2%), sobre la formación de emulsiones aceite-agua procedente de la variedad 'Hojiblanca'. Asimismo, se evaluó el efecto de las características fisicoquímicas del talco sobre la ruptura de estas emulsiones aplicando diferentes dosis (0 a 1%).

El aumento de pectina, generó un incremento de la actividad emulsionante (AE) obteniéndose diferencias significativas cuando se añadieron las dosis más elevadas. Por otra parte, la adición del 2% de pectina, no produjo ningún aumento significativo de la AE; no apreciándose AE para el tratamiento control al que no se añadió pectina. Pinotti *et al.* (1997) indican que las moléculas de pectinas, adsorbidas en la superficie de las gotas de aceite de la emulsión, podrían actuar como polímeros que les sostienen juntas. Una vez que las pectinas están fuertemente adsorbidas a la interfase aceite-agua, pueden estabilizar las emulsiones durante un largo periodo de tiempo, probablemente mejorando la repulsión electrostática entre las gotas emulsionadas (Dickinson, 2003). Por tanto, las pectinas podrían considerarse como uno de los agentes emulsionantes presentes en las pastas difíciles. En cuanto a la adición del MTN, independientemente de la concentración de pectina añadida a la emulsión, las características fisicoquímicas de los talcos, así como las dosis aplicadas, afectan significativamente ($p < 0.001$) a la AE.

De forma genérica, considerando el conjunto de las concentraciones de pectinas y MTN adicionadas a las emulsiones, la adición de dosis de MTN comprendida entre el 0.25% y el 1%, reduce notablemente la actividad emulsionante de las pectinas. Los valores más bajos de la AE se obtuvieron adicionando MTN1 incluso a baja dosis (0.5%).

En general, la acción emulsionante de las pectinas se debilita a medida que aumenta la dosis de talco adicionado; asimismo la eficiencia de este coadyuvante fue menor al incrementar la concentración de pectinas. La capacidad del MTN de romper las emulsiones aceite-agua, podría explicarse por su carácter hidrófobo responsable de la actividad superficial de las sustancias pécticas. De hecho, la superficie hidrófoba o iónica del talco, sería en estado inestable y tendría tendencia a reaccionar químicamente con iones de carga opuesta para volver a su estado estable. Dado que las pectinas son hidrocoloides aniónicos (Moreau *et al.*, 2003) que tienen una carga negativa, por el fenómeno de atracción de las cargas opuestas, estas sustancias actuarían como un fuerte puente de anclaje en la interfase aceite-agua, atrayendo la superficie positiva de las partículas de talco y generando la formación de un complejo pectina-talco (Weinbreek *et al.*, 2003).

Las características fisicoquímicas de los talcos afectan notablemente a la ruptura de dichas emulsiones, aunque su efecto depende de la dosis de talco aplicada. Los mejores resultados, en cuanto a disminución de la AE, se observaron utilizando dosis de 0.5% del talco MTN1, caracterizado por el diámetro de partícula (D50) más bajo (2.4 μm). Debido a su pequeño tamaño de partícula, este talco muestra una mayor área de superficie activa que le permite la adsorción de una mayor cantidad de moléculas de agua y pectinas. Además, su mayor porcentaje de carbonato (4%), le permite mejorar la ruptura de las emulsiones mediante la liberación de mayor cantidad de gotas de aceite.

De hecho, se observa que el aumento progresivo del tamaño de partícula del MTN, parece tener un efecto negativo sobre la AE pues aumenta con el D50. Según Öksüz *et al.* (2006), el hecho de que la hidrofobicidad de la superficie de los MTNs aumente,

a medida que disminuye el tamaño de sus partículas, puede explicarse por un aumento del ángulo de contacto entre las diferentes partículas del talco.

En cuanto al porcentaje de carbonato, se observó una tendencia general a aumentar la AE a medida que lo hace éste, sólo en el rango de dosis de 0.5-1.1%. Sin embargo, dosis más altas inducen una disminución marcada del parámetro estudiado. Por tanto, los MTNs con altos contenidos de carbonatos tienen mayor capacidad para romper emulsiones. El carbonato es un componente rico en calcio y por tanto, puede contribuir activamente a la formación de complejos electrostáticos con las pectinas (Nguyen y Savage, 2012). Por tanto, la eficiencia del talco para romper las emulsiones, no depende sólo de la dosis aplicada, sino también de su composición mineralógica, su morfología y el tamaño de la distribución de sus partículas. De hecho, la excelente eficiencia del MTN1 puede explicarse por su alta hidrofobicidad debida a los valores bajos de D50 y su alto contenido en carbonato. Estos resultados coinciden con los descritos previamente (Alba *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007).

Con objeto de corroborar estos resultados, se realizó un estudio a escala de laboratorio sobre el efecto de la adición de los talcos descritos anteriormente, sobre el rendimiento industrial del proceso de extracción del aceite de oliva virgen de la variedad 'Hojiblanca'. En este caso las dosis ensayadas fueron (0,1, 2 y 3%). Como era previsible, en general, la adición de microtalco natural provocó un aumento del rendimiento industrial (RI) con respecto al testigo. Asimismo, se apreció un incremento lineal del rendimiento industrial a medida que aumentó la dosis de talco del 0 al 2%, no observándose diferencias significativas para dosis más elevadas.

En cuanto al tipo de talco, considerando el conjunto de las dosis de talco ensayadas, los mejores RI se obtuvieron añadiendo talco tipo MTN1, obteniéndose diferencias significativas ($p \leq 0.001$) respecto a otros talcos.

En general, para las diferentes dosis de talco ensayadas, se observó que hay una tendencia general a aumentar el RI del proceso, a medida que lo hace el porcentaje de carbonato contenido en el talco, obteniéndose una correlación entre ambos

parámetros ($p \leq 0.01$). Estos resultados coinciden con los descritos por Alba *et al.* (2007). Por tanto, aquellos talcos con elevado contenido de carbonato pueden funcionar a dosis más bajas, mientras que aquellos con porcentajes de carbonato más bajos han de ser aplicados a dosis más altas para alcanzar rendimientos de extracción elevados.

La granulometría del microtalco, expresada por el diámetro medio de partículas D50, afectó al RI del proceso de extracción de aceite. Así, se ha obtenido una correlación altamente significativa entre el D50 y el RI, fundamentalmente para dosis de 1 y 2%. Así, tamaño de partícula más pequeño da lugar a mejores rendimientos. Este efecto es mucho más marcado en el caso de dosis elevadas (3%). Resultados similares fueron aportados por Alba *et al.* (2007), que encontraron una mejora del rendimiento con un diámetro de partículas más fino del talco. En trabajos posteriores, Espínola *et al.* (2009) y Moya *et al.* (2010) demostraron que el aumento del tamaño de partículas de talco suele tener una influencia negativa sobre el proceso de extracción de aceite. Esta influencia es mucho más marcada a medida que se aumenta la dosis de talco adicionada.

La adición del talco MNT1, caracterizado por el porcentaje de carbonato más alto (4%) y el diámetro de partículas más bajo ($2.4 \mu\text{m}$), permitió obtener los porcentajes de mejora de rendimiento industrial del proceso de extracción más altos, incluso a dosis bajas (1%), confirmando así los resultados obtenidos en el ensayo anterior sobre la eficiencia de este talco en debilitar la actividad emulsionante de las sustancias pécticas.

Los rendimientos más elevados en talcos, con un tamaño de partícula más pequeño, podrían ser explicados por su elevada superficie hidrófoba (Öksüz *et al.*, 2006). Casanova *et al.* (2007), describieron que la disminución del tamaño de partícula (D50) genera un aumento del área de la superficie de adsorción de las partículas de talco (S_{BET}). Por tanto, el RI podría tener una relación directa con la S_{BET} . Se ha confirmado que la eficacia del talco depende, no solo de su superficie sino también de su fracción de carbonato (X_{Carb}). De hecho, se observó que el incremento gradual de $S_{\text{BET}}/X_{\text{Carb}}$

induce un aumento lineal del aceite extraído, obteniéndose una correlación significativa ($p \leq 0.01$).

Se ha estudiado, a escala industrial, el efecto de la adición de diferentes dosis del talco con mayor eficiencia descrito en los trabajos anteriores, caracterizado por un menor tamaño de partículas y un elevado porcentaje de carbonato (0%, 0.25%, 0.5% y 1%), sobre el rendimiento y su interacción con las fracciones péctica y protéica de la pared celular de la pasta de aceituna de la variedad 'Hojiblanca', pues además de las pectinas, las proteínas podrían tener un papel en la formación de emulsiones.

La determinación del ácido galacturónico (AG), se llevó a cabo a partir de los sólidos insolubles en alcohol (SIA) que se cuantificó y se utilizó para la extracción de tres fracciones de sustancias pécticas: pectinas solubles en agua (PSA), pectinas solubles en agentes quelantes o pectato de calcio (PCa) y pectinas insolubles o protopectinas (PP). Asimismo, se determinó el contenido en proteínas de los SIA.

Los resultados obtenidos, indicaron que el contenido de los SIA aumentó después del batido, reflejando una disminución del contenido de los sólidos insolubles en la pasta de aceituna procesada (Berry y Uddin, 1991). Ello afecta sustancialmente a las propiedades reológicas de la pasta procesada (Levi *et al.*, 1988), su comportamiento durante la etapa de separación sólido-líquido y su rendimiento en aceite.

Asimismo, la adición del talco al 0.5% disminuyó el contenido de los SIA mientras que una dosis más elevada (1%) dio lugar a un incremento. Por tanto, el uso de dosis de MTN comprendidas entre 0.25% y 0.5% permitieron una mayor adsorción de los polímeros insolubles al alcohol en la superficie de talco (Liu *et al.*, 2006).

Las tres fracciones de sustancias pécticas cambiaron notablemente durante el batido de la pasta, apreciándose una disminución del contenido de las tres después del batido. La misma tendencia fue observada para el contenido total de pectinas, lo que indica que durante la extracción del aceite, estas sustancias sufren una degradación sustancial que influye sobre su solubilidad; resultados que están de acuerdo con los descritos por Mínguez-Mosquera *et al.* (2002).

Los contenidos tanto de los PCa como los PSA disminuyeron ligeramente después el batido. Las bajas concentraciones de los PCa respecto a las de PSA en la pasta, podrían explicarse por una disminución de los enlaces iónicos cruzados, como resultado de un mayor grado de metilesterificación que se suele producir durante el procesado de las pastas. Las fracciones de PCa y PSA encontradas en la pasta que no ha sido batida, representan probablemente las pectinas de la pared celular que han sido solubilizadas durante la maduración del fruto (Cámara Hurtado *et al.*, 2002), mientras que las encontradas en la pasta de aceituna batida, representan el material inicialmente solubilizado y la pectina solubilizada a partir de las fracciones covalentemente ligadas a la pared celular durante el procesado del fruto.

En cuanto al contenido de PP, que fue la fracción péctica mayoritaria, mostró un descenso después el batido de forma similar a la descrita tras el procesado del brócoli que Christiaens *et al.* (2012) atribuyeron a la conversión de protopectina en pectina soluble por solubilización y/o como consecuencia de una despolimerización por β -eliminación de este material vegetal.

Las PT mostraron una reducción de su contenido después del batido, lo que está de acuerdo con los resultados previamente obtenidos por Cámara Hurtado *et al.* (2002) quienes a su vez indicaron niveles bajos de PT en los frutos procesados.

El hecho de que los extractos de la pasta de aceituna batida muestren menos pectinas, sugiere que un aspecto del procesado, como es el calentamiento de la pasta de aceituna, provocó la despolimerización y la solubilización de las pectinas. Esto explicaría los bajos niveles de PT encontrados en la pasta batida. Mínguez-Mosquera *et al.* (2002) indicaron, que durante esta etapa del proceso de extracción del aceite de oliva virgen, la actividad de algunas enzimas pectolíticas, principalmente la pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG), da lugar a la formación de cadenas cortas de pectinas desesterificadas y a cambios en la solubilidad de las diferentes fracciones pécticas.

La correlación positiva, altamente significativa, entre el contenido de la fracción de PP

y las fracciones PSA ($r^2 = 0.76$), PCa ($r^2 = 0.98$) y PT ($r^2 = 0.99$), indica la existencia de una interacción coordinada entre las tres fracciones pécticas durante el proceso de extracción de aceite, principalmente asociada con su grado de solubilización (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). En general, las pectinas esterificadas, principalmente compuestas por pectinas insolubles, son menos solubles y menos susceptibles a la degradación (Ramos *et al.*, 2015).

No obstante, es poco probable que todos los cambios apreciados en las diferentes fracciones pécticas, puedan explicarse únicamente por los cambios de solubilidad de estas sustancias. Para explicar estas alteraciones estructurales se han propuesto tres mecanismos diferentes: (a) La actividad de ciertas enzimas endógenas que degradan las pectinas incluyendo la PME y la PG (Duvetter *et al.*, 2009); (b) La β -eliminación (De Roeck *et al.*, 2008) y (c) La hidrólisis ácida (Diaz *et al.*, 2007).

La importancia de estos procesos bioquímicos depende principalmente de los niveles enzimáticos del fruto, las características de cada cultivar y de otros factores exógenos a la propia pasta procesada (Gómez, 2007). La modificación de las características químicas de las pectinas por el batido, induce alteraciones en sus propiedades funcionales, tales como su comportamiento reológico y su capacidad gelificante (Sila *et al.*, 2006), lo que afectaría a su capacidad para unirse con las partículas de MNT y en definitiva, a la efectividad de éste como coadyuvante tecnológico.

De hecho, el uso del MNT afectó significativamente al contenido de las diferentes fracciones pécticas, siguiendo la misma tendencia observada para los SIA. Así, la adición del talco, hasta una dosis límite del 0.5%, disminuyó considerablemente el contenido de las tres fracciones pécticas y de PT de la pasta de aceituna batida. Esto podría explicarse por la aparición de interacciones electrostáticas entre el coadyuvante (MTN) y las pectinas debido a sus cargas opuestas, lo que favorecería una mayor adsorción de los polímeros pécticos en la superficie del talco. En este caso, la cantidad de talco con carga positiva fue suficiente para compensar la carga negativa de las pectinas. Sin embargo, una dosis más alta (1%) condujo a la disminución de la adsorción de las pectinas sobre la superficie de talco, probablemente como resultado

de la aparición de polisacáridos pécticos libres que no pudieron complejarse con el talco. Al tratarse de hidrocoloides aniónicos, las pectinas interactúan con la superficie positiva de las partículas de talco (Moreau *et al.*, 2003). La formación del complejo pectina-MTN contribuye activamente a debilitar el efecto emulsionante generado por los polisacáridos pécticos durante la operación de batido de la pasta de aceituna afectando así a la cantidad de aceite extraído.

La adición del MTN durante el batido, permitió una disminución del contenido de la mayoría de las fracciones pécticas. Se observó, al aumentar la dosis de talco, una pequeña reducción de las fracciones PP y PT, mientras que para la PSA se observó una mayor pérdida. El porcentaje de reducción más elevado se observó en la fracción de PP adicionando talco al 0.25%, mientras que el menor se consiguió para la misma fracción adicionando talco al 1%. Este resultado indica que las PP tendrían una mayor capacidad para unirse con las partículas de talco a bajas dosis.

El contenido de los PCa aumentó en un 11.6% cuando se añadieron dosis de talco al 0.5% y 1%. Sin embargo, a dosis más baja (0.25%), esta fracción mostró una mayor capacidad de ser adsorbidas en las partículas de talco.

Por tanto, la adición de MTN modifica de manera diferente el contenido de cada fracción péctica, lo que sugiere que las características químicas de estas afectan considerablemente a su adsorción en las partículas de talco.

Las proteínas, poseen propiedades que facilitan la formación de pastas difíciles. Los resultados mostraron que el batido tiene un impacto sustancial sobre la solubilidad de la fracción proteica de la pared celular de la aceituna. El contenido de proteínas presentes en los SIA, disminuyó después el batido lo que podría deberse a su complejación con los polisacáridos pécticos (Dickinson, 1994). En este caso, la atracción implica parches de proteínas cargadas positivamente que interactúan con polisacáridos pécticos aniónicos (Nguyen, 1986, Park, *et al.*, 1992). La formación de complejos proteína-polisacárido (P-PS), depende de muchos factores como el pH, la fuerza iónica, la proporción de proteína respecto a la del polisacárido, la concentración

total de los sólidos, la densidad de carga del peso molecular y la conformación (Schmitt *et al.*, 1998).

Leroux *et al.* (2003), establecieron que algunas fracciones de pectina son capaces de mejorar la emulsión aceite-agua, presumiblemente como consecuencia de su contenido en proteínas, bajo grado de esterificación y bajo peso molecular. Recientemente, Ramos *et al.* (2015) describieron que la capacidad de las sustancias pécticas para interactuar con las proteínas, depende principalmente de su grado de esterificación y de su contenido en iones.

Se ha observado, que las interacciones electrostáticas entre las pectinas y las proteínas de la pared celular, pueden mejorar la estabilidad de las emulsiones aceite-agua (Li *et al.*, 2012). En el caso de la aceituna, durante la molienda y posterior batido de la pasta, las emulsiones aceite-agua que se suelen formar podrían estar estabilizadas por dichas interacciones. Al igual que se ha observado con las pectinas, se podría dar la adsorción de los complejos pectina-proteína en la superficie del talco. Para comprobar esta hipótesis, se estudió el efecto de la adición del MTN sobre la solubilización de las proteínas durante el batido de la pasta.

Al igual que los polisacáridos pécticos, la adición de MTN en dosis comprendidas entre 0.25% y 0.5% dio lugar a una mejor adsorción sobre la superficie de las partículas de talco; sin embargo, una dosis más alta (1%) condujo al aumento de su contenido. Las partículas de talco en exceso, no pudieron adsorber las proteínas y sustancias pécticas contenidas en la pasta de aceituna procesada, lo que impidió su agregación y por tanto, que parte de las emulsiones permanecieran durante el batido.

Además de los cambios de las fracciones pécticas y protéicas de la pasta procesada, la adición de talco dio lugar a un aumento del porcentaje de aceite extraído lo que coincide con los datos descritos por otras variedades como la variedad 'Picual' (Aguilera *et al.*, 2010) y la variedad 'Coratina' (Caponio *et al.*, 2014).

La adición del talco mejoró el rendimiento industrial del proceso, dando lugar a contenidos en aceite sobre materia seca (RG/MS) más bajos. En cuanto al efecto de

la dosis aplicada, se observó cómo los mejores agotamientos se produjeron a bajas dosis de MTN (0.25%)

Tal como se comentó anteriormente, el uso de MTN durante el batido atenuó, en gran medida, el efecto emulsionante que podrían tener los sustratos pécticos y proteínas de la pasta de aceituna, facilitando así la liberación del aceite celular. Se observó que las pérdidas de aceite en el orujo fueron menores en las pastas de aceitunas con bajos contenidos de pectinas y proteínas. Así, el RG/MS pudo correlacionarse positivamente con el contenido en pectinas ($r^2 = 0.62$) y el contenido en proteínas ($r^2 = 0.83$), indicando que las cantidades de aceite perdido en el orujo está influenciado de forma considerable por el contenido de sustancias pécticas y proteínas de la pasta procesada, además de la dosis de talco añadido durante el batido de ésta.

Mientras que las características de composición y textura de las aceitunas intactas ha sido objeto de numerosos estudios, no ocurre igual con sus características reológicas. Desde el punto de vista reológico, los derivados de frutas no cumplen con la ley de Newton de la viscosidad, por lo que se dice que se comportan como fluido no newtonianos (Rao *et al.*, 2005). Las propiedades reológicas de la pasta de aceituna, dependen tanto del estado de madurez del fruto, como de las condiciones de proceso.

Los polisacáridos pécticos de la pared celular, condicionan las propiedades texturales y reológicas de la aceituna que varían durante la maduración del fruto (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002; Mafra *et al.*, 2001). Sin embargo, no existe suficiente información, a nivel industrial, sobre el efecto que podrían tener los polisacáridos pécticos sobre las propiedades texturales y reológicas de la pasta durante la extracción de aceite, cuyo contenido cambia drásticamente a lo largo del proceso de maduración del fruto.

Caracterizar el comportamiento reológico de la pasta, podría ser muy útil para optimizar el rendimiento del proceso de extracción de aceite (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). Según los valores obtenidos de los módulos elásticos (G') y los módulos de pérdida (G''), la pasta de pulpa de aceituna puede mostrar un

comportamiento tanto sólido como líquido, dependiendo del estado de madurez de los frutos procesados. Petrakis (2006) indicó, que durante el procesado de derivados de frutas y verduras, el límite elástico, determinado en el punto de cruce entre G' y G'' , es un parámetro muy importante a determinar, puesto que permite optimizar los rendimientos del proceso industrial.

Entre los métodos empleados para determinar y comparar los límites elásticos de las suspensiones de alimentos, el método más frecuente es el que emplea la extrapolación de los datos del esfuerzo cortante y los de velocidad de cizallamiento, ajustándolos a varios modelos matemáticos como el de Casson, Herschel-Bulkley y el de Mizrahi-Berk (Qiu y Rao, 1988). Sin embargo, el valor del límite de elasticidad estimada a partir de las curvas de flujo depende de la ecuación del modelo empleado en la estimación (Canet *et al.*, 2005), por lo que se interpreta como parámetro del modelo. Por ello, se determina el valor real del límite de elasticidad por medio de barridos dinámicos oscilatorios de deformación, y así se trataría de una propiedad física específica del producto analizado (Hoffmann y Rauscher, 1993).

En la última parte de esta tesis, se planteó como objetivo estudiar la implicación de las sustancias pécticas en los cambios estructurales, microestructurales y reológicos de la pasta de aceituna de las tres variedades durante la maduración del fruto. Además de las determinaciones reológicas y del contenido en pectina, se realizaron observaciones de la estructura de la pared celular primaria de los frutos utilizando un microscopio confocal láser de barrido (CLSM).

Para las variedades estudiadas, el contenido de los SIA disminuyó linealmente a medida que progresó la maduración del fruto. Esta disminución, refleja en parte la degradación de las sustancias pécticas (Ben Arie y Lislev, 1979), indicando que durante la maduración del fruto, los polímeros insolubles en alcohol se degradan y se transforman en polímeros solubles en alcohol (El Zoghbi, 1994) y el almidón en azúcares solubles (Selvaraj y Kumar, 1994). En cuanto a la evolución de las diferentes fracciones pécticas, por las variedades 'Arbequina' y 'Picual' el contenido de pectina total (PT), obtenido sumando las tres fracciones pécticas, disminuye gradualmente a

medida que avanzó la maduración de los frutos. Sin embargo, para los frutos de la variedad 'Hojiblanca', el contenido de las PT disminuyó tan sólo entre el estado fruto verde y el envero, para aumentar otra vez en los frutos maduros aunque sin diferencias significativas. Asimismo, se observó que a medida que avanzó la maduración del fruto, se produjo una disminución significativa del contenido de PP acompañada por un aumento significativo de PSA y PCa, sugiriendo que la disminución gradual del contenido en pectina está principalmente asociada con la conversión de la PP en PSA y PCa. Además, para las tres variedades estudiadas, se obtuvo una correlación altamente significativa entre los SIA y PT, sugiriendo que las disminuciones observadas en el contenido de la PT corresponderían a las disminuciones observadas en el contenido de los SIA, y poniendo de manifiesto la importancia del proceso de solubilización de las sustancias pécticas durante la maduración de la aceituna. Estos resultados corroboran con los previamente reportados por Pressey *et al.* (1971), quienes atribuyeron la conversión de pectinas insolubles a pectinas solubles, a la disminución del contenido de PT y PP, y al aumento del contenido de las fracciones PSA y PCa.

Los cambios observados en el contenido de los SIA y las diferentes fracciones pécticas al alcanzar el estado de envero, en todas las variedades, coincidieron con la observación de un marcado ablandamiento de los frutos reflejado por una pérdida de la firmeza y una degradación sustancial de la estructura de la pared celular. Estos resultados coinciden con los previamente aportados por Wiley y Worthington (1961) que atribuyen el ablandamiento de los frutos a la disminución del contenido de los SIA y de sus componentes principalmente las pectinas.

A escala macroscópica, el análisis visual mostró una degradación continua de la estructura de la pared celular a medida que avanza la maduración del fruto. La pulpa de aceituna inmadura, está compuesta principalmente por fragmentos grandes de pulpa llenos de pequeños cuerpos lipídicos y pequeñas gotas de agua de vegetación. El avance del proceso de maduración lleva a un aumento notable del tamaño de los cuerpos lipídicos y de las gotas de agua de vegetación. Para las tres variedades estudiadas, el rendimiento industrial del proceso de extracción (RI) aumentó

linealmente con el avance de la maduración del fruto.

El examen microscópico mediante el CLSM, mostró una degradación continua de la estructura de la pared celular a medida que avanza la maduración del fruto. La pulpa de aceituna inmadura está compuesta por células parenquimáticas rodeadas por una pared celular rígida, que contiene azúcares disueltos, ácidos grasos, taninos, pigmentos y minerales solubles en agua (Kailis y Haris, 2007). Este material disuelto, de componentes estructurales de las células, contribuye a la textura firme de las aceitunas verdes. A medida que avanzó el proceso de maduración de los frutos, se observó una degradación marcada de la morfología celular, acompañada por un aumento notable del tamaño de los cuerpos lipídicos y de las vacuolas. Las paredes de algunas células se colapsan mientras que otras se unen con otras células. Asimismo, se observó una disminución de la adhesión intercelular principalmente causada por una solubilización parcial de los polisacáridos pécticos que se encuentran en la matriz de la pared celular (Gabriele *et al.*, 2001). Todas estas alteraciones incrementan el debilitamiento de la pared celular conduciendo al ablandamiento progresivo de los frutos.

Asimismo, se observó que la firmeza de los frutos se redujo drásticamente del estado fruto verde al estado fruto maduro. No obstante, el patrón de ablandamiento de los frutos varía entre variedades. Así, en 'Hojiblanca' se observó un descenso lineal de la firmeza. En el caso de la variedad 'Picual' se produjo un descenso brusco entre el estado verde y el envero, seguido por una reducción menos importante en el estado maduro. En cuanto a la variedad 'Arbequina', su firmeza no varió entre el estado verde y el envero, alcanzando un descenso notable cuando los frutos alcanzaron su completa madurez.

Los datos reológicos de las pastas de pulpa de aceituna, mostraron un comportamiento tipo sólido bajo una tensión de fluencia (comportamiento viscoplástico), típico de suspensiones concentradas, que evolucionó notablemente a medida que avanzaba la maduración de los frutos. Nuestros resultados corroboran con los previamente encontrados por Di Renzo y Colelli (1997).

En cuanto al límite de elasticidad dinámico (σ_{dy}), las pastas de aceituna de las variedades 'Picual' y 'Hojiblanca', mostraron una disminución lineal de este parámetro durante la maduración del fruto. En cuanto a las pastas de la variedad 'Arbequina', se observó un leve aumento de σ_{dy} en el estado envero, probablemente como respuesta metabólica de los frutos a las bajas temperaturas, que se produjeron durante esta etapa de maduración, y que causaron cambios drásticos en las propiedades mecánicas de las aceitunas. Esto fue seguido por una marcada disminución del σ_{dy} para las pasta de pulpa hechas a partir de frutos recogidos en su plena madurez.

Con respecto a las pruebas oscilatorias, los espectros mecánicos se han realizado dentro de la región viscoelástica lineal con el fin de determinar la dependencia de los módulos elásticos y viscosos.

Para las tres variedades estudiadas, la amplitud G' fue substancialmente más grande que la de G'' en el rango de frecuencias estudiado. Ambos módulos aumentaron con el aumento de la frecuencia, confirmando que las pastas de pulpa de aceitunas son estructuras viscoelásticas con comportamiento sólido y con límite elástico. Este resultado sugiere que las fuerzas atractivas se vuelven dominante debido a la presencia de fuertes enlaces de hidrógeno y asociaciones hirofóbicas (Basu *et al.*, 2011). Por otra parte, se observó una zona plana bien desarrollada en los espectros mecánicos de las tres variedades estudiadas, caracterizados por una baja dependencia de G' con la frecuencia y un valor mínimo de G'' . Esta zona plana, podría explicarse por la formación de una red tridimensional (Morris *et al.*, 1984).

Cuando las amplitudes de los módulos G' , G'' y del factor de amortiguación ($\tan \delta$) se tomaron a 2 Hz, los resultados revelaron que les módulos G' y G'' siguieron la misma evolución que la observada para σ_{dy} , indicando que las pastas de pulpa de aceituna procedente de frutos maduros son más estructuradas y más viscosas que los de frutos inmaduros, que en contraste son menos estructuradas y elásticas.

En cuanto a $\tan \delta$, los resultados indicaron que todas las pastas de pulpa de aceituna analizadas exhibieron un comportamiento sólido ya que $\tan \delta < 1$. Asimismo, se

observó que las pastas de frutos inmaduros, mostraron valores significativamente más bajos de $\tan \delta$ que los procedentes de pastas de frutos recolectados en su plena madurez.

La relación entre la firmeza de los frutos y las propiedades mecánicas y reológicas de la pasta (Bourne, 1982), se confirma con los resultados obtenidos, pues se observó una relación estrecha entre la pérdida de firmeza del fruto y los cambios del módulo elástico (G') de las pastas de pulpa de aceituna durante la maduración, siendo ésta más marcada en el caso de la variedad 'Hojiblanca' ($r^2 = 94\%$).

Kojima *et al.* (2004) establecieron que el ablandamiento en peras, está asociado con los cambios del módulo elástico (G') como resultado del debilitamiento de los enlaces intercelulares de la pared celular y/o de la pérdida de la turgencia.

Por tanto, para las tres variedades estudiadas, el proceso de maduración del fruto afecta marcadamente al comportamiento viscoelástico de la pasta de pulpa de aceituna. Las alteraciones químicas y estructurales que sufre el fruto, son el resultado de una interacción coordinada entre varios factores acumulativos. Si se asume que el límite elástico (δ), expresa la cohesión entre las diferentes partículas de la pasta de aceituna, dado que las sustancias pécticas son abundantes en la lámina media de los frutos inmaduros, una de las funciones que estos polisacáridos pueden desempeñar es la de cimentar las paredes celulares de las células adyacentes (Rees y Wight, 1969), participando activamente en el reconocimiento (Ulvskov, 2011) y el mantenimiento de la cohesión de los tejidos, y actuando como sustancia adhesiva intercelular (Pilnik y Voragen, 1970).

De una manera general, las aceitunas inmaduras se caracterizan por su alto contenido en pectinas y bajo contenido en grasa. Sus tejidos son firmes, rígidos y menos viscosos. A medida que avanza la maduración, las sustancias pécticas se degradan y se solubilizan por la acción de las enzimas hidrolasas principalmente la PME y la PG induciendo el ablandamiento del fruto (Waldron y Selvendran 1990).

Por otra parte, el aumento del contenido graso en la célula, según avanza la maduración, es uno de los principales factores que podría desempeñar un papel 'lubricante', entre las membranas celulares de la lámina media mediante la reducción de las fuerzas de fricción, el aumento de la viscosidad y la limitación de las cohesiones entre las diferentes partículas de la pared celular, a medida que avanza la maduración de los frutos.

Referencias bibliográficas

Abaci Z.T., Asma B.M. 2014. Changes in some enzymatic parameters of six cultivars during ripening. *Anadolu Journal of Agricultural Science* 29, 174-178.

Alba J., Moyano J., Martínez F., Hidalgo F. 2007. Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. En: *El aceite de oliva. Actas del XII Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2005*. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.), Jaén (España). pp. 503-508.

Aguilera M.P., Beltrán G., Sánchez-Villasclaras S., Uceda M., Jiménez A. 2010. Kneading olive paste from „Picual“ fruits: I. Effect on oil process yield. *Journal of Food Engineering* 97, 533-538.

Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58, 693–701.

Barrett D.B., Gonzalez C. 1994. Activity of softening enzymes during cherry maturation. *Journal of Food Science* 59, 574-577.

Bashir H.A., Abu-Goukh A.A. 2003. Compositional changes during ripening of guava fruit. *Food Chemistry* 80, 557-563.

Basu S., Shivhare U.S., Singh T.V., Beniwal V.V. 2011. Rheological, textural and spectral characteristics of sorbitol substituted mango jam. *Journal of Food Engineering* 105, 503–512.

Ben Arie R., Lisle N. 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiology* 64, 197-202.

Berry S.Z., Uddin M.R. 1991. Breeding tomato for quality and processing attributes. In *Monographs on theoretical and applied genetics*, Kallo, G. Ed., vol. 14, Springer, Berlin, Germany pp. 99-119.

Boeriu C G., Stolle-Smith T., Van Dijk C. 1998. Characterization of cell wall pectins by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 6, 299–301.

Bourne M.C. 1982. *Food Texture and Viscosity*. Academic Press Inc., N.Y.

Buescher R.W., Hobson G.E. 1982. Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruit tissue by polygalacturonase. *Journal of Food Biochemistry* 6, 147-160.

Cámara Hurtado M., Greve L.C., Labavitch J.M. 2002. Changes in cell wall pectins accompanying tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) paste manufacture. *Bilaketa-emaitzak. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16, 273-278.

Canet W., Alvarez M.D., Fernández C., Luna P. 2005. Comparisons of methods for measuring yield stresses in potato puree: effect of temperature and freezing. *Journal of Food Engineering* 68, 143-153.

Caponio F., Monteleone J., Martellini G., Summo C., Paradiso V.M, Pasqualone A. 2014. Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from Coratina cultivar after production and during storage. *Journal of Oleo Science* 63, 1125-1132.

Casanova H., Orrego J.A., Zapata J. 2007. Oil absorption of talc minerals and dispersant demand of talc mineral non-aqueous dispersions as a function of talc

content: a surface chemistry approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299, 38-44.

Christiaens S., Mbong V. B., Van Buggenhout S., David C. C., Hofkens J., Van Loey A. M., Hendrickx M. E. 2012. Influence of processing on the pectin structure–function relationship in broccoli purée. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 15, 57–65.

De Roeck A., Sila D.N., Duvetter T., Van Loey A., Hendrickx M. 2008. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chemistry* 107, 1225-1235.

Diaz J.V., Anthon G.E., Barrett D.M. 2007. Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5131-5136.

Dickinson E. 1994. Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering* 22, 59-74.

Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17, 25-39.

Di Renzo G.C., Colelli. 1997. Flow behavior of olive paste. *Applied Engineering in Agriculture* 13, 751-755.

Duvetter T., Silas D.N., Van Buggenhout R., Jolie R., Van Loey A., Hendrickx M. 2009. Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I: Stability and Catalytic activity of Pectinases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 75-85.

El Rayah A., Labavitch J.M. 1980. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit, *Plant Physiology* 65, 1014-1016.

El Zoghbi, M. 1994. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *Food chemistry* 49, 33-37.

Espínola F., Moya M., Fernández D., Castro E. 2009. Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjutant extractant. *Journal of Food Engineering* 92, 112-118.

Fischer R.L., Bennett A.B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 42, 675-703.

Gabriele D., De Cindio B., D'Antona P. 2001. A weak gel model for foods. *Rheologica Acta* 40, 120–127.

Gómez C.H. 2007. Matter transfer during virgin olive oil elaboration, *Grasas y Aceites* 58, 194-205.

Hoffmann H., Rauscher A. 1993. Aggregating systems with a yield value. *Colloid and Polymer Science* 271, 390-395.

Iannetta P.P.M., Van den Berg J., Wheatley R.E, McNicol R.J., Davies H.V. 1999. The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 105, 338–347.

Kailis, S., Harris, D. 2007. The olive tree *Olea europaea*. In: *Producing table olives*. CSIRO publishing.

Khotimchenko M. Y., Kolenchenko E. A., Khotimchenko Y. S., Khozhaenko E. V., Kovalev V. V. 2010. Cerium binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77, 104–110.

Kojima T., Fujita S., Tanaka M. 2004. Plant compounds and fruit texture: the case of pear. In: *Texture in food 2, solids foods* pp. 259-263.

Leroux J., Langendorff V., Schick G., Vaishnav V., Mazoyer J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids* 17, 455–462.

Levi A., Ben-Shalom N., Plat D., Raid D.S. 1998. Effect of Blanching and Drying on Pectin Constituents and Related Characteristics of Dehydrated Peaches. *Journal of Food Science* 53, 1187–1190.

Li J.L., Cheng Y.Q., Wang P., Zhao W.T., Yin L.J., Saito M. 2012. A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: Generation of an enzymatically cross linked beet pectin layer using horseradish peroxidase Masayoshi Saito. *Food Hydrocolloids* 26, 448-455.

Liu G., Freng Q., Ou L., Lu Y., Zhan G. 2006. Adsorption of polysaccharide onto talc. *Minerals Engineering* 2006, 19, 147-153.

Mafra I., Lanza B., Reis A., Marsilio V., Compestre C., De Angelis M. 2001. Effect of ripening on texture, microtexture and cell-wall polysaccharides composition of olive fruit (*Olea europea*). *Physiologia plantarum* 111, 439-47.

Marín-Rodríguez M.C., Orchard J., Seymour G.B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* 53, 2115–2119.

Mínguez-Mosquera I., Gallardo-Guerrero L., Roca M. 2002. Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 93-99.

Moreau L., Kim H.J., McClement D.J. 2003. Production and characterization of oil-inwater emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6612-6617.

Morris E.R., Cutler S.B., Ross-Murphy S.B., Rees D.A. 1984. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharides solutions. *Carbohydrate Polymers* 1, 5-21.

Moya M., Espínola F., Fernández D., De Torres A., Marcos J., Vilar J., Josue J., Sánchez T., Castro E. 2010. Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *Journal of Food Engineering* 2010, 97, 57-63.

Nguyen T.Q. 1986. Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulphate and diethylaminoethyl dextran. *Macromolecular Chemistry and Physics* 187, 2567-2578.

Nguyen H.V., Savage G.P. 2012. The effect of temperature and pH on the extraction of oxalate and pectin from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.), golden kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.), kiwiberry (*Actinidia arguta*) and persimmon (*Diospyros kaki*). *Int. Journal of Food Science and Technology* 48, 794-800.

Öksüz M., Eroglu M., Yildirim H. 2006. Effect of talc on the properties of polypropylene/ethylene/diene terpolymer blends. *Journal of Applied Polymer Science* 101, 3033-3039.

Park J.M., Muhoberac B.B., Dubin P.L., Xia J. 1992. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules* 25, 290-295.

Petrakis C. 2006. Olive oil Extraction, in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, ed. D.Boskou, 191-225, Champaign, Illinois: AOCS Press.

Pilnik W., Voragen A.G.J. 1970. The Biochemistry of Fruits and their Products. In Hulme A.C. (Eds.), *Academic Press, London* pp. 1- 53.

Pinotti A., Belvilacqua A., Zaritzki N. 1997. Optimization of the flocculation stage in a model system of food emulsion waste using chitosan as a polyelectrolyte. *Journal of Food Engineering* 32, 69-89.

Pressey R., Hinton D.M., Avants J.K. 1971. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *Journal of Food Science* 36, 1070-1073.

Pressey R., Avants J.K. 1978. Difference in polygalacturonase composition of clingstone and freestone peaches. *Journal of Food Sciences* 43, 1415–1417.

Qiu C.G., Rao M.A. 1988. Role of pulp content and particle size in yield stress of apple sauce. *Journal of Food Science* 53, 1165-1170.

Ramos O. P., Ornelas J.J., Ruiz S., Zamudio P.B., Cervantes B., Gardea A. A., Pérez J.D., Ibarra V., Reyes J. 2015. Effect of ripening and heat processing on the physicochemical and rheological properties of pepper pectins. *Carbohydrate. Polymers* 115, 112-121.

Rao M.A, Rizvi, S.H., Datta A.K. 2005. Engineering properties of foods. Third Edition. Editorial CRC Press Taylor & Francis. Boca Raton. Florida. EEUU.

Rees D.A., Wight N.J. 1969. Molecular cohesion in plant cell walls. Methylation analysis of pectic polysaccharides from the cotyledons of white mustard. *Biochemistry Journal* 115, 431–439.

Sánchez S., Pacheco R., La Rubia M.D, Sánchez A., Pereira M.G. 2007b. Aplicación de distintos microtalcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: El aceite de oliva. Actas del XII Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2005. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.), Jaén (España). pp. 497-502.

Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J. 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 689-753.

Selvaraj, Y., Kumar, R. 1994. Enzymatic regulation in ripening mango fruit. *Indian Journal of Horticulture* 51, 316–323.

Seymour G. B., Gross K. C. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News Information* 7, 45-52.

Sila D. N., Smout C., Elliot F., Van Loey A., Hendrickx M. 2006. Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *Journal of Food Science* 71, 1–9.

Steele N.M, McCann M.C., Roberts K. 1997. Pectin modification in cell-walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. *Plant Physiology* 114, 373–381.

Tabilo-Munizaga G., Barbosa-Cánovas G. 2005. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering* 67, 147–156.

Ulvskov P. 2011. Plant polysaccharides: Biosynthesis and Bioengineering. *Annual Plant Revue* 41, 390-395.

Waldron K.W., Selvendran R.R. 1990. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum* 80, 568–575.

Weinbreek F., Nieuwenhuijse H., Robjin G.W., De Kruif C.G. 2003. Complex formation of whey proteins: Exocellular saccharide EPS B40. *Langmuir* 9, 9404-9410.

Wiley R.C., Worthington O.J. 1961. Factors influencing Apple texture. *American Society for Horticultural Science* 77, 60-72.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se han deducido las siguientes conclusiones:

1. El análisis de distintas variedades de aceitunas, 'Arbequina' 'Picual' y 'Hojiblanca', permitió comprobar que conforme avanza la maduración del fruto, los parámetros pomológicos (índice de madurez), texturales (firmeza y grado de esterificación), composicionales (contenido en aceite, pectinas, metanol y urónidos 4,5-insaturados) y bioquímicos relacionados con la actividad de la PME, tienen un elevado componente genético.
2. La desesterificación de las sustancias pécticas por la acción de la PME, podría ser un paso previo a los cambios de maduración asociados a los polisacáridos pécticos de la pared celular. De hecho, se observó que el contenido de pectinas totales (PT) mostró una evolución similar a la actividad de la PME lo que indicaría una relación entre la inducción de la actividad de esta enzima y la concentración en pectinas, principalmente las metilesterificadas, que representan sus sustratos potenciales.
3. Durante el proceso de maduración de las aceitunas, la degradación de los compuestos pécticos podría resultar de una acción sinérgica entre una reacción no enzimática por β -eliminación, induciendo la formación de los urónidos 4,5-insaturados, y una reacción enzimática, principalmente controlada por la actividad de la pectinmetilesterasa que cataliza la deesterificación del grupo carboxilo del ácido poligalacturónico, liberando metanol al medio y convirtiendo a las pectinas en ácidos pécticos.
4. La pared celular otorga rigidez a los tejidos de la aceituna, en consecuencia, contribuye a su firmeza que viene dada por la composición y grado de polimerización de sus componentes pécticos.
5. Las aceitunas inmaduras son firmes, y se caracterizan por un alto contenido en protopectinas (PP). A medida que avanza la maduración, se observa un descenso del contenido de PP, acompañado por una marcada pérdida de firmeza y un aumento progresivo del contenido de pectina soluble en agua (PSA), y de los pectatos de calcio (PCa) hacia el final de la maduración, hecho que podría

vincularse de un cambio progresivo en el equilibrio y la composición de los polisacáridos pécticos, confirmando la existencia de una interacción coordinada entre las tres fracciones estudiadas, incluyendo una despolimerización y un aumento de la solubilidad de las mismas.

- 6- La pérdida de firmeza gradual del fruto es debida, principalmente, a cambios en la estructura de la pared celular. Estos implican la actividad de enzimas pectolíticas capaces de degradar los componentes de la misma, dentro de los más importantes cabe citar a la pectinmetilesterasa (PME).
7. El conocimiento de la actividad de la PME y la concentración de pectina relacionada, podría considerarse como una herramienta eficaz para elegir el momento oportuno de recolección del fruto de cada variedad.
8. El aumento progresivo de la concentración de pectina añadida a las emulsiones aceite-agua, generó un incremento de la actividad emulsionante (AE). Por ello, las pectinas podrían considerarse como uno de los agentes emulsionantes que derivan de los polisacáridos de la pared celular de la aceituna. Estas sustancias promueven la formación de emulsiones durante el procesado del fruto, alterando así sus características reológicas y condicionado, en gran medida, el porcentaje de aceite obtenido.
9. Utilizando modelos de laboratorio, el efecto emulsionante de las pectinas se va debilitando, a medida que aumenta la dosis de microtalco natural (MTN) adicionado a las emulsiones aceite-agua. A escala industrial, el uso de este coadyuvante a las pastas de aceitunas, provoca la ruptura de las emulsiones aceite-agua, generando un aumento del rendimiento industrial del proceso de extracción de aceite cuando se comparan con el testigo al que no se añadió talco.
10. Las características físicas y químicas del talco (porcentaje de carbonato y granulometría de las partículas, D 50), influyen en la ruptura de las emulsiones, y por tanto, en el rendimiento del proceso de extracción. La capacidad del MTN para romper las emulsiones aceite-agua, podría explicarse por su carácter hidrófobo,

responsable de la actividad superficial de las pectinas, que representan el principal agente emulsionante durante la operación de batido de las aceitunas

11. Durante el proceso de batido, las proteínas y las sustancias pécticas sufren una degradación sustancial que influye sobre su solubilidad.
12. La aplicación de dosis bajas de talco ($\leq 0.5\%$), genera la aparición de una interacción electrostática entre pectinas, proteínas y partículas de talco, contribuyendo a su complejación. Dosis más altas (1%), estorban su agregación y promueven la formación de emulsiones durante el batido de la pasta de aceituna
13. El examen de las diferentes muestras de pulpa de aceituna, utilizando la técnica de microscopía confocal láser de barrido (CLSM), revela una degradación continua de la estructura de la pared celular a medida que avanza la maduración del fruto.
14. La pasta de pulpa de aceituna, exhibe un comportamiento tipo sólido bajo una tensión de fluencia (comportamiento viscoplástico), típico de suspensiones concentradas que evoluciona notablemente a medida que avanzaba la maduración de los frutos.
15. El aumento del contenido graso de la aceituna, según avanza la maduración, es uno de los principales factores que puede contribuir activamente a la disminución de las fuerzas de fricción internas, entre las diferentes partículas de la pulpa de aceituna.

From the results obtained in this investigation, the following conclusions have been deduced:

1. The analysis of different olive fruit cultivars, 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' allowed us to assess that as ripening progresses, pomological (ripening index), textural (firmness, degree of esterification), compositional (oil content, pectins, methanol and 4,5-unsaturated uronides) and biochemical parameters related to pectinmethylesterase (PME) activity have a high genetic component.
2. The desesterification of pectin by PME may be considered as a previous step for ripening-associated changes in cell wall pectin substances. Similar trends in changes of PME activity and total pectin content (TP) during fruit ripeness were observed indicating a close relationship between the induction of PME activity and the pectin concentration mainly the methyl-esterified ones which represent their potential substrates.
3. During the course of ripening process, the degradation of cell wall pectins could result from a synergistic action between a non-enzymatic reaction through a β -elimination resulting in the formation of unsaturated uronides and an enzymatic reaction mainly governed by PME enzyme which catalyzes the de-esterification of the carboxylic group of the polygalacturonic acid releasing methanol and converting pectin to pectin acid.
4. The cell wall provides rigidity to the tissues of the olive fruit and contributes to its firmness mainly influenced by the composition and the degree of polymerization of its pectic compounds.
5. Unripe fruits are firm and rich in protopectin (PP), having firmer tissues and are more rigid. Gradually as ripening progressed, this pectic fraction was solubilized and transformed into water soluble pectin (WSP) and chelate soluble pectin (CSP). This data suggests a progressive change in the equilibrium and composition of the pectic compounds and confirms the existence of a coordinated interaction between

the three pectic fractions inducing their depolymerization and an increase in their solubility.

6. The gradual loss of olive fruit firmness is mainly due to changes in the cell wall structure involving the activity of some pectolytic enzymes able to degrade its different components among the most important ones: pectinmethylesterase (PME).
7. The knowledge of the PME activity and related pectin concentration may be considered as an efficient tool to establish the optimal picking date for each olive cultivar.
8. Increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity (EA), obtaining significant differences when higher doses were applied. Therefore, pectins may be considered as ones of the emulsifying agents derived from olive cell wall polysaccharides. These substances promote the formation of oil-in-water emulsions during fruit processing, thus altering its rheological characteristics and largely influencing the oil produced from it.
9. In vivo, the emulsifier effect of pectins was weakened by the addition of increasing micronized-natural talc (MNT) dose to oil-in-water emulsions. At industrial scale, the use of this coadjuvant during the malaxation of the olive paste caused the breakdown of these emulsions improving the oil yield when compared to control without talc addition.
10. The physical and chemical characteristics of the talc (carbonate rate and particle size: D50) affect markedly the breaking of oil-in-water emulsions and therefore the extraction oil yield. The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions could be explained by its hydrophobic character which is responsible for the surface activity of the pectic substances, main emulsifiers agents during olive paste malaxation process.

11. During olive oil extraction process, the proteins and the pectins undergo substantial degradation that influences their solubility.
12. The use of MNT at lower doses ($\leq 0.5\%$) generates electrostatic interaction between these components and talc particles contributing to their complexation. Higher dose (1%) disturbs their aggregation and promotes emulsions formation.
13. The examination of the different olive pulp paste samples using a confocal scanning laser microscopy (CLSM) revealed a continuous disruption of the cell wall structure as ripening progressed.
14. Olive pulp pastes showed a solid-like behavior under a yield stress (viscoplastic behavior), typical of concentrated suspensions, which evolved markedly as ripening progressed.
15. The gradual increase of the oily fraction contributed actively to the decrease of the internal friction forces between the different olive pulp particles.

ANEXOS

I PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos científicos publicados

Por orden cronológico:

- 1 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118, 545-552.
- 2 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during 'Hojiblanca' virgin olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*. DOI: 10.1002/ejlt.201600039.
- 3 Sadkaoui A., Jiménez A., Aguilera M.P., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Virgin olive oil yield as affected by physicochemical talc properties and dosage. *European Journal of Lipid Science and Technology*. DOI: 10.1002/ejlt.201600112.

Artículos científicos enviados en fase de revisión

- 1 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Involvement of pectin methylesterase in the regulation of pectic cell wall disassembly, methanol accumulation and softening of olive fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- 2 Sadkaoui A., Leverrier C., Jiménez A., Pacheco R., Cuvelier G., Beltrán G. 2016. Pectic Cell Wall Polysaccharides and Oil Content Modulate the Rheological behavior of the Olive Fruit Pulp during Ripening Process. *Food Hydrocolloids*.

Artículos científicos en curso de publicación

- 1 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Changes in Biochemical Composition and Activity of Some Cell Wall Degrading Enzymes Involved in the Ripening Process of Olive Fruit. *BMC Plant Biology*.
- 2 Sadkaoui A., Leverrier C., Jiménez A., Pacheco R., Moulin G., Beltrán G., Cuvelier G. 2016. Olive pulp paste viscosity as affected by ripening stage and mixing process. *Industrial Crops and Products*.
- 3 Sadkaoui A., Leverrier C., Jiménez A., Pacheco R., Moulin G., Beltrán G., Cuvelier G. 2016. Modeling of Rheological Behavior of Olive Fruit Pulp Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Food Engineering*.
- 4 Sadkaoui A., Leverrier C., Jiménez A., Pacheco R., Moulin G., Beltrán G., Cuvelier G. 2016. Rheological Properties of Mesocarp Olive Oil as Influenced by Ripening Process. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- 5 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Industrial Extracted Oil Yield as affected by Crushing Level, Malaxation Conditions and Talc addition. *European Journal of Agronomy*.

- 6 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Effect of Micronized Natural Talc Addition on Olive Oil Quality and Physicochemical Composition of Hojiblanca Cultivar. *Postharvest Biology and Technology*.
- 7 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Influence of Different Harvest Date on Fruit (*Olea europaea*. L) Quality during Ripening Process using Chemometric Approach. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- 8 Sadkaoui A., Jiménez A., Pacheco R., Beltrán G. 2016. Influence of Different Harvest Date on Quality and Physicochemical Composition of Olive (*Olea europaea*. L) Oils during Ripening Process using Chemometric Approach. *Scientia Horticulturae*.

Research Article

Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹

¹ IFAPA Centro "Venta del Llano", Junta de Andalucía, Mengibar, Jaén, Spain

² Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

Micronized natural talc (MNT) has demonstrated to be very useful to break down emulsions formed during the virgin olive oil extraction process, improving the oil yield. This study was aimed to obtain more insights into the mechanisms of MNT to break down oil-in-water emulsions. For this purpose, laboratory scale experiments were performed in order to evaluate the effect of different pectin concentrations (0.5, 1, 1.5, and 2%), used as an emulsifier agent, on the behavior of an oil-in-water interface. Afterward, to evaluate the effect of MNT dosage as well as its physicochemical characteristics on breaking oil-in-water emulsions, four MNTs differing in their particle size (D50) and carbonate rate were assayed at doses ranging from 0 to 1%. Increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity (EA). The emulsifier effect of pectins was weakened by the addition of increasing MNT dose. MNT physicochemical characteristics markedly affected the breaking of oil-in-water emulsions. Nonetheless, its effect depends on the dose of MNT applied to the emulsion. The highest decrease in EA was observed for MNT with the lowest D50 (2.4 µm) and the highest carbonate rate (4%) at 0.5%. In general, MNT containing lower D50 and high rate of carbonate showed better capacity for breaking oil-in-water emulsion.

Practical applications: So far as can be ascertained, no quantitative study has been made, *in vitro*, on the relative merits of MNT addition as a technological aid in breaking down oil-in-water emulsions. This study provides deeper insights into the clarification of the effect of pectins as emulsifier agents, on aqueous emulsions of Hojiblanca virgin olive oil and how the addition of different doses of MNT, with different physicochemical characteristics, carried out the breaking of the oil-in-water emulsions.

Keywords: Carbonate rate / Emulsifying activity / Micronized natural talc / Oil-in-water emulsion / Particle size / Pectins / Virgin olive oil

Received: March 8, 2015 / Revised: April 30, 2015 / Accepted: May 15, 2015

DOI: 10.1002/ejlt.201500112

1 Introduction

Virgin olive oil production, unlike that of other vegetable oils, is a mechanical process that consists of crushing, malaxation,

and oil separation [1–3]. Several studies showed that the most fundamental phase of the extraction process is the olive paste malaxation since it can increase the oil yield. During this mechanical step, oil remains inside the unaltered cells or is left in the colloidal system of the olive paste (microgels) and some is bound in an emulsion with the vegetable water [4]. The difficulty of releasing this bound oil can be explained because the droplets of dispersed or emulsified oil are surrounded by a lipoprotein membrane (phospholipids and proteins) [5]. Furthermore, an important potential factor in determining extractability of olive paste is the high molar mass of polymeric substances derived from cell wall polysaccharides during processing. These substances are natural emulsifier agents present in olives. They promote

Correspondence: Dr. Gabriel Beltrán Maza, IFAPA Centro "Venta del Llano", Junta de Andalucía, P.O. Box 50, Mengibar, Jaén E-23620, Spain
E-mail: gabriel.beltran@juntadeandalucia.es
Fax: +34 953386380

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; D50, particle size; EA, emulsifying activity; ELV, emulsified layer; HSD, honest significant difference; MNT, micronized natural talc; PGA, polygalacturonic acid; PSD, particle size distribution; SD, standard deviation; w/v, weight/volume; W₀, whole volume of the solution

emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action [6]. This effect is more important when the fruits are harvested at the first stage of ripening and have high moisture content, usually above 55% [7].

Some olive varieties, such as Hojiblanca, achieve their highest content of pectic substances during veraison stage [8] which represents the usual picking period. Harvesting at this stage may produce emulsions during malaxation due to the presence of cell wall pectic polysaccharides with emulsifying activity. These emulsions lead to the formation of the so-called difficult pastes which lessen substantially the oil yield. To break down these emulsions, some technological co-adjuvants have been successfully developed. A combination of pectolytic, cellulolytic, and hemicellulolytic plant enzymes have been used to break emulsions improving not only the oil yield but also the nutritional quality of the oil [9, 10]. Nevertheless, the use of technological coadjuvants with chemical or biochemical activity is forbidden by European regulations on virgin olive oil production [11].

The use of common salt (NaCl) could represent a feasible mean for the improvement of oil extraction [12, 13]. Its action, which is exclusively physical, is based on the repulsion between the oil and the hydrophilic phases due to the increased ionic charge as well as its density [13]. Koprivnjak et al. [14] found that a significantly higher extractability of oil from 25 to 29% compared to the control, $p < 0.05$, was obtained by adding 3% of NaCl. Furthermore, in a research study describing the effect of salt addition on the solubility of phenolic compounds in olive mill waste water, Noughy et al. [15] found that as the concentration of the NaCl increases, more and more water is bound up in hydration shells depending on the salt ability to coordinate water.

Another powerful emulsion breaker authorized by European Union regulations (CE Directive 30/2001) is the calcium carbonate (E170) [4]. This said does not react with oils because of its crystalline structure and it is easily removed by centrifugation together with olive pomace due to its high density (2.72 g/cm^3) and water affinity [4]. A recent research study conducted by Ben Brahim et al. [16] revealed that adding a ratio of 1.6% of calcium carbonate to the olive paste at a malaxing temperature of 31°C during 20 min has important advantages. Indeed, it increases oil yield by 2% phenol and pigments contents without affecting the oil quality, as well as improves the antioxidant activity.

Currently, micronized natural talc (hydrated magnesium silicate) is the most widely used co-adjuvant for oil extraction [17, 18] due to its exclusively physical action [4]. The use of talc as co-adjuvant during malaxation has been proved to improve the extractability [7, 13], but it has not a marked effect on the quality parameters of olive oil [10, 19]. The same was observed by Carrapiso et al. [17] for laboratory trials used on Carrasqueña and Picual cultivars. In general, the amount of talc used ranges from 0.3 to 1% of fresh weight [20] although an over dose can reduce the process yield.

The hydrophobicity of talc has been thoroughly studied; its breakage during milling forms two surfaces [21, 22]. One surface results from the easy breaking of the Van der Waals bonds of a surface from its neighbor [23] which forms a basal face that is hydrophobic. The other surface is generated from the ionic/covalent bonds within the layers and from edges that are hydrophilic in nature [21, 22, 24].

From the chemical point of view, the hydrophilic or ionic face would be in an unstable state immediately after the bond breakdown and would seek to react with ions of the opposite charge in order to return to their stable state. Furthermore, micronized natural talc (MNT) physicochemical characteristics vary from deposit to other. Among the most studied MNT characteristics, particles size and carbonate rate may affect substantially the break of oil-in-water emulsions and thus industrial oil yield [25, 26, 5].

The purpose of this study was to determine the effect of pectin addition, as an emulsifier agent, on aqueous emulsions of Hojiblanca virgin olive oil and how the addition of different doses of MNT with different physicochemical characteristics affects the breakdown of oil-in-water emulsions.

2 Materials and methods

2.1 Methods

For this work, olive trees (*Olea europaea* L.) of Hojiblanca cultivar with uniform characteristics were selected. The trees were spaced $7 \times 7 \text{ m}$ and grown in the experimental orchard of Center IFAPA "Venta Del Llano"—Mengibar, Jaén (Spain) using standard growing techniques. This work was performed during the crop year 2012–2013.

Fruit samples were harvested by hand at the ripening index 4.53, according to the fruit classification based on skin and flesh color described in the ripening index method [27].

The virgin olive oil was extracted in the pilot oil mill of IFAPA Venta Del Llano equipped with a continuous extraction system (Pieralisi, Spain) working at two phases way.

In this experiment, has been determined the effect of the physicochemical properties of the MNT on the emulsifying activity (EA) of an oil-in-water system prepared with different pectin amounts. Four commercial MNTs have been used; their main physical and chemical characteristics are shown in Table 1. In the experiment, a factorial design was selected considering three variables: type of MNT (MNT1, MNT2, MNT3, and MNT4); MNT dose added to the emulsion (0, 0.25, 0.5, and 1%); and the concentration of pectin added to the emulsion (0, 0.5, 1, 1.5, and 2%). The assay was carried out by triplicate.

Emulsifying activity was assessed using the Dalev and Simeonova procedure [28]. In graduated tubes, emulsions were prepared by adding 1 mL of virgin olive oil to 2.5 mL of polygalacturonic acid (PGA) aqueous solution (0.5%, w/v),

Table 1. Basic data of the used micronized natural talc (MNT) used in the experiment

Coadjutant	Carbonate (%)	Medium particle size D50 (µm)	Density (g/cm ³)	Specific surface B.E.T (m ² /g)
MNT 1	4	2.4	2.77	7
MNT 2	0.8	7.1	2.78	9
MNT 3	0.5	13	2.77	7
MNT 4	1.1	16.3	2.78	6

as a source of pectin. The mixture was homogenized at room temperature in a vortex mixer at maximum speed, for 3 min. Samples were centrifuged at 527 g, for 5 min, at 23°C, then the whole volume of the solution (W_v) and the emulsified layer volume were measured (EL_v). EA was calculated using Equation (1):

$$EA = \frac{EL_v}{W_v} \times 100 \quad (1)$$

2.2 Statistical analysis

In the tables, results are expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was applied. Tukey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). These determinations were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3 Results and discussion

Changes in the emulsions were tested by measuring their EA. Among the factors studied, pectin amount used for oil-in-water emulsion (either with or without use of the MNT) was the main factor affecting the EA, since it represents around 86% of variability observed in the ANOVA (Table 2). Both, talc type and its dose showed a highly significant effect too, although explained a lower variability percent.

3.1 Effect of pectin concentration on emulsifying activity

Figure 1 shows the changes in EA with increasing pectin concentrations. EA increased with pectin percent, achieving significant differences between the higher pectins concentrations (1.5 and 2%) and the rest. However, pectin content higher than 1.5% did not produce significant raise.

For the control, without pectin addition, EA was not detected although a thin emulsion was formed after mixing. This emulsion may be due to virgin olive oil phospholipidic components that show amphiphilic character [29]. However, these emulsions were unstable and could be separated into

Table 2. Partial mean squares from analysis for the effect of pectin concentration and talc physicochemical characteristics and dosage on the emulsifying activity (EA)

Factor	DF ^a	MS ^b	SST ^c	p ^d
Total	239			
Talc (A)	3	162.46	1.43***	0.0000
%Talc (B)	3	426.73	3.75***	0.0000
Pectins (C)	4	7336.23	86.01***	0.0000
A $\times$ B	9	23.70	0.63*	0.0245
A $\times$ C	12	17.89	0.63**	0.0799
B $\times$ C	12	37.35	1.31***	0.0001
A $\times$ B $\times$ C	36	11.28	1.19**	0.4069
Error	160	10.77	5.05	

ns: no significance.

*Significance level p , 0.05; ***Significance level p , 0.001.

^aDegree of freedom.

^bMean squares.

^cPartial mean square for the effect expressed as percentage of the total corrected sum of square.

^dStatistical significance.

two layers after centrifugation. This short-term stability can be explained by the fact that emulsions formed between oil and water are thermodynamically unstable systems that break down over time.

Pinotti et al. [30] proposed that pectin molecules adsorbed to the surface of the oil droplets of emulsion could act as polymer bridges holding the droplets together. Once pectins are strongly adsorbed to the oil-in-water interface, they can stabilize emulsions for long periods probably enhancing the electrostatic repulsion among the emulsified droplets [6]. Therefore, pectin may be considered the main responsible of the oil emulsified during processing olive difficult pastes.

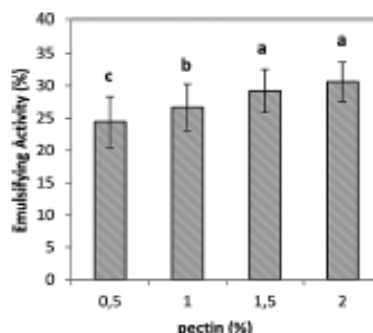


Figure 1. Effect of pectin concentration on the EA considering the four types and doses of MNT. Different letters means significant differences at p , 0.05.

Table 3. Partial means squares from analysis for the effect of MNT physicochemical characteristics and dosage on the EA for each of the percentages of pectin (0.5, 1, 1.5, and 2%)

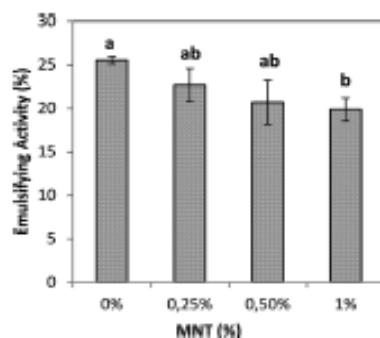
Pectin dose (%)	DF ^a	Total 47	MNT (%) (A) 3	MNT type (B) 3	A × B 9	Error 32
0.5	MS ^b	215.747	171.077***	36.234***	6.925***	1.511
	SST ₀ ^c		70.06	14.84	8.51	6.60
1	MS ^b	196.036	156.167	32.184	6.095	1.590
	SST ₀ ^c		69.84***	14.39***	8.18***	7.58
1.5	MS ^b	155.5227	85.8794***	62.7089***	5.5870**	1.3474
	SST ₀ ^c		47.78	34.89	9.33	8.00
2	MS ^b	128.6811	76.9103***	46.767***	4.4200***	0.8741
	SST ₀ ^c		52.69	31.84	9.08	6.39

Significance level p , 0.01; *Significance level p , 0.001.^aDegree of freedom.^bMean squares.^cPartial mean square for the effect, expressed as percentage, of the total corrected sum of square.

3.2 Effect of MNT dose on the emulsifying activity

Other significant factor affecting the EA is the MNT dose added to the emulsion. Because pectin concentration was the main responsible of EA variability and its interaction between MNT dosage and MNT type was significant, a separated ANOVA analysis for each pectin concentration was established (Table 3) in order to clarify the results discussion.

As can be seen, independently of the pectin concentration, the physicochemical characteristics of MNT used as well as its dose affected significantly ($p \leq 0.001$) to the EA. Moreover, the main factor explaining the variability of EA values for all the tested pectin concentrations was the MNT dose. Considering the pool of MNT and pectin concentrations, the addition of MNT at doses between 0.25 and 1% reduced the emulsifying effect of the pectins (Fig. 2) although

**Figure 2.** Effect of MNT dosage on the EA considering the four co-adjuncts and the five pectin concentrations. Different letters means significant differences at p , 0.05.

in general, significant differences could be detected only for the highest MNT dose.

In Fig. 3 can be observed how the four MNTs, at different doses, affect EA for each pectin percent. MNT1 produced the most important decrease in EA even at low doses; the best reduction was achieved at 0.5%. MNT3 showed lesser EA reduction even for the greatest dose. The effectiveness of the MNTs was lowered as pectin percent was increased in the emulsion.

The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions could be explained by its hydrophobic character which is responsible for the surface activity of pectin substances. In fact, the hydrophobic or ionic face of the talc would be in an unstable state and would seek to react with ions of the opposite charge in order to return to their stable state. As pectins are anionic hydrocolloid emulsifiers [31], they represent a negative charge, acting as a strong anchor point at the oil-in-water interface; therefore, producing the attraction of the positive face of talc particle and the formation of pectin-talc complex [32]. Therefore, the addition of MNT to the oil-in-water emulsions may generate electrostatic interactions between the co-adjunct and pectins because they are two oppositely-charged components.

As can be observed in Fig. 4, the emulsified layer decreases when MNT was added. This suggests that there was enough talc present with positive charge to completely compensate the negative charge of the pectin. It can lead to a macroscopic phase separation and formation of pectin/talc complex that sediments after centrifugation. The pectin molecules adsorbed to the surface of the oil-in-water system are lowered, giving the breaking of the emulsions and the decrease of the EA caused by pectins. It depends on the MNT dose and its physicochemical characteristics.

These results are in agreement with previous works [33] that described when the amount of positive charge on the talc and negative charge on the pectin are equal, the full charge compensation could lead to aggregation of the soluble

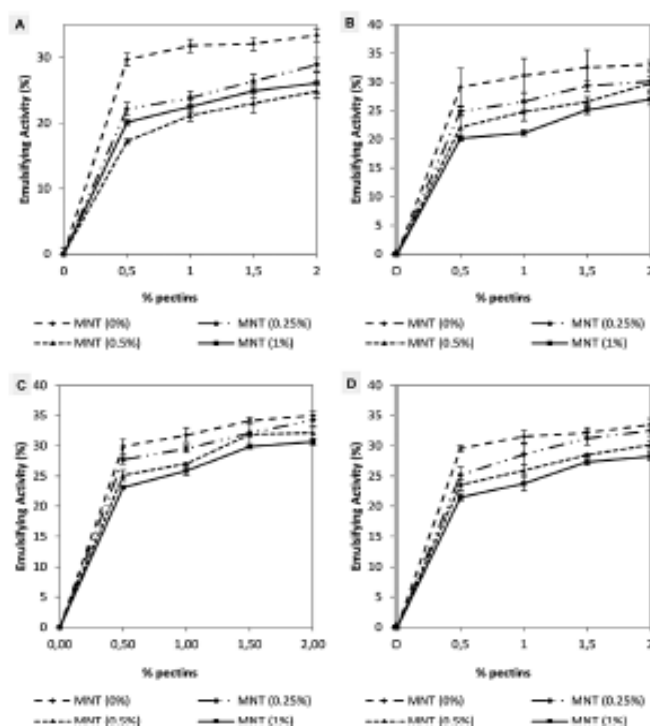


Figure 3. Effect of the physicochemical talc characteristics (used at different doses) and pectin concentration on the emulsifying activity of Hojiblanca virgin olive oil. (A) MNT1, (4% CaCO_3 ; $2.4\ \mu\text{m}$); (B) MNT2, (0.8% CaCO_3 ; $7.1\ \mu\text{m}$); (C) MNT3, (0.5% CaCO_3 ; $13\ \mu\text{m}$); (D) MNT4, (1.1% CaCO_3 ; $16.3\ \mu\text{m}$).

complexes and, finally, to complex conservation/precipitation.

Pectin-MNT complexation may affect the pectin adsorption rate at oil-in-water interfaces. Various factors may contribute to this: (i) due to complexation, the positive talc particles are partitioning over polysaccharide bound and the free state, implying that less talc is available for direct adsorption; (ii) the bound state diffuses much more slowly than the free state, because of the larger hydrodynamic radius of the pectin carrier; and (iii) the attachment of the bound talc to the oil-in-water interface may be hindered by the presence of the surrounding pectins [34].

3.3 Effect of MNT physicochemical characteristics on emulsifying activity

When the MNTs assayed were compared, considering the pool of MNT and pectin doses, (Fig. 5) significant differences were not found between them. The highest value of EA was obtained using MNT4, characterized by the highest particle size (D50, $16.3\ \mu\text{m}$) and a carbonate rate relatively

low (1.1%). The lowest EA value was obtained using MNT1 characterized by the highest carbonate rate (4%) and the lowest particle size ($2.4\ \mu\text{m}$). These findings confirm the results found by other authors [25, 26] reporting as MNT physicochemical characteristics play an important role in breaking oil-in water emulsions and then, on oil yield. Therefore, the efficiency of talc to break down emulsions is not only affected by the dose applied to the emulsion but also by its mineralogical composition, morphology, and particle size distribution (PSD).

The excellent effectiveness of MNT1 was due to its fine particle size and its high carbonate content. MNT1 had the lowest D50 and thus the greatest active surface area which let to adsorb a great amount of pectin and water molecules. Furthermore, this talc (MNT1) had the highest rate of carbonate enhancing the breaking of oil-in-water emulsion by releasing oil droplets that merge into larger drops.

In order to confirm these results and explore the influence of physical and chemical characteristics of the MNT on the EA, the effect of these two parameters on emulsions has been analyzed.



Figure 4. Visual observation of 1% pectin oil-in-water emulsion with addition of MNT at dose of 0.5 (T1) and 1% (T2) MNT.

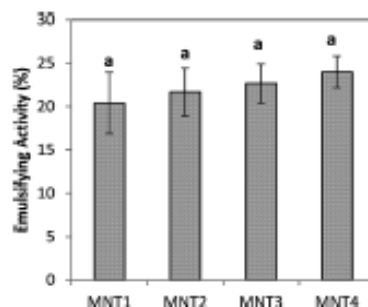


Figure 5. Effect of MNT physicochemical characteristics on the EA considering the four MNT doses and the five pectins concentrations. Different letters means significant differences at p , 0.05.

Increased particle size seems to have a greater negative effect on EA and thus on oil extraction. For each MNT dose, EA showed a rising trend as particle size increased (Fig. 6A). The surface hydrophobicity of MNT increases as particle size was smaller due to an increase in the value of contact angles [35]. Therefore, the high hydrophobicity of MNT1 was predominantly due to the high surface area generated by its smaller particle size.

MNT for oil mill contains significant amounts of by-minerals such as carbonate. Several studies have showed that this component plays a major role in breaking down emulsions during olive paste kneading step [4]. In Fig. 6B, is shown, the use of different MNT doses induced an increase in the EA as the MNT carbonate rate increased in the range 0.5–1.1%. For higher carbonate content (4%) a marked EA decrease was obtained. Therefore, MNT containing high carbonate content showed a better capacity to break oil-in-water emulsions. Carbonate is a rich-calcium

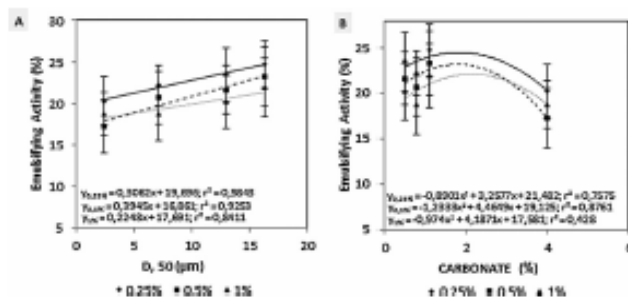


Figure 6. Correlation between EA and MNT physicochemical characteristics applied at different doses. (A) Particle size, D50; (B) carbonate rate.

component and therefore, can enhance the formation of electrostatic complexes between the anionic pectic and calcium anions [36].

4 Conclusions

Results showed the effect of pectins on the oil-in-water interface giving an increase of the EA. It can confirm the role of pectins making oil-in-water emulsion during processing difficult olive pastes. However, this emulsifying effect of pectins can be weakened by the addition of MNT.

The capacity of MNT to break the oil-in-water emulsions could be explained by its hydrophobic character which is responsible for the surface activity of the pectin substances. The addition of MNT to the oil-in-water emulsions generated electrostatic interactions between the co-adjuvant and pectins due to their opposite charges. After olive paste centrifugation, the formed complex is sedimented, leading to a reduction of the pectin molecules adsorbed in the surface of the oil-in-water system; thus generating the break of the emulsions and the decrease of EA caused by the pectic polysaccharides.

The effectiveness of MNT to breaking emulsions depended not only on the dose but also on its physicochemical characteristics. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the lowest EA for a dose of 0.5%. Likewise, the effect of MNT physicochemical characteristics depended on the dose applied to the oil-in-water emulsion. Therefore, a higher efficiency for other MNTs with lower carbonate rate and larger particle size can be achieved by applying higher MNT doses.

This work has been supported by a MAEC-MAEC grant (Cultural and Scientific Relations Office of the Spanish Agency for International Cooperation), the research projects FEDER P10-AGR-6690 (Junta de Andalucía) and FEDER-INIA RTA2008-00066-C03-01. The authors gratefully acknowledge their financial support.

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Angerosa, F., Mostalino, R., Basti, C., Vito, R., Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oil. *Food Chem.* 2001, 72, 19–28.
- DiGiovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M., Serraiocco, A., Influence of malaxation time of oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y Aceites* 2002, 53, 179–186.
- Clodoveo, M. L., Dipalmo, T., Schiano, C., La Nave, D., What's now, what's new and what's next in virgin olive oil elaboration system? A perspective on current knowledge and future trends. *J. Agri. Eng.* 2014, 14, 49–59.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjutant extractant. *J. Food Eng.* 2009, 92, 112–118.
- Moya, M., Espínola, F., Fernández, D., De Torres, A., et al., Industrial trials on coadjutants for olive oil extraction. *J. Food Eng.* 2010, 97, 57–63.
- Dickinson, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloid.* 2003, 17, 25–39.
- Aguilera, M. P., Beltrán, M., Sánchez, S., Uceda, M., Jiménez, A., Kneading olive paste from 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food Eng.* 2010, 97, 533–538.
- Minguez-Mosquera, I., Galardo, L., Roca, M., Pectinesterase and Polygalacturonase in changes of pectic Matter in Olives (cv. Hojiblanca) intended for mill. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 93–99.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contente, S., Iannucci, E., Lucera, L., Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 57–67.
- Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M. C., Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3930–3934.
- Regulation EEC 1513/2001 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union Commission. *Off. J. Eur. Commun.* 2001, 201.
- Cruz, S., Youssfi, K., Pérez, A. G., Mariscal, C., García, J. M., Salt improves physical extraction of olive oil. *Eur. Food. Res. Tech.* 2007, 225, 359–365.
- Pérez, A. G., Romero, C., Youssfi, K., García, J. M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjutant. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008, 85, 685–691.
- Koprivnjak, O., Bubola, K. B., Kosić, U., Sodium chloride compared to talc as processing aid has similar impact on volatile compounds but more favourable on ortho-diphenols in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2015, 117, DOI: 10.1002/ejlt.201500014
- Noubigh, A., Abderrabba, M., Provost, E., Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *J. Chem. Thermodynamics.* 2006, 39, 297–303.
- Ben Bahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., Bouaziz, M., Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjutant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT- Food. Sci. Technol.* 2015, 1–10.
- Carrapiso, A. I., García, A., Perrón, J., Martín, L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 583–588.
- Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortiz, A., et al., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas, 1998, Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía.
- Ben-David, E., Karem, Z., Zipori, I., Weissbein, S., et al., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from

- irrigated orchards. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010, 112, 1158–1165.
- [20] Clodoveo, M. L., Malvarion influence on virgin olive oil quality. Past, present and future. An overview. *Trends. Food. Sci. Tech.* 2012, 25, 13–23.
- [21] Jenkins, P., Ralston, J., The adsorption of polysaccharide at the talc-aqueous solution. *Colloids Surf. A* 1998, 139, 27–40.
- [22] Morris, G. E., Pomarino, D., Ralston, J., Polymer depressant at the talc-water interface: Adsorption isotherm, microflotation and electrokinetic studies. *Int. J. Miner. Process.* 2002, 30, 1–17.
- [23] Moore, D. M., Reynolds, R. C. J., *X-Ray Diffraction and the Identification of Clay Minerals*. Oxford University Press, Inc, Oxford, New York 1989.
- [24] Yahia, A., Al-Wakeel, M. L., *Technical Note Talc Separation From Talc-Carbonates Ore to Be Suitable for Different Industrial Applications*. *Miner. Eng.* 2000, 13, 11–116.
- [25] Sánchez, S., Pacheco, R., La Rubia, M. D., Sánchez A., Pereira M. G., Aplicación de distintos talcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: *Acta del Olivo*. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva (Ed.), *Seminario Científico-Técnico*. Espolva, Jaén (Spain) 2007, pp 497–502.
- [26] Alba, J., Moyano, J., Martínez, P., Hidalgo, P., Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. *XII Seminario Científico-Técnico*. Espolva, Jaén (Spain) 2005.
- [27] Uceda, M., Prias, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional*, Córdoba 1975.
- [28] Dalev, P. G., Simeonova, L. S., Emulsifying properties of protein-pectin complexes and their use in oil contain foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 1995, 68, 203–206.
- [29] Pichot, R., Watson, R. L., Norton, I. T., Phospholipids at the interface: Current trends and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 11767–11794.
- [30] Pinotti, A., Belvilacqua, A., Zaritzki, N., Optimization of the flocculation stage in a model system of food emulsion waste using chitosan as a polyelectrolyte. *J. Food. Eng.* 1997, 32, 69–89.
- [31] Moreau, L., Kim, H. J., McClement, D. J., Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membranes. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6612–6617.
- [32] Weinbreck, F., Nieuwenhuijs, H., Robijn, G. W., De Kruij, C. G., Complex formation of whey proteins: Extracellular saccharide EPS B40. *Langmuir* 2003, 9, 9404–9410.
- [33] Ganzevles, R. A., Martien, A., Smart, C., Van Vlier, T., Jongh, H. H. J., Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air-water interface. *Food Hydrocolloid.* 2006, 20, 872–878.
- [34] Ganzevles, R. A., Polysaccharide charge density regulating protein adsorption to air/water interfaces by protein/polysaccharide complex formation. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 12969–12976.
- [35] Öksüz, M., Broglu, M., Yıldırım, H., Effect of talc on the properties of polypropylene/ethylene/diene terpolymer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 101, 3033–3039.
- [36] Nguyen, H. V., Savage, G. P., The effect of temperature and pH on the extraction of oxalate and pectin from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.), golden kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.), kiwiberry (*Actinidia arguta*) and persimmon (*Diospyros kaki*). *Int. J. Food. Sci. Tech.* 2012, 48, 794–800.

Research Article

Micronized natural talc affects the proteins and pectic cell wall polysaccharides during “Hojiblanca” virgin olive oil extraction

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco² and Gabriel Beltrán¹¹ IFAPA Center “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, Mengibar, Jaén, Spain² Department of Chemical, Environmental and Material Engineering, University of Jaén, Jaén, Spain

This work studies how using MNT affects cell wall polysaccharides and proteins of “Hojiblanca” paste during virgin olive oil extraction. Four doses of MNT were assessed: 0, 0.25, 0.5, and 1%. Three pectic fractions were extracted from alcohol insoluble solids (AIS): water-soluble pectin (WSP), chelate-soluble pectin (CSP), and non-soluble pectin (NSP). In general, the content of the three pectic fractions decreased throughout the kneading step. This indicated a significant degradation and solubilization of pectins during processing. The same trend was observed for protein content and total pectin content while AIS yield increased. Addition of MNT at doses lower than 0.5% favored the formation of a chemical bound through electrostatic interactions between proteins and pectic polysaccharides which are held together and adsorbed onto the talc surface giving a decrease in their content. Higher MNT doses (1%) produced the opposite behavior. The lowest dose of MNT (0.25%) reduced the oil losses in the pomace. A certain tendency for the loss of oil in the pomace to decrease as the amount of total pectin and protein decreased was observed, indicating that the oil yield is at least in part, related to the pectin and protein content depending on the dose of MNT added during malaxation step.

Practical application: We have demonstrated that the use of talc during the malaxation step greatly lessens the effect of the pectic substrates and proteins, principal emulsifier agents that influence the formation of oil-in-water emulsions during oil extraction process and enhance the extraction of the oil from the mesocarp cells by reducing its loose in the pomace. Excess of talc addition presented a reverse effect, though. It is, therefore, of the utmost importance that the information contained in this study is fully taken into account to establish the suitable dose of talc that should be applied when difficult pastes are formed during malaxation step and which at least partially depends on the content of proteins and pectin compounds of the processed olive paste.

Keywords: Electrostatic interaction / Micronized natural talc / Oil yield / Pectin / Protein

Received: January 26, 2016 / Revised: May 23, 2016 / Accepted: June 28, 2016

DOI: 10.1002/ejlt.201600039

Supporting information available online <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201600039>

Correspondence: Abir Sadkaoui, IFAPA Center “Venta del Llano”, Junta de Andalucía, Ctra. Bailén-Morri Km 18.5, E-23620 Mengibar, Jaén, Spain

E-mail: abir_sadkaoui@yahoo.fr

Fax: +33 1 47 99 54 90

Abbreviations: AIS, alcohol insoluble solids; AK, after kneading; ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; CSP, chelate-soluble pectin; CWP, cell wall protein; GA, galacturonic acid; MNT, micronized natural talc; NMR, nuclear magnetic resonance; NSP, non-soluble pectin; PG, polygalacturonase; PM, pomace moisture; PME, pectin methyl esterase; PODW, pomace oil content on dry weight; POFW, pomace oil content on fresh weight; P-PS, protein-polysaccharide complex; Pr, protein; TP, total pectin; VOO, virgin olive oil; WSP, water-soluble pectin

1 Introduction

Virgin olive oils are obtained from the fruit of the olive tree solely by mechanical or other physical means under conditions that do not lead to alteration in the oil [1]. It involves three successive operations: olive crushing, kneading of olive paste, and separation of the oil by pressure or centrifugation [2]. The objective of fruit milling is breaking the plant tissues in order to liberate the oil drops contained in the mesocarp cells. Olive paste malaxation helps the small oil droplets formed during the milling to merge into larger drops [3]. The efficiency of kneading operation depends on olive paste rheological characteristics and kneading variables

such as time, temperature and technological coadjutant addition [4]. During oil extraction process, olive paste shows some physicochemical changes in the structural constituents of the cell wall and intercellular tissues. The resulting texture and other characteristics of the processed tissue are different from those of untreated plant tissue [5].

Pectins are components of the fruit cell walls that make important contributions to the olive paste texture [6]. They are bound to cellulose microfibrils in the cell wall and during processing, their structures are broken by naturally occurring enzymes. Mínguez-Mosquera et al. [6] reported that pectinases are responsible for the changes occurring in the pectic composition of olive fruits during processing. During fruit milling and/or paste malaxation a significant part of the oil may be emulsified and then, it could not be extracted by centrifugation. This lower oil yield is characteristic of the so-called “difficult pastes” [4, 7]. The high pectin and protein content of unripe olive fruits may contribute to the formation of these emulsions [8, 9].

To break down such emulsions, some technological coadjutants have been successfully developed, e.g., cellular walls degrading enzymes [10] using a combination of pectolytic, cellulolytic, and hemicellulolytic plant enzymes which degrades these cell walls or the vegetable colloids (pectins, hemicelluloses, etc.) and allows a significant improvement of the oil extracted from these “difficult” pastes [10]. Nevertheless, the use of technological coadjutants producing a chemical or biochemical action is forbidden by European Regulations on VOO production [1]. The use of talc powder [11–14], salt [15, 16], and calcium carbonate [17] has been proposed as physical acting coadjutants alternative to enzymes. The addition of these physical coadjutants in olive oil processing during the malaxation phase, is known to promote the breakdown of oil/water emulsions and consequently make oil extraction easier, thus increasing the yield [18]. However, calcium carbonate and salt are not permitted for use as processing aids in the production of virgin olive oil according to European standards [1]. Actually, micronized natural talc, the natural form of the hydrated magnesium silicate of particle size lower than 40 µm, $Mg_3(Si_4O_{10})(OH)_2$, is the most widely used coadjutant for oil extraction [19, 11, 14] due to its exclusively physical action [20]. This coadjutant has been authorized and regulated by the Spanish Ministry of Health [21] and due to its exclusive physical action does not contradict to the EU restrictions. The talc has a laminate microcrystalline structure with a neutral electric charge and a high lipophilic character (that is, a high capacity of absorption of oil) [20]. It is added to the olive paste during the malaxation process at different doses between 0.3% and 1% of the weight of the olive being milled to help for processing these difficult pastes [22]. This treatment achieves an effective physical blockage of the emulsifying action of the cell wall derivatives, producing higher oil yields and oils with lower water and suspended solids content [19]. Even though the

improvement in oil yield reached by this coadjutant, the main disadvantage is that talc can adsorb a third part of its weight in oil [23]; therefore, an excessive amount of talc may produce a big loss of oil since the oil disappears during the centrifugation together with the solid residues [20].

The technological effect of this coadjutant may be attributed to the adsorption of proteins and polysaccharides such as pectins [24, 25], however, the mechanism of adsorption of these polymers at the talc-aqueous-oil solution interface is poorly understood.

So far as can be ascertained, no quantitative study has been established on the relative merits of MNT as technological aid in decreasing the emulsifying effect of pectin and protein compounds, principal emulsifying agents of the olive fruit.

This study was aimed to provide deeper insights into the clarification of the effect of the addition of micronized natural talc (MNT) at different doses on the content of pectin and protein compounds, during “Hojiblanca” olive oil extraction at industrial scale.

2 Materials and methods

2.1 Raw material

For this work, olive trees (*Olea europaea*, L.) of “Hojiblanca” cultivar with a similar crop load were selected. The trees were spaced 7 × 7 m and grown in the experimental orchard of IFAPA Center in Cabra, Córdoba (Spain) using standard growing techniques. The study was performed during 2012/13 crop year. About 6000 kg of olives were harvested by mechanical shaker with a ripening index of 4.53 determined according to the method described by Uceda and Frías [26].

2.2 Olive oil extraction conditions

The oil extraction was carried out at industrial scale in the IFAPA “Venta Del Llano” oil mill. The olives were leaf-removal and not washed. Olive batches of 600 kg were crushed in a metallic hammer mill with a sieve size of 6 mm, filling each batch a malaxer container. The IFAPA “Venta Del Llano” oil mill (Pieralisi, Spain) was equipped with a thermobearer formed by three containers, a two to three phases horizontal centrifuge SC-90 (working at two phases way) with a theoretical processing capacity of 45 000 kg/day and a vertical centrifuge for oil cleaning P1500. The process was controlled and monitored by Prociolo automation software (Prociolo, Seville). The olive paste was loaded at 950 kg/h in the horizontal centrifuge. Talc was added at the beginning of the malaxation phase by an automatic MNT dispenser previously calibrated. Four doses of MNT were added (0, 0.25, 0.5, and 1%). Talc characteristics (Microtalc FC8-AW, Mondo Mineral, Spain) were as follows: average particle size, 2.4 µm; percentage of carbonate (mainly of

calcium), 4%; specific area $7\text{ m}^2/\text{g}$ and density 2.77 g/cm^3 . The olive paste was kneaded at 27°C for 60 min.

2.3 Sampling

Olive paste samples were collected just crushed and at the end of malaxation for each experiment of MNT doses. Pomace samples were taken from the horizontal centrifuge outlet for the last 15 min of each assay in order to accurate the stabilization of the decanter performance. All samples were collected by triplicate. Replicates were taken at 5 min intervals.

2.4 Oil and moisture content

Crushed olives and pomace were weighted (30 g) and dried until constant weight in an oven at 105°C . The moisture was expressed as percent. Oil content was analyzed by a nuclear magnetic resonance (NMR) fat analyzer mq 10NMR (Bruker, Spain) and were expressed as percent on dry weight basis. The equipment was calibrated periodically, for both fruit and pomace, by Soxhlet analyses using n-hexane as extracting solvent.

2.5 Olive paste analysis

2.5.1 Extraction of alcohol-insoluble solids

Alcohol insoluble solids (AIS) were prepared following the procedure previously described by Levi et al. [5]. About 5 g of olive paste was grinded in a polytron three times with 70% EtOH followed by two extractions with acetone. The AIS were dried at room temperature until constant weight. AIS content was expressed as percent on a fresh matter basis.

2.5.2 Fractionation of pectic polysaccharides

Fractions of different cell wall components were obtained by sequential chemical extraction of the cell wall material (AIS) using water (to extract water-soluble pectins, WSP), 0.1 M buffer Tris/HCl and 0.2% EDTA (to extract ionically bound pectins or chelate-soluble pectin, CSP) and 0.05 M NaOH (to obtain covalently bound pectins or non-soluble pectin fraction, NSP) as described previously by Levi et al. [5]. Total pectin content was obtained summing the three pectic fractions.

2.5.3 Galacturonic acid analysis

Pectin fractions, extracted as described above, were analyzed for galacturonic acid (GA) content using m-hydroxydiphenyl (MHDP) following the procedure used by Blumenkrantz and Asboe-Hansen [27] and modified by Knter and Van Buren [28]. Absorbance was measured at 520 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio, Spain). Results were expressed as milligram of GA per 100 g of AIS.

2.5.4 Extraction and quantification of total protein in the alcohol insoluble solids

Aliquots of AIS (15 mg) were homogenized for 30 s in an Eppendorf tube with 1.5 mL of NaOH 1 M and heated in a water bath at 100°C for 10 min. The suspension was centrifuged twice at $13\,200\text{g}$ for 10 min. The crude extract used for the determination of total protein content in the AIS was quantified using the dye-binding method of Bradford [29] using bovine serum albumin (BSA) as standard. Proteins are expressed as milligrams per gram of AIS.

2.6 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed. When a significant *F* value was found, Turkey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3 Results and discussion

3.1 Changes in cell wall components during malaxation

The influence of malaxation process using different amounts of talc doses on the content of alcohol insoluble solids, pectic cell-wall polysaccharides, and proteins in the olive paste was studied.

3.1.1 Alcohol insoluble solids (AIS)

As can be observed in Table 1, AIS of olive paste samples before kneading accounted about 35.3% and increased after kneading step with a final paste showing an AIS value of 40% probably due to a decrease in the soluble solid content of the processed olive paste [30]. These changes during kneading may affect substantially the rheological properties of the malaxed paste [5], its behavior during the solid-liquid separation step, and its oil yield.

The use of MNT affected significantly the alcohol insoluble solids content of the malaxed olive paste (Table 2).

Table 1. Effect of malaxation on the alcohol insoluble solids (AIS), total pectin (TP), and cell wall proteins content of olive paste

	Before kneading	After kneading
AIS (%)	$35.3 \pm 1.2^{\text{b}}$ *	$40 \pm 1.4^{\text{a}}$
TP (mg/100 g AIS)	$1738 \pm 79^{\text{a}}$	$1275 \pm 83^{\text{b}}$
Pr (mg/g AIS)	$7.83 \pm 0.10^{\text{a}}$	$7.10 \pm 0.22^{\text{a}}$

* Different letters within a row mean significant differences ($p < 0.05$) with respect to process step.

[†] Mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Table 2. Partial mean squares from analysis of the effect of MNT addition on alcohol insoluble solids, pectic fractions, proteins content of the malaxed olive paste, and moisture and oil content of the pomace

Parameter	DF ^a	Total 11	MNT ^b 3	Error 8
AIS _{AK}	MS ^b		35.22	16.68
	SST ₀ ^c		88.74	11.26
	P		0.0004	
WSP _{AK}	MS ^b		22313.7	2061.8
	SST ₀ ^c		80.23	19.77
	P		0.0034	
CSP _{AK}	MS ^b		16801.7	361.5
	SST ₀ ^c		94.57	5.43
	P		0	
NSP _{AK}	MS ^b		35119.4	4275.4
	SST ₀ ^c		75.49	24.51
	P		0.008	
TP _{AK}	MS ^b		1499.12	10824
	SST ₀ ^c		83.85	16.15
	P		0.0016	
Pr	MS ^b		0.75	0.006
	SST ₀ ^c		97.9	2.1
	P		0	
PM	MS ^b		1.87	0.38
	SST ₀ ^c		64.95	35.05
	P		0.03	
PODW	MS ^b		3.11	0.58
	SST ₀ ^c		66.74	33.26
	P		0.03	

^aDegree of freedom.

^bMean square.

^cPartial mean square for the effect expressed as percentage of the total correct sum of squares; P: statistical significance.

The highest AIS value (40%) was obtained for the control carried out without talc addition (Fig. 1). The addition of MNT up to 0.5% reduced the AIS, while greater dose (1%) led to its increase. These results indicate that the use of MNT at doses ranging between 0.25 and 0.5% resulted in a greater adsorption of alcohol-insoluble polymers onto the talc surface when compared to higher doses (1%) [24].

3.1.2 Pectic cell wall polysaccharides

The distribution of the GA in the different pectin fractions during olive paste malaxation is shown in Fig. 2. For the three studied fractions, it was observed that there was a decrease in their contents throughout the olive paste kneading. Before malaxation, among the pectic cell wall polysaccharides, CSP was found to be the minor fraction (around 424 mg GA/100 g AIS) showing a slight decrease ($p \leq 0.05$) after malaxation

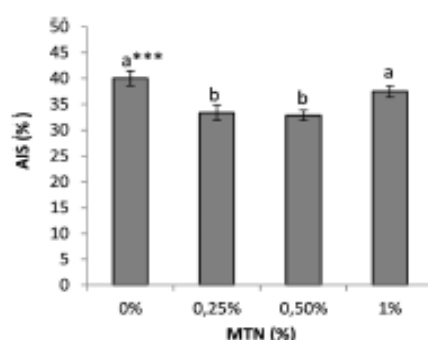


Figure 1. Effect of MNT addition on the alcohol insoluble solids (AIS) content of olive paste during malaxation. Significant differences at * p : 0.05; ** p : 0.01; *** p : 0.001.

(359 mg GA/100 g AIS). Similar decreases in the content of CSP have been reported for Jalapeño peppers as a consequence of processing [31].

WSP was detected at higher content than CSP in all the analyzed olive pastes. Its content varied between 473 mg GA/100 g AIS in olive paste before kneading and 434 mg GA/100 g AIS after kneading. The lower amount of CSP compared to WSP could be explained by a decreased ionic cross-linking as a result of the increased degree of methyl esterification during processing. Before kneading, both soluble fractions (WSP and CSP) represent pectins that have been solubilized from cell wall during ripening process, mainly composed by the initially soluble material and pectins solubilized from the tightly cell wall-bound fractions. The decrease observed for both of them after malaxation

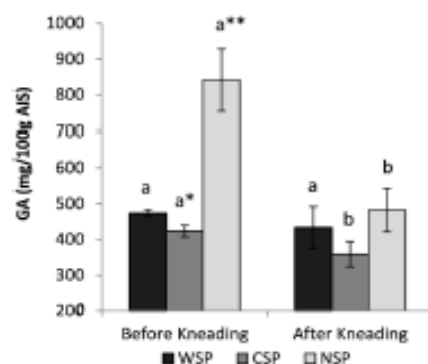


Figure 2. Effect of malaxation on the pectin fractions content of olive paste: WSP, CSP, NSP. Significant differences at * p : 0.05; ** p : 0.01; *** p : 0.001.

indicates that chemical changes occur in the pectin cell wall polysaccharides leading to their solubilization [32]. In regard to NSP (Fig. 2), considered as the main pectic fraction, it showed a similar reduction in its content after malaxation. This phenomenon was also observed in broccoli and was attributed to the conversion of protopectin into soluble pectin by the solubilization and/or β -eliminative depolymerization of this material [33].

Total pectin content (TP) decreased after olive paste kneading (Table 1) and results are in agreement with those published by Cámara Hurtado et al. [32] who noticed a loss of pectin content accompanied by a steady and substantial decrease in pectin polymers size during processing. The fact that the malaxed paste showed lower pectin content than that before kneading suggests that olive paste heating during malaxation may produce depolymerization of these compounds. Significant correlations were found between NSP fraction and WSP ($r^2=0.76$), CSP ($r^2=0.98$), and TP ($r^2=0.99$) probably associated with their degree of solubilization [6]. Generally, de-esterified pectins mainly composed by NSP are less susceptible to degradation and less soluble [34]. From these observations and the results of previously reported works, it can be deduced that during malaxation, specific biochemical and/or chemical transformations occur in the pectin cell wall polysaccharides of the olive paste. Three different mechanisms have been proposed to explain these structural alterations: (1) the activity of endogenous pectin degrading enzymes including pectinmethylesterase (PME) and polygalacturonase (PG) [35, 6]; (2) depolymerization by β -elimination [36]; and (3) acid hydrolysis [37]. The significance of these biochemical processes depends mainly on enzymatic levels in olives, characteristic of each olive cultivar as well as some other factors exogenous to the paste itself [38]. However, the modification of the chemical characteristics of pectin by processing induces alterations in its functional properties such as rheological behavior and gelling ability [39] affecting to its capacity to bind with MNT. In fact, as shown in Table 2, the use of MNT affected significantly the content of pectic substances following the same trend observed for AIS (Table 3). The addition of MNT up to 0.5% produced a decrease in the three pectic fractions and the total pectin

content in the malaxed olive paste. This could be explained by the occurrence of electrostatic interactions between the coadjutant and pectins because of their opposite charge leading to higher adsorption of pectic polymers onto the talc surface [40]. In this case, there was enough talc present with positive charge to completely compensate the negative charge of the pectins. However, increasing the dose of talc to 1% resulted in a decrease in pectin adsorption onto the talc surface due to the apparition of free pectic polysaccharides that could not be complexed with MNT. As pectins are anionic hydrocolloid emulsifiers [41], they interact with the positive face of the talc particles [40]. Formation of pectin-MNT complexes contributes to the weakening of the emulsifying effect caused by pectic polysaccharides affecting to VOO extractability and oil yield [40].

Changes in the pectic fractions content of the malaxed olive paste using different MNT doses respect to that obtained before kneading are shown in Table 4. Addition of MNT during malaxation allowed a reduction in the content of most of the pectic fractions. As MNT dose was increased, the reduction percentage of NSP and TP was lower. For WSP fraction, the opposite occurred with an increase in the reduction percent of between 10.9 and 22.5%. The best reduction was achieved for NSP fraction at 0.25% while the lowest one was achieved for the same fraction at 1%. This result seems to indicate that NSP showed higher capacity to bind and adsorb onto talc particles at lower doses, while higher doses decreased its adsorption properties. However, CSP increased about 11.6% when MNT doses of 0.5 and 1% were added showing its highest adsorption at lower doses (0.25%). All these differences indicate that during kneading step, the use of MNT differently altered the content of each pectin type suggesting that the chemical characteristics of the pectic compound considerably affects to its adsorption onto the talc particles.

3.1.3 Cell wall proteins (CWP)

Cell wall proteins (CWP) are essential constituents of the olive fruit involved in modifications of cell wall components, wall structure, signalling, and interactions with plasma membrane at the cell surface [42]. Table 1 shows the effect

Table 3. Effect of talc addition on pectin fractions and total pectin content of olive paste after malaxation

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
WSP (mg/100 g AIS)	434 ± 59 ^a	293 ± 39 ^b	244 ± 51 ^b	261 ± 26 ^b
CSP (mg/100 g AIS)	359 ± 35 ^a	236 ± 11 ^b	220 ± 7 ^b	354 ± 4 ^a
NSP (mg/100 g AIS)	483 ± 61 ^{ab}	387 ± 55 ^b	348 ± 23 ^b	590 ± 62 ^a
TP (mg/100 g AIS)	1275 ± 83 ^a	915 ± 76 ^b	812 ± 76 ^b	1206 ± 88 ^a

^aDifferent letters within a row mean significant differences ($p < 0.05$) with respect to process step.

^bMean ± SD ($n = 3$).

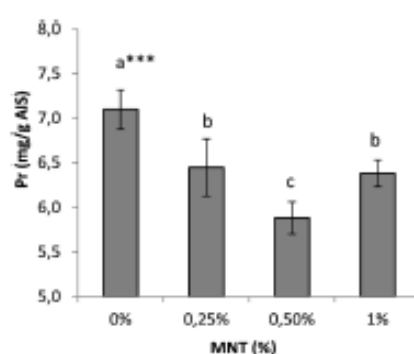
Table 4. Changes in the pectin fractions content after malaxation using different doses of MNT

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
WSP (%)	8.37 ± 0.1*	10.9 ± 0.1	17.8 ± 0.3	22.5 ± 0
CSP (%)	15 ± 0.1	7.9 ± 0.13	−11.6 ± 0.12	−11.6 ± 0.10
NSP (%)	42.7 ± 0.05	37.5 ± 0.17	7.0 ± 0.07	1.0 ± 0.24
TP (%)	26.7 ± 0.06	24.2 ± 0.11	7.7 ± 0.08	4.4 ± 0.11

*Mean ± SD (n = 3).

of olive paste malaxation on the cell wall proteins. Protein content of AIS in the olive paste before kneading was around 7.83 mg/g AIS and decreased until 7.10 mg/g AIS after kneading. This decrease after malaxation may be explained by their complexation with pectic polysaccharides [43]. In this case, the attraction involves positively charged local patches on the protein interacting with the anionic polysaccharide [44, 45]. Formation of protein–polysaccharide (P-PS) complexes depends on many factors such as pH, ionic strength, protein to polysaccharide ratio, total solid concentration, charge density molecular weight and conformation [46]. Leroux et al. [47] found that some pectin fractions are able to improve the emulsification of oil in water, presumably as a consequence of their protein content, low degree of esterification and low molecular weight. The ability of pectins to interact with proteins as a function of their esterification degree and ions content, which are ripening-dependent, has been recently documented [34]. Electrostatic interactions between pectic polysaccharides and proteins may improve the stability of oil-in-water emulsions [48] formed during kneading step. Therefore, an adsorption of proteins–pectin complexes with MNT during olive paste kneading may occur as described for MNT–pectins complex.

The use of MNT affected significantly the protein content of the malaxed olive paste (Table 2). The adsorption of the proteins onto talc was enhanced with doses ranging between 0.25 and 0.5%. Greater dose (1%) resulted in high protein content (Fig. 3). We can deduce from this result that an excess of MNT could not adsorb protein and pectic

**Figure 3.** Effect of MNT addition on the cell wall protein content of olive paste during malaxation. Significant differences at **p*: 0.05, ***p*: 0.01, ****p*: 0.001.

polysaccharides, remaining oil-in-water emulsions during kneading and then reducing the process oil yield.

3.2 Changes in moisture and oil content of the olive pomace during malaxation

Table 5 reports moisture (PM) and oil content of the olive pomace obtained in this work. Oil yield is usually expressed as pomace oil content on fresh weight (POFW), the main oil mill by-product, although when expressed on dry weight basis is not affected by the water addition in the process. Therefore, results and discussion will be based on pomace oil content on dry weight (PODW). The results showed that MNT affected significantly to PM and the POWD of the pomace (Table 2). MNT led to an increase of the oil extraction yield ($p \leq 0.05$). These results agree with previous studies carried out on other cultivars such as "Picual" [4] and "Coratina" [7]. The addition of MNT up to 0.25% decreased the POWD, while higher doses led to its increase. As observed, the use of talc during malaxation step greatly lessens the effect of the pectic substrates and proteins of the olive paste facilitating the release of the cellular oil. The loss of oil in the pomace was lower as the amount of total pectin

Table 5. Effect of talc addition on oil and water content of pomace

	MNT (%)			
	0	0.25	0.5	1
PM (%)	63 ± 0.3 ^a	63.3ab ± 0.6ab	63.7a ± 0.9a	61.8ab ± 0.5b
PODW (%)	13.6 ± 0.7a	11.3 ± 0.7b	11.6 ± 1.2ab	12 ± 0.2ab

*Different letters within a row mean significant differences ($p < 0.05$) with respect to process step.

†Mean ± SD (n = 3).

and protein decreased. Correlations between PODW content and TP content ($r^2 = 0.62$) and protein content ($r^2 = 0.83$) were observed, indicating that the differences observed for PODW are, at least in part, related to the content of the pectin and protein fractions and then to the dose of talc added to the olive paste. During malaxation, the degree of esterification of the pectins contributes to the modulation of their binding to cations [49], and therefore to their complexation with proteins and their adsorption capacity with MNT particles. The high hydrophilic nature of pectin [50] and protein substances [51] enhances their solubility in the water-rich phase of the olive paste favoring their adsorption onto the talc surface through electrostatic interactions which could lead to the weakening of their emulsifying activity and increase the process oil yield.

4 Conclusions

During the olive paste processing, the content of the different pectin fractions as well as that of cell wall proteins changed strikingly. Malaxed olive pastes were characterized by lower amounts of WSP, CSP, NSP and proteins, and higher amount of AIS. This indicates that substantial degradation and solubilization of pectic cell wall polysaccharides and proteins occur during processing. The use of MNT during kneading process markedly reduced the pectin as well as protein content in the olive paste, principal emulsifier agents implied in the formation of oil-in-water emulsions during oil extraction process. This reduction may be explained by the apparition of attractive interactions between protein and pectic polysaccharide in the olive paste during malaxation which are held together and adsorbed onto the talc. This gave rise to their complexation and their elimination with pomace residue. Addition of the MNT in a range of 0.25–0.5% increased the adsorption tendency of the proteins and pectic cell wall polysaccharides onto the talc surface while greater dose (1%) resulted in a decrease in their adsorption capacity. Similar changes were observed for oil content of the pomace residue. Our results highlight the importance of protein and pectic compounds in the talc/cell wall material interactions and how MTN addition helps to break down emulsions during kneading process enhancing the separation and the extraction of the oil from the mesocarp cells and reducing its loss in the pomace.

This work was supported by a MABC-AECID grant (Cultural and Scientific Relations Office of the Spanish Agency for international Cooperation), the research-projects: FEDER P10-AGR-6690 (Junta de Andalucía) and FEDER-INIA RTA2008-00066-C03-01. The authors gratefully acknowledge Bégida Jiménez for the supply of olives for experiments.

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] European Union Commission, Regulation EEC 1513/2001. Amending Regulations 136/66/EEC and 1638/98/EC as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union Commission. *Off. J. Eur. Commun.* 2001, 201.
- [2] Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M. C., Effect of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agr. Food Chem.* 1996, 44, 3930–3934.
- [3] Uceda, M., Jiménez, A., Beltrán, G., Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites* 2006, 57, 25–31.
- [4] Aguilera, M. P., Beltrán, G., Sánchez-Villasciama, S., Uceda, M., Jiménez, A., Kneading olive paste from 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food Eng.* 2010, 97, 533–538.
- [5] Levi, A., Ben-Shalom, N., Plat, D., Raid, D. S., Effect of blanching on pectin constituents and related characteristics of dehydrated peaches. *J. Food Sci.* 1988, 53, 1187–1190, 1203.
- [6] Mínguez-Mosquera, L., Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79, 93–99.
- [7] Caponio, P., Monteleone, J., Martellini, G., Summo, C., et al., Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from *Comastina cultivar* after production and during storage. *J. Oleo Sci.* 2014, 63, 1125–1132.
- [8] Martínez-Moreno, J. M., Pereda, J., Gómez-Herrera, C., Janer del Valle, C., Estudios físico-químicos sobre las pastas de aceitunas molidas XX. Viscosidades de los Alpechines. *Grasas Aceites* 1964, 15, 226–232.
- [9] McColloch, R. J., Nielsen, B. W., Beavers, E. A., Factors influencing the quality of tomato paste: II. Pectic changes during processing. *Food Technol.* 1950, 4, 339–345.
- [10] Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Lucera, L., Del Re, P., Enhancing the quality of virgin olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 216, 109–115.
- [11] Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortiz, A., et al., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtencción por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas. Direc. Gen. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía 1998.
- [12] Ben David, E., Kezani, Z., Zipori, I., Weissbein, S., et al., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from irrigated orchards. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007, 225, 359–365.
- [13] Fernandez, D. G., Espínola, P., Moya, M., The influence of different technological coadjuncts on the quality and yield of virgin olive oil using response surfaces methodology. *Grasas Aceites* 2008, 59, 39–44.
- [14] Carrapio, A. I., García, A., Perrón, J., Martín, L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 583–588.
- [15] Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A. G., Mariscal, C., García, J. M., Salt improves physical extraction of olive oil. *Eur. Food. Res. Technol.* 2007, 225, 359–365.
- [16] Pérez, A. G., Romero, C., Yousfi, K., García, J. M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjunct. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008, 85, 685–691.

- [17] Espinola, P., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjutant extractant. *J. Food Eng.* 2009, 92, 112–118.
- [18] Caponio, P., Squeo, G., Difonzo, G. M., Pasqualone, A., et al., Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality? *J. Sci. Food Agric.* 2016, 96, 3292–3299.
- [19] Alba, J., Muñoz, E., Martínez, J. M., Obtention of olive oil use of additives facilitating its extraction. *Alimentaria* 1982, 138, 25–55.
- [20] Espinola, P., Manuel, M., Torres, A., Castro, E., Comparative study of coadjutants for extraction of olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* 2015, 241, 759–768.
- [21] Ministry of Health, Spain. *Boletín Oficial del Estado* 1986, 19, 3089–3090.
- [22] Clodoveo, M. L., Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future. An overview. *Trends Food Sci. Technol.* 2012, 25, 13–23.
- [23] Moya, M., Espinola, P., Fernández, D., De Torres, A., et al., Industrial trials on coadjutants for olive oil extraction. *J. Food Eng.* 2010, 97, 57–63.
- [24] Liu, G., Peng, Q., Ou, L., Lu, Y., Zhan, G., Adsorption of polysaccharide onto talc. *Miner. Eng.* 2006, 19, 147–153.
- [25] Arsequel, D., Bahoulène, M., Adsorption of various enzymes onto talcs: scope and limitations of this new immobilization system. *Biocatal. Bioprocess.* 1995, 12, 267–279.
- [26] Uceda, M., Prias, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional*, Córdoba, 1975.
- [27] Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., New methods for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 1973, 54, 484–489.
- [28] Kimer, P. K., Van Buren, J. P., Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the methylphenyl method. *J. Food Sci.* 1982, 47, 756–760.
- [29] Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [30] Berry, S. Z., Uddin, M. R., in: G. Kallo (Ed.), *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*, Springer, Berlin, Germany 1991, vol. 14, pp. 99–119.
- [31] Gu, Y. S., Howard, L. R., Wagner, A. B., Physicochemical factors affecting firmness of pasteurized jalapeno pepper rings. *J. Food Quality*. 1999, 22, 619–629.
- [32] Cámara Hurtado, M., Greve, L. C., Labavitch, J. M., Changes in cell wall pectins accompanying tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) paste manufacture. *J. Agr. Food Chem.* 2002, 16, 273–278.
- [33] Christaens, S., Mbong, V. B., Van Buggenhout, S., David, C. C., et al., Influence of processing on the pectin structure-function relationship in broccoli purée. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2012, 15, 57–65.
- [34] Ramos, O. P., Ornelas, J. J., Ruiz, S., Zamudio, P. B., et al., Effect of ripening and heat processing on the physicochemical and rheological properties of pepper pectins. *Carbohydr. Polym.* 2015, 115, 112–121.
- [35] Duvetter, T., Silas, D. N., Van Buggenhout, R., Jolie, R., et al., Pectins in processed fruit and vegetables: Part I: Stability and catalytic activity of pectinases. *Compt. Rend. Food Sci. Food Saf.* 2009, 8, 75–85.
- [36] De Roed, A., Silas, D. N., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrickx, M., Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chem.* 2008, 107, 1225–1235.
- [37] Diaz, J. V., Anthon, G. E., Barren, D. M., Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *J. Agr. Food Chem.* 2007, 55, 5131–5136.
- [38] Gómez, C. H., Matter transfer during virgin olive oil elaboration. *Grasas Aceites* 2007, 58, 194–205.
- [39] Silas, D. N., Smout, C., Elliot, P., Van Loey, A., Hendrickx, M., Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *J. Food Sci.* 2006, 71, 1–9.
- [40] Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., Belmán, G., Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2015, 118, 545–552.
- [41] Moreau, L., Kim, H. J., McClement, D. J., Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membrane. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6612–6617.
- [42] Janet, E., Camut, H., Boudart, G., Port-Leska, R. P., Cell wall proteins: A new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 2006, 11, 33–39.
- [43] Dickinson, E., Protein-stabilized emulsions. *J. Food Eng.* 1994, 22, 59–74.
- [44] Nguyen, T. Q., Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulphate and diethylamino-ethyl dextran. *Macromol. Chem. Phys.* 1986, 187, 2567–2578.
- [45] Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L., Xia, J., Effects of protein charge heterogeneity in protein-polycarbonate complexation. *Macromolecules* 1992, 25, 290–295.
- [46] Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Haady, J., Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1998, 38, 689–753.
- [47] Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J., Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocoll.* 2003, 17, 455–462.
- [48] Li, J. L., Cheng, Y. Q., Wang, P., Zhao, W. T., et al., A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: Generation of an enzymatically cross linked beet pectin layer using horseradish peroxidase. *Food Hydrocoll.* 2012, 26, 448–455.
- [49] Khodmchenko, M. Y., Kolenchenko, E. A., Khorimchenko, Y. S., Khozhaenko, E. V., Kovalev, V. V., Cerium binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2010, 77, 104–110.
- [50] Ferrari, S., Savarin, D. V., Sicilia, F., Gramaglia, G., et al., Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Plant Sci.* 2013, 4, 49.
- [51] Garay, A. A., Colmenero, J. M. P., Garcíarrubio, A., Covarrubias, A. A., Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 5668–5674.

Research Article

Virgin olive oil yield as affected by physicochemical talc properties and dosage

Abir Sadkaoui¹, Antonio Jiménez¹, María P. Aguilera², Rafael Pacheco³ and Gabriel Beltrán¹¹ IFAPA Centro "Venta del Llano", Junta de Andalucía, Ctra. Bailén-Motil, Mengibar (Jaén), Spain² Technological Center of Olive Grove and Oil, Citolina Foundation, Scientific-Technological Park GEOLIT, Mengibar, Jaén, Spain³ Department of Chemical, Environmental, and Material Engineering, University of Jaén, Jaén, Spain

The aim of this work was to assess the effect of physicochemical characteristics of micronized natural talc (MNT) and its dosage on the industrial oil yield (IY) during virgin olive oil (VOO) extraction of Hojiblanca fruits. For this purpose, laboratory scale experiments were performed testing four commercial MNTs differing in their particle size (D50) and carbonate rate at doses ranging from 0 to 3%. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the highest improvement of the IY for a dose of 2%. It was also found that the effect of particles size and carbonate rate depends on the MNT dose, being much more pronounced at lower doses and that the use of MNTs with low carbonate levels or high particle size could be compensated using higher doses of talc.

Practical applications: This study provides deeper insights into the clarification of the effect of the addition of different doses of MNT, with different physicochemical characteristics on oil yield of Hojiblanca olive fruits. The information contained in this study should be taken into account to choose the suitable MNT dose considering its physicochemical characteristics in order to improve the oil yield for the so-called difficult pastes.

Keywords: Carbonate rate / Micronized natural talc / Particle size / Process industrial yield / Talc dose

Received: March 4, 2016 / Revised: July 7, 2016 / Accepted: July 20, 2016

DOI: 10.1002/ejlt.201600112

1 Introduction

Virgin olive oil (VOO) is extracted from olive fruit using only mechanical processes including olives crushing, malaxation

of resulting pastes, and separation of the oily phase essentially by pressure or centrifugation [1].

Oil contained within the mesocarp cells is released during the crushing and malaxing process. In some cases, oil is retained within the cell walls rather than being released during the crushing and malaxation [2]. Such pastes are called fluent or difficult, and are typically obtained from varieties as the Spanish Hojiblanca and Picual, and occasionally from other varieties when freshly harvested olives are processed [3]. Among the factors affecting to extractability of the olive paste can be considered the pectic substances derived from cell wall polysaccharides. These substances are natural emulsifier agents present in olives. They promote emulsion formation and short-term stabilization by interfacial action [4] as confirmed by Sadkaoui et al. [5] who established that increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity. These emulsions are surrounded by lipoproteic membranes preventing the merging of the oil droplets spread in the malaxed olive

Correspondence: Abir Sadkaoui, IFAPA Centro "Venta del Llano," Junta de Andalucía, P.O. Box 50, Mengibar, Jaén E-23620, Spain
E-mail: abir_sadkaoui@yahoo.fr
Fax: +33 1 47 99 54 90

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; D 50, particle size diameter; DF, degree of freedom; FW, fruit weight; IY, process industrial yield; M, moisture content; MNT, micronized natural talc; MS, mean squares; OFDW, fruit oil content on dry weight basis; OFFW, fruit oil content on fresh weight basis; P, statistical significance; r^2 , coefficient of determination; RI, ripening index; S_{avg} , specific surface area; SD, standard error; SST₀, partial mean square for the effect, expressed as percentage of the total corrected sum of squares; SW, stone weight; T, temperature; X_{carb} , percentage of carbonate content in the talc

paste [6]. This phenomenon eventually leads to the production of intermediate phases of very similar density to oil and water difficult to separate and then, affecting the oil mill working capacity and increasing the oil losses in the pomace [7]. In order to break these emulsions and improve the oil yield, different strategies have been successfully developed such as increasing time and temperature of the malaxation and using technological coadjuncts. Regarding the use of technological coadjuncts, a number of trials proved that the addition of enzymes during malaxation step determines an increase in oil extraction yield [8, 9]. However, the use of technological coadjuncts [3] with chemical or biochemical activity is forbidden by European regulations on VOO production [10]. The use of talc powder [11–13], salt [14, 15], and calcium carbonate [16] has been proposed as physical acting coadjuncts alternative to enzymes. Actually, micronized natural talc, the natural form of the hydrated magnesium silicate, $Mg_3(Si_4O_{10})(OH)_2$, is the most widely used coadjunct for oil extraction [11, 13] due to its exclusively physical action [17]. According to Caponio et al. [18], this mineral is widely used due to its intrinsic properties such as chemical inertness [19]. Talc shows both hydrophilic and hydrophobic behavior at its breaking surfaces. After milling, charged and non-charged surfaces are formed as a consequence of particle breaking [20]. This mineral has been found to destabilize emulsions making solid/liquid separation easier and increases the oil yield; reduces notably the amount of fine solids in the oil and does not produce any changes in physical, chemical, or organoleptic properties of the oil [2]. At the end of the extraction process, the talc ends up in the olive pomace, because of its specific weight (2.8 g/cm³), while the oil is free of this substance [18]. However, because talc is a natural product, its physicochemical characteristics vary depending on the deposit and the production location. Each talc mine has its own characteristics and that is why talc grades differ in their performance in the end applications. Among the most studied MNT characteristics, particles size and carbonate rate may affect substantially the industrial oil yield [21–23].

The current work was carried out under controlled laboratory scale conditions in order to gain a better understanding of the effect of different doses of MNTs with different physicochemical characteristics on the industrial oil yield during VOO extraction of Hojiblanca fruits.

2 Materials and methods

2.1 Raw material

Olive trees (*Olea europaea*, L.) of Hojiblanca cultivar with a similar crop load were selected. The trees were spaced 7 × 7 m and grown in the experimental orchard of IFAPA “Venta Del Llano” Mengibar, Jaén (Spain) using standard growing techniques. The study was performed during 2009/

10 crop year. A lot of 200 kg of olives was harvested by hand, homogenized, cleaned, and processed immediately. A total of 100 fruits were taken at random in order to determine their fresh weight, stone weight, and their ripening index determined according to the method described by Uceda and Frías [24].

Some fruits were destoned and the flesh (pulp) was separated. Fruit and flesh were crushed and 60 g of olive paste were dried in a forced air oven at 105°C for 24 h. The dried paste was weighed and the moisture content recorded. The oil content in the fruit was determined using a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) fat analyzer mq 10NMR (Bruker, Spain) and expressed as a percentage on both a fresh and a dry weight basis. The equipment was calibrated periodically by Soxhlet analyses using n-hexane as extracting solvent. Characteristics of the olive fruit used for the experiment are given in Table 1. All the analyzed parameters were those normally detected in olives harvested at a ripening index of 4.5.

Four commercial MNTs have been used; their main physical and chemical characteristics are shown in Table 2.

2.2 Processing and olive oil extraction conditions

Experiments were performed at laboratory scale, using Abencor extraction unit (Abencor series 100, MC2 ingeniería y Sistemas, S.L. Seville, Spain), simulating commercial oil extraction systems. A total of 64 samples (16 treatments × 4 replicates) were processed. Olives were crushed using a 6 mm sieve diameter. The olive paste was then malaxed in a thermo-beater at 28°C for 45 min. In the experiment, a factorial design was selected considering two variables: type of MNT (MNT1; MNT2; MNT3; and MNT4) and MNT doses (0, 1, 2, and 3%). Four replicates were carried out for each treatment. The MNT, when applied, was added at the beginning of malaxation.

The process industrial yield (IY) was defined as the percentage of oil obtained using the Abencor laboratory oil extraction system from 700 to 800 g of olives paste. The volume of olive oil was measured on graduated cylinder and the oil yield was calculated using the olive oil density of 0.915 kg/L. Eq. (1). Results were expressed as percent.

$$IY = \left[\frac{(OV \times 0.915)}{WOP} \right] \times 100, \quad (1)$$

Table 1. Initial composition of Hojiblanca olive fruit employed in the technological assays

RI	M (%)	OFFW (%)	OFDW (%)	FW (g)	SW (g)
4.5	53.87	20.45	44.34	3.70	0.66

RI, ripening index; M, moisture content; OFFW, fruit oil content on fresh weight; OFDW, fruit oil content on dry weight; FW, fruit fresh weight; SW, stone weight.

Table 2. Basic data of the micronized natural talc (MNT) used in the experiment

Coadjutant	Carbonate (%)	Medium particle size D50 (µm)	Density (g/cm ³)	Specific surface B.E.T (m ² /g)
MNT 1	4	2.4	2.77	7
MNT 2	0.8	7.1	2.78	9
MNT 3	0.5	13	2.77	7
MNT 4	1.1	16.3	2.78	6

B.E.T, Brunauer, Emmett and Teller method is the most widely used procedure for the determination of the surface area of solid materials.

where OV is the volume of olive oil obtained from the Abencor system (L) and WOP is the weight of olive fruit paste used (kg).

2.3 Statistical analysis

In the tables, results are expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was applied. Tukey's HSD test was used to determine significant differences between means ($p \leq 0.05$). These determinations were carried out using the software Statistix, Version 9.0.

3 Results and discussion

From the ANOVA (Table 3) was observed as both MNT dose and MNT type showed a very level of significance on the process IY. However, MNT dose could explain the highest percent of variability (55%) over the value achieved by MNT type (12.4%). Interaction between both factors was not significant. These results agreed with previous works [2, 22].

In general, the addition of MNT improved the oil yield in all cases when compared to control without MNT addition (Table 4). These results agree with previous works [12, 25,

Table 3. Partial mean squares from analysis for the effect of talc physicochemical characteristics and dosage on the process industrial yield (IY) of 'Hojiblanca' fruits

	Total	MNT (T)	Dose (D)	T $\times$ D	Error
DF ^a	63	3	3	9	48
MS ^b		6.47	28.62	1.12	0.86
SST ₀ ^c		12.39	54.81	6.46	26.34
p ^d		0.0003	0.0000	0.2579	

^aDegree of freedom.

^bMean squares.

^cPartial mean square for the effect expressed as percentage of the total corrected sum of square.

^dStatistical significance.

Table 4. Effect of MNT dose and physicochemical characteristics on the process industrial yield (IY)

MNT	Carbonate (%)	D 50 (µm)	MTN (%)	Oil yield (%)	Improvement respect to the control (%)
MNT 1	4	2.4	0	8.34 $\pm$ 0.40	–
			1	11.27 $\pm$ 0.56	26
			2	11.84 $\pm$ 0.03	29.56
MNT 2	0.8	7.1	0	8.34 $\pm$ 0.95	–
			1	9.08 $\pm$ 1.02	8.15
			2	10.77 $\pm$ 1.00	22.56
MNT 3	0.5	13	0	7.49 $\pm$ 0.48	–
			1	8.86 $\pm$ 0.33	15.46
			2	10 $\pm$ 0.33	25.1
MNT 4	1.1	16.3	0	8.42 $\pm$ 0.28	–
			1	9.42 $\pm$ 0.32	10.62
			2	10.99 $\pm$ 0.35	23.38
			3	10.98 $\pm$ 0.86	23.32

D 50, particle size; MNT, micronized natural talc; MNT 1, (4% (CaCO₃); 2.4 µm); MNT 2, (0.8% (CaCO₃); 7.1 µm); MNT 3, (0.5% (CaCO₃); 13 µm); MNT 4, (1.1% (CaCO₃); 16.3 µm).

26] that reported higher yields when MNT was used. The capacity of talc to increase oil yields could be explained by its exclusively physical action since it adsorbs the droplets of oil retained in the cell walls, forming larger drops, thereby facilitating the oil extraction [6]. In the olive paste, oil and water can get entrapped in agglomerating microgels. Additionally, both olive paste and talc have lipophilic characteristics, therefore, they tend to combine with or retain the oil. The talc helps counteract the paste further releasing oil into an extractable form, breaks up these micro gels and release the oil [27]. It also prevent the formation of oil-in-water emulsions and breaks up emulsions previously formed, allowing the oil to be extracted [5, 28, 29].

Because of the higher effect of MNT dose on oil yield, MNT dose effect was analyzed for each MNT independently. It could be observed as the four MNTs behaved differently depending on the dose applied to the olive paste (Table 4). The highest IY values were obtained for MNT1 which produced a lineal increase of the IY as talc was higher. The lowest values were obtained when MNT3 was added at doses ranging between 1 and 2%. Similar trend was observed for the trials carried out with MNT2 and MNT4 only up to the dose of 2% beyond which either a stabilization (MNT 4) or a slight decrease of the IY (MNT 2) was observed.

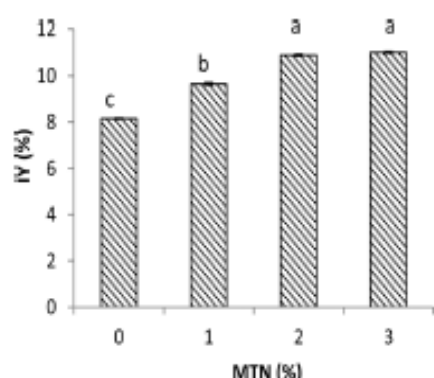


Figure 1. Effect of the MNT dose on the process industrial yield (IV) of Hojiblanca fruits considering the four MNTs together. Different letters means significant differences at p , 0.05.

Considering the pool of four MNTs together (Fig. 1), the addition of MNT at doses ranging between 1 and 2% gave a rise in the IV, while greater doses (3%) did not produce any significant variation on the IV. The doses for talc addition referred in the literature for olive oil extraction range between 0.5 and 2% [28, 29]. However, excessive doses can have a negative effect on the extraction process [28].

In general, at lower doses (1 and 2%), MNT1 showed to be the best coadjutant in terms of extraction efficiency while MNT3 gave the worse results (Table 4). Considering the pool of MNT doses, among the MNT assayed can be observed as MNT 1 gave the highest oil yield achieving significant differences respect to MNT2 and MNT3 (Fig. 2).

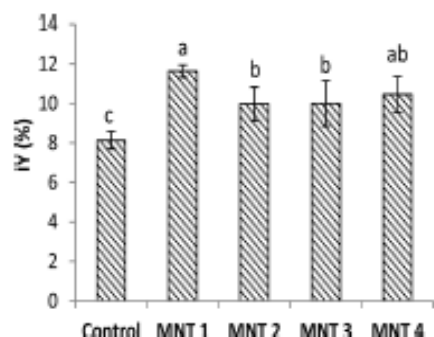


Figure 2. Effect of MNT physicochemical characteristics on the process industrial yield (IV) considering the four MNT doses together. Different letters means significant differences at p , 0.05.

Table 4 shows the percentage of the IV improvement obtained for each talc dose compared to the control. Results indicated that the oil yield improvement was not the same for the different MNTs. The most efficient talc, with an IV improvement of 26% at low dose (1%) was MNT1; while using the same dosage, MNT2 and MNT4 improved the IV only by 8.15 and 10.62%, respectively.

These differences observed in the IV as a response to MNT doses of each MNT tested may be explained by their different physicochemical properties (Table 2) which vary with their original deposit and preparation process. These results agree with those found by others authors [5, 22, 23] reporting as MNT physicochemical characteristics such as the particle size (D 50) and the carbonate rate play an important role in breaking oil-in-water emulsions and then improving the oil extraction process.

Lower D 50 and thus, greater active surface area allow a better adsorption of the droplets of oil retained in the cell walls, forming larger drops, thereby facilitating the extraction of this oil. Higher carbonate rate allows the enhancement of the breakdown of oil-in-water emulsions by releasing oil droplets that merge into larger drops as described by Alba et al. [23] and Sadkaoui et al. [5].

When IV is represented as function of carbonate content (Fig. 3A) can be observed that IV increased as the carbonate rate in the talc was higher. Furthermore, the effect of carbonate rate depended on the talc dose being much more pronounced at lower doses. The highest IV value was obtained using the higher MNT concentration (2 and 3%) of MNT with the highest carbonate rate (4%) while the lowest value was achieved using the smallest concentration (1%) of MNT with the lowest carbonate rate (0.5%). Therefore, MNTs with lower carbonate rate need higher doses to achieve IV similar to those obtained from low carbonate rate MNT.

Considering the particle size (Fig. 3B), higher D 50 seems to have a negative effect on the IV although it depended on the talc dose. At 1%, the extraction efficiency showed highest differences for smallest particle size. For higher doses, differences between MNT with higher carbonate rate and the others was lesser. This result suggests that higher doses are recommended to improve the extraction efficacy when MNT with high D 50 are used. In general, IV was greater when MNT with small particle size and high carbonate rate are used. This results confirms those published by Alba et al. [23], Sánchez et al. [22]; and Sadkaoui et al. [5] reporting that MNT containing high carbonate content and low D 50 shows a better capacity to break oil-in-water emulsions and gives higher oil yields.

According to Öksüz et al. [30], the surface hydrophobicity of the MNT increases as particle size is smaller due to an increase in the value of contact angles. Based on this finding, it can be deduced that MNT 1 had the highest hydrophobic surface area. Likewise, Casanova et al. [31] found that a decrease in particle size produces an increase in the surface

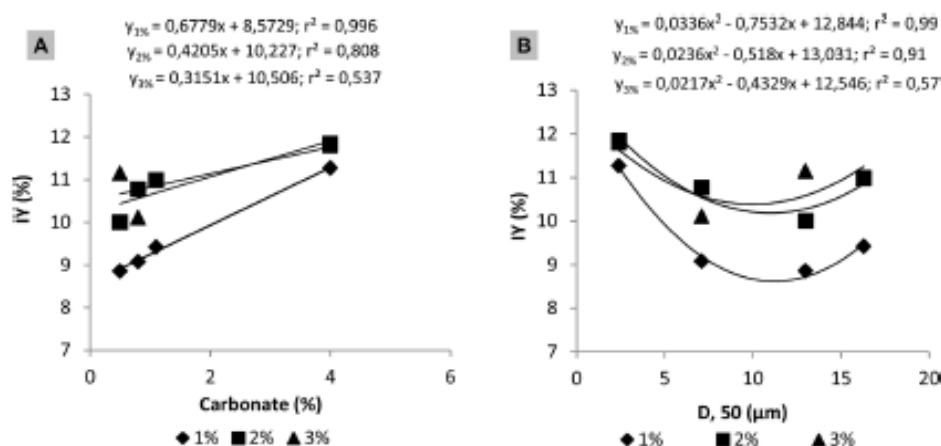


Figure 3. Correlation between the process industrial yield (IY) and MNT physicochemical characteristics applied at different doses. (A) Carbonate rate; (B) particle size.

area (S_{MNT}) of the adsorbed oil. Therefore, IY may have a direct relationship with the S_{MNT} of the talc. Because the effectiveness of the MNT depended not only on its surface area but also on its carbonate fraction (X_{Carb}) (as observed in this work) it is possible to bring this two terms together as S_{MNT}/X_{Carb} in order to study its influence on the IY. Considering the four MNTs together, Fig. 4 shows as the increase of S_{MNT}/X_{Carb} induced a lineal decrease of the IY,

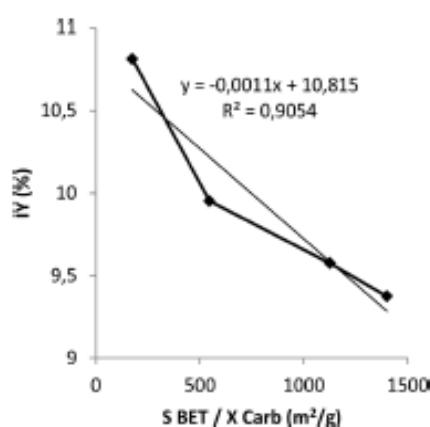


Figure 4. The process industrial yield (IY) as a function of the specific surface area/weight carbonate fraction (m²/g).

then a close relationship between the IY and the S_{MNT}/X_{Carb} was obtained ($p \leq 0,01$) with a r^2 value of 90%.

4 Conclusions

The use of MNT improves the IY. In general, the use of MNT doses ranging between 1 and 2% gave rise to a lineal increase of the IY whereas higher doses did not improve the oil extractability. The effectiveness of MNT to increase the IY depended not only on the dose but also on its physicochemical characteristics. The most efficient MNT was characterized by the highest carbonate rate and the lowest particle size achieving the highest improvement of the IY and oil loss for a dose of 2%. Besides, it was found that low carbonate levels or high particle sizes could be compensated with higher doses of talc. Therefore, MNT doses should be adapted to MNT physical and chemical characteristics in order to optimize the oil yield. These results can be easily scaled for its application at industrial scale since Abencor system has been considered as a useful method for olive oil extraction studies.

This work has been supported by a MAEC-ABCID grant (Cultural and Scientific Relations Office of the Spanish Agency for international Cooperation), the research-projects: FEDER P10-AGR-6690 (Junta de Andalucía), and FEDER-INLA RTA2008-00066-C03-01. The authors gratefully acknowledge their financial support.

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- [1] Servili, M., Picquadio, P., De Stefano, G., Taticchi, A., Sciancalepore, V., Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, 104, 483–489.
- [2] Alba-Mendoza, J., Ruiz-Gomez, A., Hidalgo-Casado, P., in: Erickson, D. R., (Ed.), *Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices*, American Oil Chemistry Society, Champaign, Illinois, USA 1990, pp. 341–347.
- [3] Aguilera, M. P., Beltrán, M., Sánchez, S., Uceda, M., Jiménez, A., Kneading olive paste from "Picual" fruits: I. Effect on oil process yield. *J. Food Eng.* 2010, 97, 533–538.
- [4] Dickinson, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* 2003, 17, 25–39.
- [5] Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., Beltrán, G., Effect of micronized natural talc physicochemical characteristics and dose on the breakdown of oil-in-water emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2015, 118, 545–552.
- [6] Clodoveo, M. L., Durante, V., La Notte, D., Punzi, R., Gambacorta, G., Ultrasound-assisted extraction of virgin olive oil to improve the process efficiency. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 1062–1069.
- [7] Canamasso, P., Use of coadjuncts in olive oil extraction. In: *Australian and New Zealand Olive Grower and Processor* 2006, pp. 29–32.
- [8] Ranalli, A., De Maria, G., Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1105–1113.
- [9] Sharma, R., Sharma, P. C., Rana, J. C., Joshi, V. K., Improving the olive oil yield and quality through enzyme-assisted mechanical extraction, antioxidants and packing. *J. Food Process Preserv.* 2013, 157–166.
- [10] European Union Commission, Regulation EEC 1513/2001. Amending Regulations 136/66/EEC and 1638/98/EC as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. European Union Commission. *Off. J. Eur. Commun.* 2001, L201, 4–7.
- [11] Carrapiso, A. I., García, A., Perrón, J., Martín, L., Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 583–588.
- [12] Ben David, E., Kerem, Z., Zipori, I., Weissbein, S., et al., Optimization of the Abencor system to extract olive oil from irrigated orchards. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007, 109, 359–365.
- [13] Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortiz, A., et al., Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas, Direc. Genl. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía. 1998.
- [14] Cruz, S., Yousfi, K., Pérez, A. G., Mariscal, C., García, J. M., Salt improves physical extraction of olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* 2007, 225, 359–365.
- [15] Pérez, A. G., Romero, C., Yousfi, K., García, J. M., Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjunct. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008, 85, 685–691.
- [16] Espinola, F., Moya, M., Fernández, D., Castro, E., Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjunct extractant. *J. Food Eng.* 2009, 92, 112–118.
- [17] Espinola, F., Manuel, M., Torres, A., Castro, E., Comparative study of coadjuncts for extraction of olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* 2015, 241, 759–768.
- [18] Caponio, F., Squeo, G., Dionzo, G., Pasqualone, A., et al., Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality. *J. Sci. Food Agric.* 2016, 96, 3292–3299.
- [19] Nkumbou, C., Villieras, P., Njopwouo, D., Ngoune, C. Y., et al., Physicochemical properties of talc ore from three deposits of Lamai Pongue area (Yaounde Pan-African Belt, Cameroon), in relation to industrial uses. *Appl. Clay Sci.* 2008, 41, 113–132.
- [20] Rosenberg, B., Patel, A. J., Chandler, D., Molecular explanation for why talc surfaces can be both hydrophilic and hydrophobic. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 20521–20527.
- [21] Moya, M., Espinola, F., Fernández, D., De Torres, A., et al., Industrial trials on coadjuncts for olive oil extraction. *J. Food Eng.* 2010, 97, 57–63.
- [22] Sánchez, S., Pacheco, R., La Rubia, Sánchez, A., Pereira, M. G., Aplicación de distintos talcos naturales, como coadyuvantes tecnológicos, en los procesos de extracción de aceites de oliva. En: *Acta del Oliva. Fundación para la promoción, el desarrollo del olivar y del aceite de oliva* (Ed.), Simposium Científico-Técnico. Espolva, Jaén (Spain) 2007, 497–502.
- [23] Alba-Mendoza, J., Moyano, J., Martínez, P., Hidalgo, P., Influencia de la granulometría y del contenido de carbonatos del talco sobre el rendimiento en aceite de oliva virgen. XII Simposium Científico-Técnico. Espolva, Jaén (Spain) 2005.
- [24] Uceda, M., Prias, L., Épocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y la calidad del aceite. *Proceeding II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba (Spain)* 1975.
- [25] Caponio, F., Monteleone, J. I., Martellini, G., Summo, C., et al., Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from Coratina cultivar after production and during storage. *J. Oleo. Sci.* 2014, 63, 1125–1132.
- [26] Caponio, F., Squeo, G., Monteleone, J. I., Paradiso, V. M., et al., First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield, chemical composition and volatile compounds of the oils. *LWT – Food Sci. Technol.* 2015, 64, 439–445.
- [27] Martínez Moreno, J. M., *Fundamentos Físico-Químicos de la Tecnología Oleícola*. Ed. CSIC, Madrid, Spain 1972.
- [28] Uceda, M., Jiménez, A., Beltrán, G., Olive oil extraction and quality. *Grasas Aceites* 2006, 57, 25–31.
- [29] Cert, A., Albam, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M. C., Effect of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin oils obtained by centrifugation. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3930–3934.
- [30] Öksüz, M., Eroglu, M., Yüldirim, H., Effect of talc on the properties of polypropylene/ethylene/diene terpolymer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 101, 3033–3039.
- [31] Casanova, H., Orrego, J. A., Zapata, J., Oil absorption of talc minerals and dispersant demand of talc mineral non-aqueous dispersions as a function of talc content: A surface chemistry approach colloids and surfaces A: physicochem. *Eng. Aspects* 2007, 299, 38–44.

Changes in Biochemical Composition and Activity of Some Cell Wall Degrading Enzymes Involved in the Ripening Process of Olive Fruit.

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Research paper written for publication in BMC Plant Biology

BMC
Plant Biology



Abstract

Background. The olive is one of a major agricultural importance in Spain and the majority of countries with Mediterranean climate as the source of olive oil. The study of ripening in the olive is of great interest, because it influences the industrial production of olive oil and olive processing. Ripening is usually associated with fruit softening resulting from modification and/or degradation of cell wall polysaccharides and cell-wall associated enzymes. A two-year laboratory filed experiment was carried out during 2011 to 2013 in order to study the main compositional and biochemical changes affecting to the olive cell walls during the course of ripening of three of the major olive cultivars in Spain: ‘Arbequina’, ‘Picual’ and ‘Hojiblanca’.

Results. It was found that the three cultivars had very high levels of non-soluble fraction at early maturity that decreased markedly as ripening progressed. The gradual decrease in the non-soluble fraction (NSP) was parallel to an increase in water-soluble (WSP) and chelate-soluble (CSP) fractions. This data suggests a progressive change in the equilibrium and composition between pectic fractions and confirms the existence of a coordinated interaction between all of them. Results also revealed that for all cultivars polygalacturonase (PG) activity was detected both in ripe green and ripe black fruits, confirming the coexistence of two PG isoforms: Endo-PG and Exo-PG. Pectate-liase (PcL) and pectin-liase (PL) activities significantly increased as ripening proceeded, decreasing markedly as fruit ripened.

Conclusion. Results obtained in this study revealed that the major compositional changes in the fruit are developmentally regulated due to the action of multiple enzymes among the most important ones PG and PLs which act to promote the

coordinated disassembly of primary cell wall components leading to the increase of the oil released from the mesocarpic cells.

Keywords: olive fruit / ripening process / cell wall degrading enzymes / pectin / firmness / water-soluble pectin (WSP) / chelate-soluble pectin (CSP) / non-soluble pectin (NSP) / Total Pectin (TP) / oil yield.

Olive pulp paste viscosity as affected by ripening stage and mixing process

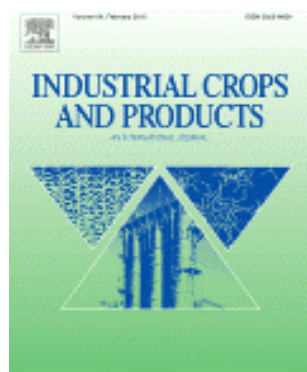
Abir Sadkaoui^{1,2*}, Cassandre Leverrier³, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco²; Gabrielle Moulin³, Gabriel Beltrán¹, Gérard Cuvelier³.

¹IFAPA Center “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. Ctra. Bailén-Motril Km 18.5, E-23620, Mengíbar (Jaén), Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

³UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

Research paper written for publication in Industrial Crops and Products



Abstract

This study was performed to replicate a mixing process of olive pulp pastes at a laboratory scale using a controlled stress rheometer in order to evaluate the main changes affecting their flow behavior as well as their viscosity that would be difficult to determine at a mill scale. Two mixing temperatures were tested: 20°C and 30°C. Weltman model was used to describe the time-dependent behavior of these products. Results revealed that olive pulp pastes exhibited a time-dependent behavior, in which, the apparent viscosity (η_{app}) decreases with time and temperature of shearing. This behavior was more or less pronounced depending on the maturity stage of the fruit. At a macroscopic level, these variations in viscosity are often associated with structural changes affecting the cell wall materials. The main factors that could better explain the differences in η_{app} of olive pulp pastes during mixing process are: particle shape, particle concentration, rigidity, deformability, distribution of the liquid phases among them the oily phase, coalescence rate of oil droplets, particle–particle interactions and hydrodynamic forces exerted by the mobile in motion on the different paste particles and those exerted between the latters and the measurement body.

Keywords: ripening process/ mixing temperature / industrial extracted oil yield / viscosity / pectin content

Modeling of Rheological Behavior of Olive Fruit Pulp Harvested at Different Stages of Ripening

Abir Sadkaoui^{1,2*}, Cassandre Leverrier³, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabrielle Moulin³, Gabriel Beltrán¹, Gérard Cuvelier³.

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía. Ctra. Bailén-Motril Km 18.5, E-23620, Mengíbar (Jaén), Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

³UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

Research paper written for publication in Journal of Food Engineering



Abstract

This work was initiated to establish the effect of state of ripening on the rheological behavior of the olive pulp paste of the major olive (*Olea europaea* L) cultivars in Spain: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' harvested at three stages of ripening from ripe green to black color stage. Results revealed that olive pulp pastes presented a typical shear thinning (pseudoplastic) behaviour and had a good correlation with the Power Law model. The values of the flow behaviour index (n_{ow}) and consistency index (K_{ow}) were influenced by the genetic and the climatic factor. It was also found that this pseudoplastic behavior decreased as ripening progresses probably as a result of cell wall disassembly and oil accumulation which may lessen the internal frictions forces between the polymers, reduce the viscosity thus producing softer systems.

Keywords: ripening stage / olive pulp paste / rheological behavior / shear thinning behavior / flow behavior index / consistency index

Rheological Properties of Mesocarp Olive Oil as Influenced by Ripening Process

Abir Sadkaoui^{1,2*}, Cassandre Leverrier³, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco²; Gabrielle Moulin³, Gabriel Beltrán¹, Gérard Cuvelier³.

¹IFAPA Center "Venta del Llano". Junta de Andalucía. Ctra. Bailén-Motril Km 18.5, E-23620, Mengíbar (Jaén), Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

³UMR Ingénierie Procédés Aliments, AgroParisTech, Inra, Université Paris-Saclay, 91300 Massy, France

Research paper written for publication in European Journal of Lipid Science and Technology



Abstract

This research is done on three of the major olive oil varieties cultivated in Spain ('Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'). Fresh fruits were harvested randomly between the ripe green and black color stage for oil extraction in order to determine the effect of ripening process on the flow behavior of the olive oil. Data obtained from apparent viscosity (η) were used to describe the flow behavior by the power law model in the forward (increasing shear rate) measurement. Results indicated that η changed significantly over sampling time following an exponential rate. With regard to the consistency coefficient (K_{ow}), a linear increase in its value was observed throughout ripening process for all cultivars with an average value being less than the unity. Concerning the flow behavior index (n_{ow}), its value was around the unity characterizing a Newtonian fluid behavior. However, this behavior was only observed for oils extracted from fruits harvested at their ripe green and turning color stages; for those extracted from fruits harvested at their full maturity, it exhibited a shear thinning behavior characterized by a value of the n_{ow} being less than the unity. The more general trend was that the n_{ow} decreased with increasing ripening stage.

Practical Applications: Knowledge of the viscosity of virgin olive oils (VOOs) is of a great interest since it determines the overall quality and stability of the processed oil. Furthermore, investigation of the changes in viscosity of the olive oil throughout ripening process can be considered as a key indicator to optimize the time required for the settling step at the end of the production chain for the studied sampling stages.

Due to the lack of knowledge on the flow behavior of this product and in order to have deep information on the physical changes affecting such edible oil, the purpose of this paper was to study the effect of ripening stage on the rheological properties of three of the main monovarietal oils produced in Spain: Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca'.

Keywords: olive oil / viscosity / flow behavior index / consistency index / ripening process

Industrial Extracted Oil Yield as affected by Crushing Level, Malaxation Conditions and Talc addition

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Research paper written for publication in European Journal of Agronomy



Abstract

This study was carried out with the aim to evaluate the effect of some variables involved in crushing and malaxation process on the industrial oil yield (IY) of extra virgin olive oils from 'Hojiblanca' olives that represent one of the most influential Mediterranean olive oils cultivars. Results showed that the main factor affecting the IY was talc addition whereas the effect of crushing level and kneading temperature varied depending of the MNT dose. When adding talc, the IY was significantly higher than in case of control. The highest increase was observed crushing the olive with a 6mm sieve diameter, malaxing the paste at 20°C and adding MNT at a dose of 3%. The same result was obtained using a thinner milling (5mm) and adding MNT up to a dose of 2% due to a better breakage of fruit tissues and release of oil drops contained in the vegetable cell vacuoles.

Keywords: extra virgin olive oil / 'Hojiblanca' cultivar / crushing level / malaxation temperature / talc addition / industrial extracted oil yield

Effect of Micronized Natural Talc Addition on Olive Oil Quality and Physicochemical Composition of Hojiblanca Cultivar

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Research paper written for publication in Postharvest Biology and Technology



Abstract

The effect of micronized natural talc (MNT) addition during kneading process of 'Hojiblanca' olive fruits at oil mill scale on oil yield, some quality parameters, polyphenols, pigments and tocopherols was examined. Fruits were at the outset processed without MNT and then with incremented doses of MNT. Results indicate that the addition of MNT to the olive paste during malaxation has important advantages such as an increase in the industrial extracted oil yield (IEOY) without affecting negatively the quality parameters which are relevant in the official olive oil grading (K_{232} , K_{270} , peroxide index and acidity). It also caused a substantial increase in total phenol, α -tocopherols and total tocopherols content and contributes in obtaining clean oils from the decanter with a lower water and fine particles content.

Keywords: Micronized natural talc / malaxation process / quality parameters / industrial extracted oil yield / polyphenols / tocopherols / pigments

Influence of Different Harvest Date on Fruit (*Olea europaea*. L) Quality during Ripening Process using Chemometric Approach

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Research paper written for publication in Journal of Food Composition and Analysis



Abstract

Characterization of pomological characteristics of olive fruits from three Spanish cultivars: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' throughout ripening process were investigated. The study was achieved during the crop years: 2011/2012 and 2012/2013. Results indicated that the majority of pomological characteristics of the fruit are mainly affected by maturation stage. The majority of these parameters, i.e. moisture content of pulp and fruit, oil content both in pulp and fruit expressed as percentage on fresh mater, increased throughout ripening process, whereas moisture content of pomace residue diminished lineally for all cultivars during the 'on year' (2011/12) while varied apparently erratically during the 'off year' (2012/13). Principal component analysis confirmed the main correlations among characters and showed them to be dependent of harvest time, cultivar and climate factor. Furthermore, from the results of analyses achieved in this work, we can deduce that the harvest time of the olives is dependent on variety and climate. Moreover, in order to ensure a good extraction yield with high quality oils, maturity indexes might be applied as being between 2.5 and 3.5 for all cultivars.

Keywords: harvest date / maturation stage / pomological parameters / principal component analysis / cultivar / climate

Influence of Different Harvest Date on Quality and Physicochemical Composition of Olive (*Olea europaea*. L) Oils during Ripening Process using Chemometric Approach

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Research paper written for publication in *Scientia Horticulturae*



Abstract

Characterization of virgin olive oils from three Spanish cultivars: 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca' throughout ripening process was investigated. The study was achieved during the crop years: 2011/2012 and 2012/2013. Olive samples were harvested every two weeks throughout the period from the end of September to the end of January. Results revealed that as ripening progresses, extinction coefficients, natural antioxidants (polyphenols and tocopherols), bitterness index as well as pigments content showed more complex behavior depending both on genetic and climatic factors. With advancing maturity stages, the oil becomes less stable due to decreasing total polyphenol content and decreasing chlorophyll content. Significant correlations were found between several characters including bitterness index and total polyphenol content throughout ripening process whereas lower correlations were obtained between K_{232} and whole analyzed physicochemical parameters. Principal component analysis confirmed the main correlations among characters and showed them to be dependent of harvest time, cultivar and climate factor. We also concluded that in order to ensure a good extraction yield with high quality oils, maturity indexes might be applied as being between 2.5 and 3.5.

Keywords: Virgin olive oil / ripening process / polyphenols / bitterness index / tocopherols / extinction coefficients

II CONTRIBUCIÓN A CONGRESOS

- 1 Congreso:** XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva: Foro de la Industria oleícola, Tecnología y Calidad. Mayo 2011.

Fecha: 11-14 de Mayo de 2011.

Lugar: Jaén-España.

Comunicación científica (comunicación oral): Evaluación del Efecto de las características físicas y Químicas del Talco en el rendimiento del proceso de Extracción de Aceite de Oliva de la Variedad 'Hojiblanca'.

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.
- 2 Congreso:** XVI Simposio científico-técnico del aceite de oliva: Foro de la Industria oleícola, Tecnología y Calidad. Mayo 2013.

Fecha: 8-10 de Mayo de 2013.

Lugar: Jaén-España.

Comunicación científica (póster): Cell Wall Pectic Polysaccharides of Olive (*Olea europaea* L) Fruit Pulp (Cv. 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca') and their Evolution during Ripening.

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.
- 3 Congreso:** VII CYTA, Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Junio 2013.

Fecha: 12-14 de Junio de 2013.

Lugar: Córdoba-España.

Comunicación científica (comunicación oral): Influencia de la Actividad de la Pectinmetilesterasa sobre el Proceso de Degradación de la Pared Celular y la Regulación de la Biosíntesis de Metanol durante el Proceso de Maduración de la Aceituna (*Olea europea* L.).

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.
- 4 Congreso:** 3rd EPNOE International Polysaccharide Conference: Polysaccharide and polysaccharide-derived products, from basic science to applications. Octubre 2013.

Fecha: 21-24 de Octubre de 2013.

Lugar: Niza-Francia.

Comunicación científica (póster): Involvement of Cell Wall Degrading Enzymes in the Regulation of Pectic Cell Wall Disassembly and Methanol Accumulation during Olive (*Olea europaea* L) Fruit Ripeness.

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.

- 5 **Congreso:** 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering: Food Technologies. Innovations in Food Processing. Septiembre-Octubre 2014.

Fecha: 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2014.

Lugar: Barcelona- España.

Comunicación científica (resumen): Effect of Micronized Natural Talc Physico-Chemical Characteristics and Dosage on the Breakdown of Oil-in-Water Emulsions

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.

- 6 **Congreso:** 13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering: Food Technologies. Innovations in Food Processing. Septiembre-Octubre 2014.

Fecha: 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2014.

Lugar: Barcelona- España.

Comunicación científica (resumen): Effect of Micronized Natural Talc Addition on the Dissolution of Proteins and Pectic Cell Wall Polysaccharides during Industrial Processing of 'Hojiblanca' Olive oil.

Autores: Abir Sadkaoui, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, Gabriel Beltrán.

Evaluación del Efecto de las características físicas y Químicas del Talco en el rendimiento del proceso de Extracción de Aceite de Oliva de la Variedad ‘Hojiblanca’.

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Comunicación Oral en Congreso. Año 2011. Jaén, España

XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva: Foro de la Industria oleícola, Tecnología y Calidad

Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de las características físicas y químicas del microtalco natural (granulometría de partícula y contenido en carbonato) sobre el rendimiento del proceso de extracción de la variedad “Hojiblanca”. Se han empleado cuatro tipos de microtalco comerciales y para cada uno de ellos, se establecieron cuatro dosis (0,1, 2 y 3%). En general, el rendimiento industrial (RI) del proceso se incrementa linealmente a medida que aumenta la dosis de talco adicionado del 0 al 2 %, dosis superiores no mejoraron la extractabilidad observada. Asimismo, se ha demostrado que las características físico-químicas de los talcos tienen una gran incidencia sobre el RI. En general, hay una tendencia a aumentar linealmente dicho parámetro a medida que aumenta el porcentaje de carbonato contenido en el talco. Sin embargo, se observó una disminución del RI a medida que aumenta el diámetro de las partículas D50 de 2.4 a 13 μm , aumentando ligeramente para D 50 superiores (16.3 μm).

El efecto tanto de la granulometría como del porcentaje de carbonatos depende de la dosis de talco empleada, siendo mucho más marcado a bajas dosis. Por tanto, niveles bajos de carbonato o tamaños de partículas elevados se podrían compensar con dosis altas de talco (2%). En definitiva, la eficiencia de los diferentes talcos depende no sólo de la dosis sino también de sus características físico-químicas.

Keywords: dosis de talco / granulometría y contenido en carbonato de los talcos / batido / rendimiento industrial del proceso de extracción

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL TALCO EN EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE OLIVA DE LA VARIEDAD HOJIBLANCA

¹Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los materiales, Universidad de Jaén, Spain.
E-mail: gabriel.bellera@uji.es

INTRODUCCIÓN

En algunas regiones olivícolas se presentan serias dificultades técnicas en la extracción del aceite con ciertos tipos de aceitunas ya que dan lugar a patillas difíciles como es el caso de la variedad 'Hojiblanca'. La adición de microscato natural (MTN) como coadyuvante tecnológico se ha comprobado que permite incrementar el rendimiento del proceso sin afectar los parámetros físico-químicos del aceite. A ser un producto natural, la composición del tálco puede variar en función de los yacimientos de procedencia. La preparación del MTN, tras su extracción también puede ser otro factor diferenciador (Sánchez et al., 2005). Entre las características químicas que pueden variar destaca la presencia de diferentes proporciones de carbonatos, mientras que es la granulometría la principal variable física que diferencia entre los diferentes talcos, dependiendo de forma directa en el rendimiento del proceso (Alas et al., 2006). De otra parte, diferentes dosis de talco han sido estudiadas mostrando que dosis altas pueden conducir a pérdidas de aceites en los crujeos, ya que el talco puede retener más materia que la de lo normal.

OBJETIVO

Se ha planteado en este trabajo un estudio comparativo entre diferentes tipos de microalgaes naturales comercializados analizando la influencia de la dosis así como de las características físicas y químicas del mismo sobre el rendimiento industrial del proceso de extracción de la variedad "Hollblanca".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: El Trabajo se ha realizado durante la campaña 2009/2010. Los frutos utilizados proceden de olivos de la variedad "Hojiblanco", cultivados en el jardín de variedades del centro IFAPA "Venta del Llano" en Mengibar (Jaén).

Extracción de aceite: El aceite fue extraído mediante sistema Abencor (Abengoa, Sevilla) (Martínez et al., 1975). Una vez terminado el batido, este se centrifuga durante 1 minuto, recogiendo la parte líquida en una probeta. Una vez decantado y claramente separado el aceite del alpechín, se mide el volumen del aceite y se determina el rendimiento industrial del proceso de extracción (R1).



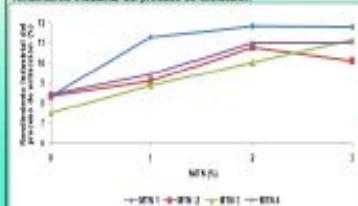
Tabla 1. Características físicas y químicas

Tip de lazo	Carbono %	Gravimetrica N H, g/g	Densidad rel. g/cm ³	Superficie especifica BET, m ² /g
HTN1	4	24	2,7	7
HTN2	0,8	7,5	2,8	8
HTN3	0,5	10	2,7	7
HTN4	11	63	2,8	6

Se ha evaluado el efecto del las características físicas y químicas de los cuatro laticos comerciales ensayados sobre el rendimiento del proceso de extracción y en este caso se ha elegido

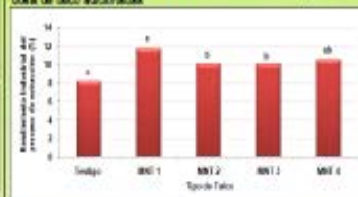
RESULTADOS

Figura 1. Influencia de la dosis y del tipo de talco sobre el rendimiento industrial del proceso de extracción.



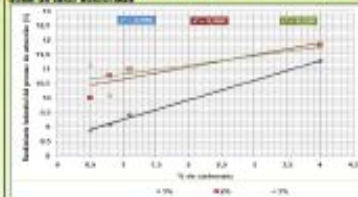
El uso de los diferentes leños dio lugar a un aumento del rendimiento industrial en diferentes proporciones, cuando se comparan con el testigo.

Figura 2. Efecto del tipo de talco sobre el rendimiento industrial del proceso de extracción de los frutos considerando al conjunto de las dosis de talco adicionadas.



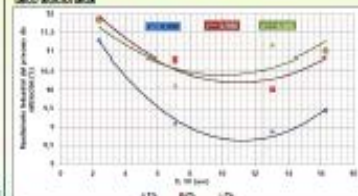
Los mejores rendimientos industriales se obtuvieron añadiendo talco tipo MTN 1, obteniéndose diferencias significativas ($p < 0,001$) respecto a los obtenidos con los talcos MTN 2 y MTN 3 y al testigo.

Figura 3. Correlación entre el porcentaje de carbonato contenido en el talco y el rendimiento industrial del proceso de extracción para cada dosis de talco adicionada.



El efecto del porcentaje de carbonato depende de la dosis de talco, siendo mucho más marcado a dosis bajas. Por tanto, niveles bajos de carbonato se pueden compensar empleando dosis de talco más elevadas.

Figura 4. Correlación entre el tamaño de partícula D50 y el rendimiento industrial del proceso de extracción para cada dosis de talco adicionada.



El efecto de la granulometría de las partículas depende de la dosis de talco aplicada, siendo mucho más marcada a bajas dosis. Así pues, granulometría alta de las partículas de talco se pueden compensar con dosis más elevada con objeto de mejorar la eficiencia del talco.

Tabla 2. Porcentaje de mejora del rendimiento industrial del proceso de extracción.

Tipo de lámpara	Carbonato, %	D-50, μm	WT%, %	Mejora en relación al diseño (%)
MTN-1	4	2,4	1	26
			2	25,66
			3	29,32
			4	3,15
MTN-2	8,8	7,1	2	22,66
			3	17,51
MTN-3	3,5	13	2	15,48
			3	25,1
			4	30,83
MTN-4	1,1	9,3	1	19,82
			2	23,38
			3	23,33

A doce años de talco (3%), los rendimientos industriales más altos han sido obtenidos añadiendo talco tipo MTN 3. El talco más eficiente a baja dosis (1%) fue el MTN 1 caracterizado por el tamaño de partícula el más pequeño y el contenido en carbonato el más alto.

CONCLUSIÓN

Se puede establecer que el uso de talco dio lugar a un aumento del R_0 en diferentes proporciones cuando se comparan con el testigo. Asimismo, se ha demostrado que las características físico-químicas de los talcos tienen una gran incidencia sobre el R_0 . En general, el efecto tanto de la granulometría como del porcentaje de carbonato depende de la dosis de talco empleada, siendo mucho más marcado a bajas dosis. Por tanto niveles bajos de carbonato o tamaños de partículas elevados se podrían compensar con dosis altas de talco (2%). Para la obtención de los mejores rendimientos industriales habría que adaptar la dosis de talco a las características físico-químicas del mismo.

REFERENCIAS

- [illegible]



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJO DE AGRICULTURA Y PISCICULTURA



AGRADECIMIENTOS

El trabajo en las Escuelas a cargo de padres o otros funcionarios de la Iglesia católica ha sido considerado internacionalmente para el desarrollo educativo y por la UNESCO en el primer decenio del siglo XXI como una de las estrategias más efectivas para el desarrollo humano y social, como se ha señalado.

Cell Wall Pectic Polysaccharides of Olive (*Olea europaea* L) Fruit Pulp (Cv. 'Arbequina', 'Picual' and 'Hojiblanca') and their Evolution during Ripening

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Poster en Congreso. Año 2013. Jaén, España

XVI Simposio científico-técnico del aceite de oliva: Foro de la Industria oleícola, Tecnología y Calidad

Abstract

The aim of the present research is to investigate the effect of harvest date on the pectic fractions of three of the major olive cultivars for oil extraction in Spain: "Arbequina", "Picual" and "Hojiblanca".

Pectic polysaccharides in olive fruits (*Olea europaea* L) have been studied at different stages of ripening. The alcohol-insoluble solids (AIS) obtained from the fruit were fractioned into three groups of pectic polysaccharides, namely water soluble pectin (WSP), chelator soluble pectin (CSP) and non-soluble pectin (NSP). The amount of total pectin (TP) was calculated summing all the pectic fractions.

Variations in AIS are related to the change of the fruit weight (FW) throughout ripening process. Indeed, the increase of FW was accompanied by a lineal decrease of the AIS content. Nevertheless, at the final stage of ripening, FW decline induced a gradual increase in the yield of AIS which can be attributed to a rise of both intercellular and starch as a metabolic response of the fruit to the dehydration.

The three cultivars had very high levels of NSP fraction at early maturity, the step from ripe-green to small reddish spot, which decreased markedly as the fruit matured.

At the same time, the gradual decrease in the NSP fraction was parallel to an increase in WSP and CSP fractions. This data suggests a progressive change in the equilibrium and composition between pectic fractions and confirms the existence of a coordinated interaction between the three pectic polysaccharides groups. Moreover, there were evidences of a solubilisation of the non-soluble pectic substances (NSP) to a soluble pectic fraction (WSP and CSP) during fruit ripening.

Keywords: olive fruit / cell wall polysaccharides (CWP) / ripening process / water soluble pectin (WSP) / chelator-soluble pectin (CSP) / non-soluble pectin (NSP) / Total Pectin (TP)



Influencia de la Actividad de la Pectinmetilesterasa sobre el Proceso de Degradación de la Pared Celular y la Regulación de la Biosíntesis de Metanol durante el Proceso de Maduración de la Aceituna (*Olea europea* L.)

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Comunicación oral en Congreso. Año 2013. Córdoba, España

VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Introducción y objetivos

Durante el transcurso del proceso de maduración, los componentes de la pared celular del fruto experimentan notables variaciones estructurales que generan cambios en la textura (Seymour et Gross, 1996). Una de las modificaciones más notorias están relacionadas con la composición de las fracciones pécticas (Marin-Rodriguez, Orchard, & Seymour, 2002). Estas sustancias son sometidas a procesos de despolimerización que contribuyen al ablandamiento del tejido vegetal y afectan las características físicas de las aceitunas. Estos cambios físicos aumentan la capacidad de romper las estructuras celulares facilitando la liberación del aceite de oliva.

El fenómeno de ablandamiento ocurre por la participación de las enzimas pectolíticas, entre otras, la pectinmetilesterasa (PME), que degrada la pectina y el ácido poligalacturónico presente en la pared celular (Imsabai et al., 2002) mediante la catálisis de la hidrólisis de los grupos estéricos metilo a partir de residuos galacturonosilos (Barnavon et al., 2001; Denes et al., 2000).

El objetivo central de este estudio fue contribuir al conocimiento del fenómeno de ablandamiento enzimático de la aceituna mediante la cuantificación de la actividad enzimática de la PME y la posible influencia que éste puede tener sobre el metabolismo de biosíntesis de metanol y el contenido total de las sustancias pécticas durante el transcurso de maduración de la aceituna.

Material y método:

Material Vegetal. El trabajo se realizó durante la campaña 2012/2013. Se emplearon aceitunas de tres variedades de olivo españolas “Arbequina”, “Picual” y “Hojiblanca” procedentes de la finca experimental del centro IFAPA “Venta del Llano”, Mengíbar, Jaén.

Medida de la actividad de la pectinmetilesterasa. La extracción enzimática fue realizada según la metodología establecida por Olías et al. (1993). La evaluación de la actividad de la enzima se determinó por el método de Klavons y Bennett (1986). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de MeOH por minuto y por gramo de proteína.

Contenido de pectina total. La fracción de pectina total se extrajo a partir de los sólidos insolubles al alcohol que fueron preparado según el método propuesto por Levi et al. (1988). La pectina se hidrolizó con ácido sulfúrico concentrado según el método de Ahmed y Labavitch (1977). Posteriormente, el contenido de ácido galacturónico se determinó colorimétricamente según el método descrito por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).

Contenido en metanol. El contenido de metóxilo se determinó por hidrólisis de los enlaces éster de la pectina con NaOH (Ng & Waldron, 1997). El metanol liberado se cuantificó según el método descrito Klavons y Bennett (1986).

Firmeza. Este parámetro se determinó mediante la medida de consistencia del fruto a través la resistencia que éste presenta a la penetración utilizando un penetrómetro (Bertuzzi, model FT 327).

Resultados

Para las tres variedades estudiadas, se pudo constatar que la actividad de la PME tiende a aumentar hacia el estado inicio de maduración de la aceituna, para luego disminuir de forma gradual en los estados maduro y sobremaduro. En cuanto a la firmeza, se observó una disminución acusada de este parámetro en la misma fase en la PME fue más activa, indicando una estrecha correlación entre la firmeza y la actividad enzimática de la PME.

La concentración en metanol y pectina total se correlacionaron con la actividad de la PME, indicando que las sustancias pécticas contribuyen significativamente a la actividad de la PME.

Conclusiones

En general, nuestros resultados muestran que la biosíntesis de metanol así como la degradación de la pared celular (pérdida de firmeza) están controladas por la actividad de las enzimas hidrolasas como PME. En efecto, esta enzima cataliza la hidrólisis de los esterism metílicos de los ácidos poligalacturónicos liberando metanol al medio y convirtiendo a las pectinas en ácidos pécticos.

Involvement of Cell Wall Degrading Enzymes in the Regulation of Pectic Cell Wall Disassembly and Methanol Accumulation during Olive (*Olea europaea*. L) Fruit Ripeness

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro “Venta del Llano”. Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

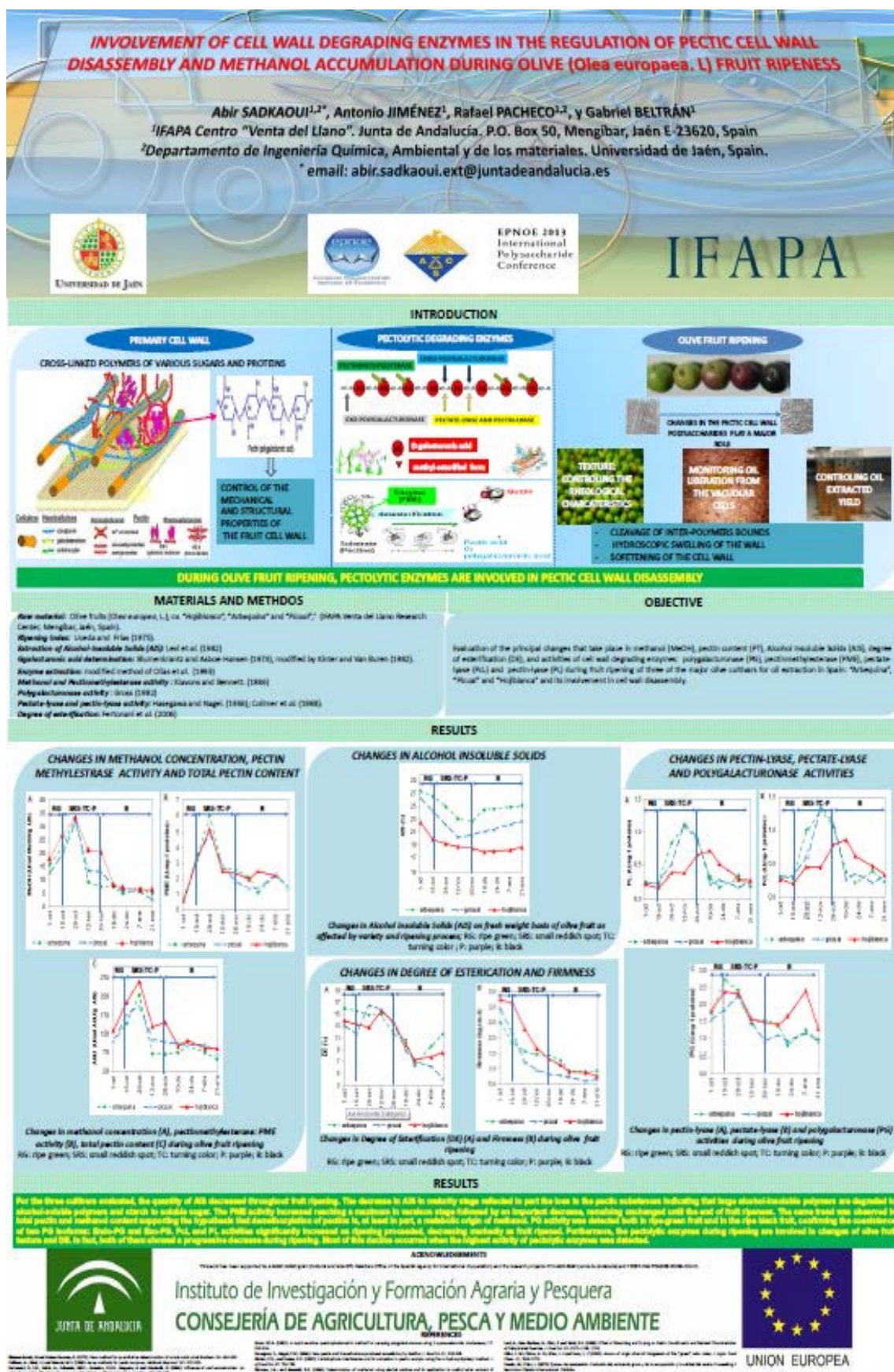
²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Poster en Congreso. Año 2013. Niza, Francia

3rd EPNOE International Polysaccharide Conference: Polysaccharide and polysaccharide-derived products, from basic science to applications’.

Changes in firmness, methanol, pectin content, degree of methyl esterification (DE) and activities of cell wall degrading enzymes, polygalacturonase (PG), pectinmethylesterase (PME), pectate-lyase (PcL) and pectin-lyase (PL) were studied during the fruit ripening of three of the major olive cultivars for oil extraction in Spain: “Arbequina”, “Picual” and “Hojiblanca”. For the three cultivars evaluated, the PME activity increased with fruit maturation reaching a maximum in veraison stage followed by an important decrease, remaining unchanged until the end of fruit ripeness. The same trend was observed in total pectin and methanol content supporting the hypothesis that demethoxylation of pectins is, at least in part, a metabolic origin of methanol. PG activity was detected both in ripe-green fruit and in the ripe black fruit, confirming the coexistence of two PG isoforms: Endo-PG and Exo-PG. PcL and PL activities significantly increased as ripening proceeded, decreasing markedly as fruit ripened. Furthermore, the pectolytic enzymes during ripening are involved in changes of olive fruit texture and DE. In fact, both of them showed a progressive decrease during ripening. Most of this decline occurred when the highest activity of pectolytic enzymes was detected.

Keywords: olive fruit / ripening process / cell wall degrading enzymes / pectin / firmness / degree of esterification / methanol



Effect of Micronized Natural Talc Physico-Chemical Characteristics and Dosage on the Breakdown of Oil-in-Water Emulsions

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Abstract: Congreso Año 2014, Barcelona, España

13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering: Food Technologies. Innovations in Food Processing

Abstract

The use of micronized natural talc (MNT) has proven to be very useful to break down emulsions formed during olive oil kneading process and improve the extraction rate. This study was aimed to obtain more insights in the mechanisms of MNT to break-down oil-in-water emulsions. For this purpose, laboratory scale experiments were performed in order to evaluate the effect of different pectin concentrations (0.5%, 1%, 1.5% and 2%), used as emulsifier agent, on the behavior of oil-in-water interface. Afterward, to evaluate the effect of MNT dosage as well as its physicochemical characteristics on breaking o reducing emulsions, four MNTs differing in their particle size (D50) and carbonate rate were assayed at doses ranging from 0% to 1%. Increasing pectin concentration gave a rise in the emulsifying activity (EA). The emulsifier effect of pectins was weakened by the addition of increasing MNT dose. MNT physicochemical characteristics markedly affected the rupture of oil-in-water emulsions. Nonetheless, their effect depends on the dose of MNT applied to the emulsion. The highest decrease in EA was observed for that MNT with the lowest D50 (2.4 μm) and the highest carbonate rate (4%) at 0.5 %. In general, MNT containing lower D50 and high rate of carbonate showed better capacity in breaking oil-in-water emulsion.

Keywords: Micronized Natural Talc / Pectins/ Emulsifying Activity / Carbonate rate / Particle size / Oil-in-water emulsion / Virgin olive oil.

Effect of Micronized Natural Talc Addition on the Dissolution of Proteins and Pectic Cell Wall Polysaccharides during Industrial Processing of 'Hojiblanca' Olive oil

Abir Sadkaoui^{1,2}, Antonio Jiménez¹, Rafael Pacheco², Gabriel Beltrán¹

¹IFAPA Centro "Venta del Llano". Junta de Andalucía. P.O. Box 50, Mengíbar, Jaén E-23620, Spain.

²Department of Chemical, Environmental and Material Engineering. University of Jaén, Spain.

Abstract: Congreso Año 2014, Barcelona, España

13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering: Food Technologies. Innovations in Food Processing

Abstract

In the present research, we intended to study in more detail the effect of oil extraction process using MNT on the changes in cell wall polysaccharide composition of: 'Hojiblanca' olive cultivar. Industrial scale experiments were performed in the IFAPA pilot plant. Different doses of MNT were assessed: 0, 0.25%, 0.5% and 1% in order to evaluate their effect on protein and pectic cell wall dissolution. The cell wall material was isolated as an alcohol insoluble solid (AIS) and then, three distinct pectic fractions were extracted from it: water soluble pectin (WSP), chelator soluble pectin (CSP) and non-soluble pectin (NSP).

In general, for the three pectic fractions, it was observed a decrease throughout the kneading step and then, a rise in olive pomace. The same trend was observed for total protein content and total pectin content. Conversely, the opposite trend was observed for the yield of AIS which significantly decreased in the pomace respect to the crushed olive paste. This decline may be explained by the degradation of AIS to alcohol soluble polymers. MNT addition strongly decreased both the yield of AIS, protein content as well as the different pectic fractions up to a dose of 0.5%. This finding confirms the existence of an electrostatic interaction between pectins, proteins and MNT (used at doses $\leq 0.5\%$), contributing to their complexation and their elimination within pomace, which obviously explains the increase of their content in this remnant solid after oil extraction. Greater MNT dose (1%) led to a substantial increase in all the studied parameters. Accordingly, we can infer that the excess of MNT couldn't adsorb both protein and pectic polysaccharides, thereby preventing their aggregation and leading to the increase of free-binding pectin and protein in the olive paste which indeed promote to formation of oil-in-water emulsions during kneading process.

Keywords: oil yield / micronized natural talc / pectin / protein / electrostatic interaction.