

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de julio de 2017 (06.07.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/114994 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23B 7/157 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070943

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de diciembre de 2016 (29.12.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201531932
30 de diciembre de 2015 (30.12.2015) ES

(71) Solicitante: CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES];
C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: GANDUL ROJAS, Beatriz; INSTITUTO DE
LA GRASA, QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE
PIGMENTOS, UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE,
Edificio 46 Ctra. de Utrera KM 1, 41013 SEVILLA (ES).
VERGARA DOMÍNGUEZ, Honorio; INSTITUTO DE
LA GRASA, QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE
PIGMENTOS, UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE,
Edificio 46 Ctra. de Utrera KM 1, 41013 SEVILLA (ES).
GALLARDO GUERRERO, M^a Lourdes; INSTITUTO
DE LA GRASA, QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE
PIGMENTOS, UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE,
Edificio 46 Ctra. de Utrera KM 1, 41013 SEVILLA (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén
Dario, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP,
KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR THE OPTIMISATION OF ORGANOLEPTIC PROPERTIES IN VEGETABLE PRODUCTS CONTAINING CHLOROPHYLLOUS PIGMENTS

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS EN PRODUCTOS VEGETALES QUE CONTIENEN PIGMENTOS CLOROFÍLICOS

(57) Abstract: The invention relates to a method that permits the optimisation of organoleptic properties, in particular colour, in fruit and vegetables containing chlorophyllous pigments. For this purpose, the method is based on known techniques, such as treatment with compounds containing Zn, improving the obtained results, by means of a treatment with a buffer acid solution. In this way, products can be produced having a permanent bright green colour, without exceeding the quantity of Zn that is legally permitted, while leaving other organoleptic characteristics, such as taste, unaltered. The method can be applied, in particular, to green table olives, and preferably to green table olives processed by means of alkaline treatment and without fermentation.

(57) Resumen: El objeto de la presente invención es un procedimiento que permite optimizar propiedades organolépticas, especialmente el color, en frutos y vegetales que contienen pigmentos clorofílicos. Para ello, se parte de técnicas conocidas tales como el tratamiento con compuestos que contienen Zn, mejorando los resultados obtenidos, mediante un tratamiento con una solución ácida tamponada. Se consigue obtener de esta forma productos con un color verde brillante permanente sin superar la cantidad de Zn legalmente admitida y al mismo tiempo manteniendo inalteradas otras características organolépticas, tales como el sabor. El procedimiento se aplica particularmente a aceitunas verdes de mesa y preferentemente a aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación.



WO 2017/114994 A1

**PROCEDIMIENTO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PROPIEDADES
ORGANOLÉPTICAS EN PRODUCTOS VEGETALES QUE CONTIENEN
PIGMENTOS CLOROFÍLICOS**

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en al ámbito de la tecnología agroalimentaria.

10

Específicamente, se refiere a un procedimiento que permite optimizar propiedades organolépticas, especialmente el color, en frutos y vegetales que contienen pigmentos clorofílicos. Para ello, se parte de técnicas conocidas tales como el tratamiento con compuestos que contienen Zn, mejorando los resultados obtenidos mediante un

15

tratamiento con una solución ácida tamponada.

Se consigue obtener de esta forma productos con un color verde brillante permanente sin superar la cantidad de Zn legalmente admitida y al mismo tiempo manteniendo inalteradas otras características organolépticas, tales como el sabor.

20

ESTADO DE LA TÉCNICA

Ante la creciente demanda de productos selectos y de calidad, la innovación en el sector de los productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos en general y de

25

la aceituna de mesa en particular, se dirige hacia productos tradicionales, de características organolépticas altamente valoradas por parte del consumidor, pero con un comercio hasta el momento muy localizado, debido a la limitada vida útil de los mismos.

30

La oliva es una drupa de característico sabor amargo debido al glucósido oleuropeína. En su procesado como aceituna de mesa, la eliminación de este componente amargo es la etapa fundamental que permite obtener un producto más apetecible. En función de la variedad, el estado de madurez y del tipo de fruto (entero o partido), este proceso es más o menos intenso, existiendo por tanto un amplio abanico de estilos de

35

elaboración. Aquellos procedimientos que utilizan un tratamiento con solución alcalina

diluida para hidrolizar la oleuropeína son los más extendidos a nivel mundial, como son las aceitunas verdes al *estilo español* o las aceitunas negras oxidadas al *estilo californiano*.

En el *estilo español o sevillano*, tras la hidrólisis alcalina de los componentes amargos,
5 los frutos se acondicionan en salmuera donde experimentan un proceso de fermentación ácido-láctica y adquieren sus apreciadas características organolépticas. En la actualidad, sin embargo, están ganando importancia comercial otras preparaciones denominadas "especialidades" de aceitunas verdes que incluyen un tratamiento alcalino de los frutos pero no una fase de fermentación. Tienen
10 características y nombres específicos en los diferentes países productores: *Campo Real* en España, *Castelvetrano* en Italia, *Picholine* en Francia, y aceitunas verdes estilo *Californiano* o *greenripe olives* en Estados Unidos. Además de su sabor suave y ligeramente alcalino, una de las características organolépticas más deseables y apreciadas de estos productos es un color verde brillante lo más parecido posible al
15 del fruto fresco, lo que el consumidor tiende a correlacionar con un producto más natural o menos elaborado.

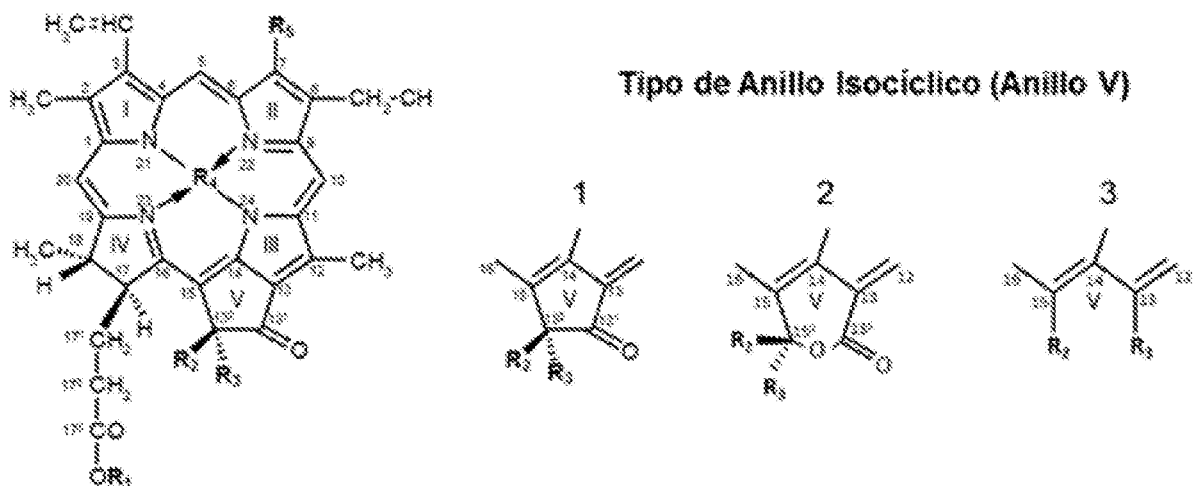
Desgraciadamente, durante la fase de conservación, el color se modifica significativamente obteniéndose un producto de color muy alejado del "verde natural"
20 esperado por el consumidor/productor. En España se han realizado algunos estudios encaminados a implementar un procedimiento industrial para este tipo de especialidades (Brenes y García. "Elaboración de aceitunas denominadas *Green ripe olives* con variedades españolas". Grasas Aceites (2005) 56, 188-19; Casado, Sánchez, Rejano y Montaña "Estudio de nuevos procedimientos de elaboración de
25 aceitunas verdes tratadas con álcali, no fermentadas, conservadas mediante tratamientos térmicos". Grasas y Aceites (2007) 58, 275-282). Todas estas preparaciones de aceitunas que no incluyen fermentación tienen en común un pH en la pulpa relativamente elevado que obliga, según las Normas de Calidad que regulan el comercio de la aceituna de mesa [Codex Alimentarius Commission (FAO/WHO)
30 (1981) Norma del Codex para las aceitunas de mesa (Codex Stan 66-1981). Revisión 1987] a la aplicación de algún tratamiento térmico para asegurar su conservación a largo plazo.

Desafortunadamente, todos los tratamientos térmicos de conservación necesarios
35 para garantizar la seguridad del producto modifican negativamente su color, que

evoluciona del verde brillante a tonalidades más amarillas, similares a las que se producen durante la fermentación de las aceitunas verdes al *estilo español*, y eliminando la diferenciación que se pretende mantener entre ambos productos comerciales.

5

El color de la aceituna, como el de todos los frutos y vegetales verdes, se debe a la presencia de las clorofilas *a* y *b*, que se encuentran en los cloroplastos acompañadas de carotenoides. El llamativo cambio de color del verde brillante al marrón-oliva que de forma generalizada ocurre en el procesado térmico de vegetales se debe a la liberación de los ácidos celulares durante el calentamiento, que provoca la reacción de sustitución del ión Mg central de la molécula clorofílica por $2H^+$, modificando las características del grupo cromóforo, con el consiguiente cambio de color:



15

Número	Pigmento	Anillo V	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	15 ² -metil-fitol-clorina <i>a₂</i> ester	3	Fitol	CH ₂ COOH	COOH	2H	CH ₃
2	Zn-15 ² -metil-fitol-clorina <i>a₂</i> ester	3	Fitol	CH ₂ COOH	COOH	Zn	CH ₃
3	Clorofila <i>b</i>	1	Fitol	H	COOCH ₃	Mg	CHO
4	Clorofila <i>a</i>	1	Fitol	H	COOCH ₃	Mg	CH ₃
5	15 ¹ -OH-lactona-Feofitina <i>a</i>	2	Fitol	OH	COOCH ₃	2H	CH ₃
6	Zn Feofitina <i>a</i>	1	Fitol	H	COOCH ₃	Zn	CH ₃
7	Zn Feofitina <i>a'</i>	1	Fitol	COOCH ₃	H	Zn	CH ₃
8	Zn Pirofeofitina <i>a</i>	1	Fitol	H	H	Zn	CH ₃
9	Feofitina <i>a</i>	1	Fitol	H	COOCH ₃	2H	CH ₃
10	Feofitina <i>a'</i>	1	Fitol	COOCH ₃	H	2H	CH ₃
11	Pirofeofitina <i>a</i>	1	Fitol	H	H	2H	CH ₃

Todos los sistemas de procesamiento a los que son sometidos los frutos y vegetales verdes provocan, en mayor o menor grado, la formación de diferentes derivados clorofílicos libres de Mg, principalmente feofitinas, pirofeofitinas y feoforbidas, todos ellos de coloración marrón-grisácea.

Desde antiguo se conocen los esfuerzos de la industria alimentaria por preservar el color verde en los vegetales verdes procesados térmicamente mediante el uso de agentes alcalinizantes, que disminuyan la acidez, o tratamientos térmicos con alta temperatura y corto tiempo (HTST). Estos procedimientos obtienen una mejora del color a corto plazo pero no consiguen retener el color verde durante el tiempo de almacenamiento.

En cambio, sí son exitosos los procedimientos que aprovechan la alta afinidad de unión que tienen algunos metales divalentes, como Cu (II) y Zn (II), con el anillo de porfirina, para formar complejos metálicos de alta estabilidad y color verde brillante.

Por otro lado, estudios realizados para industrias del sector de la aceituna de mesa han puesto de manifiesto la presencia masiva de complejos metaloclorofílicos de Cu (II) de carácter liposoluble en aceitunas verdes de mesa comerciales, con un llamativo color verde brillante y etiquetadas como "*Aceitunas en Sosa*" y estilo "*Castelvetrano*". Se ha demostrado que la formación de estos complejos es el resultado de una adición de sales de Cu (II), práctica del todo fraudulenta ya que la lista positiva de aditivos alimentarios de la UE no incluye ninguna sal de cobre. Sin embargo sí están admitidas algunas sales de Zn (II) como el acetato de cinc (E-650).

En el caso de aceitunas de mesa, aunque aún no está admitido el uso del aditivo acetato de cinc (E-650), ya se han patentado procedimientos que describen su utilidad como conservante antimicrobiano (patente española nº 2369183).

- 5 Aunque en general la velocidad de la reacción de formación de los complejos metaloclorofilicos de Zn (II) es más lenta que la de los correspondientes con Cu (II), se han patentado diversos procedimientos útiles que emplean estas sales de Zn para preservar el color verde en diferentes vegetales procesados:
- US 4473591
- 10 - US 5114725
- US 6004601
 - US 6210729 B1
- con la única limitación de que el contenido en Zn (II) del producto final no supere 0,075 g/kg (75 ppm) (límite establecido por la *Food and Drug Administration*). Esta limitación
- 15 ha impedido un uso generalizado de este procedimiento, sobre todo en aquellos productos cuyo contenido en pigmentos clorofilicos es medio-bajo, como es el caso de los frutos verdes en general y la aceituna de mesa en particular. La cantidad de Zn (II) necesaria para obtener un color verde óptimo suele superar los límites establecidos (US 5482727).
- 20 Por tanto es de gran interés para la industria alimentaria en general, y para el sector de la aceituna de mesa en particular, optimizar un procedimiento para obtener un alimento de color verde permanente, minimizando el contenido en Zn (II) del producto final.

25 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofilicos que comprende:

- 30 - tratamiento de los productos vegetales con al menos un compuesto de cinc
- tratamiento de los productos vegetales procedentes de la etapa anterior con una solución básica tamponada
 - tratamiento térmico de conservación

y caracterizado porque los productos vegetales se someten a un tratamiento con una solución ácida tamponada que tiene lugar antes del tratamiento con la solución básica tamponada.

- 5 La propiedad organoléptica a optimizar es el color verde.

En un modo preferente de realización, el compuesto de cinc es una sal de cinc que se selecciona entre acetato de cinc, bisglicinato de cinc, cloruro de cinc, citrato de cinc, gluconato de cinc, lactato de cinc, óxido de cinc, carbonato de cinc, sulfato de cinc o
10 combinaciones de las mismas y el tratamiento con la sal de cinc consiste en poner en contacto los productos vegetales con una solución de la sal de cinc de concentración comprendida entre 0,005 y 3 g/L, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v) durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C.

15

La solución básica tamponada se selecciona entre un solución tamponada de borato, tris(hidroximetil)aminometano, glicina, fosfato, carbonato o combinaciones de los mismos, y el tratamiento con la solución básica tamponada consiste en poner en contacto los productos vegetales con la solución en una concentración igual o superior
20 a 0,1M, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v), durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C. La solución ácida tamponada se selecciona entre los ácidos acético, ascórbico, benzoico, cítrico, láctico, málico, propanoico, succínico o combinaciones de los mismos, y el tratamiento con la solución ácida tamponada consiste en poner en
25 contacto los productos vegetales con la solución en una concentración igual o superior a 0,1M, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v), durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 min y 10 días, a una temperatura entre 15°C y 90°C.

El tratamiento con la solución ácida tamponada puede tener lugar antes del
30 tratamiento con la sal de cinc o al mismo tiempo que el tratamiento con la sal de cinc.

Alternativamente, el tratamiento con la solución básica tamponada tiene lugar al mismo tiempo que el tratamiento con la sal de cinc.

El tratamiento térmico de conservación se selecciona entre una pasteurización o una esterilización. Alternativamente, el tratamiento con la solución básica tamponada, el tratamiento con la sal de cinc y el tratamiento térmico de esterilización pueden tener lugar al mismo tiempo.

5

El procedimiento puede incluir adicionalmente al menos una de las siguientes etapas:

- lavado de los productos vegetales
- envasado en salmuera

- 10 En un modo preferente de realización, los productos vegetales son aceitunas verdes de mesa, particularmente aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación.

- 15 Específicamente, las aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación se someten a:

- tratamiento con solución ácida tamponada de láctico/NaOH a una concentración igual o superior a 0,1M y pH igual o inferior a 5, y en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1, y conteniendo NaCl en una proporción entre 3 y 6%, durante un tiempo entre 1 min y 10 días, y a una temperatura entre 15°C y 90°C.
- 20 - tratamiento con acetato de cinc durante un tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C, en una concentración entre 0,05 g/L y 0,5 g/L, y en una relación sólido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v).
- tratamiento con solución básica tamponada de glicina/NaOH, en una concentración igual o superior a 0,1M y pH entre 8 y 10, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v) y durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C.
- 25 - lavado de las aceitunas verdes con agua durante un tiempo entre 3 y 24h , y en un número de lavados entre 0 y 5, en función de la concentración de cinc empleada en un tratamiento anterior.
- 30 - envasado en una salmuera de NaCl en una concentración entre 3 y 6%.
- tratamiento térmico que se selecciona entre una esterilización para 15 Fo, a una temperatura entre 117°C y 129°C y tiempo entre 5 y 43 min o una pasteurización a 80°C, en un tiempo entre 6 y 14 min.

- 35 En un modo especialmente preferente de realización del proceso sobre aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación:

- el tratamiento con la solución ácida tamponada de láctico/NaOH tiene lugar a pH igual a 4, en una relación sólido – líquido 1:3 (p/v), conteniendo NaCl al 4% (p/v) durante 9 días y a una temperatura de 30°C
- el tratamiento con acetato de cinc se hace a una concentración de 0,1 g/L y de forma simultánea al tratamiento con la solución básica tamponada, que tiene lugar a un pH igual a 9,5, incluye NaCl al 4%, y dura un periodo de 48h de equilibrio a una temperatura de 30°C, seguido de 43 min de esterilización a 117°C.

Constituye también un objeto de la presente invención, aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación y preparadas mediante el procedimiento explicado. Las aceitunas así preparadas presentan simultáneamente un porcentaje de complejos Zn-clorofilas comprendido entre 15% y 75% y menos del 0,0075% de Zn.

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto del tratamiento con acetato de cinc a pH 5 en el verdor de la aceituna de mesa, estimado a partir del parámetro a^* . Los iones Zn^{2+} se adicionan en una concentración de 3 g/L (3000 ppm) en una solución buffer acético/acetato 0,1M, a pH 5 y conteniendo 6% de NaCl (p/v). ● con Zn^{2+} ▲ control sin Zn^{2+} . Nota: *Test de almacenamiento acelerado*, consistente en someter las aceitunas tratadas a temperatura de 55°C durante 24 horas.

Figura 2: Cromatogramas típicos de HPLC en fase reversa con detección a 640 nm, para la separación de clorofilas, derivados clorofílicos libres de Mg y complejos metaloclorofílicos de cinc, en aceitunas de la variedad Manzanilla, según las distintas fases del proceso de elaboración al estilo castelvetrano (EEC) y realización de la invención según ejemplo nº1: **(A)** Fruto fresco; **(B)** Fruto EEC, **(C)** Fruto EEC posteriormente tratado con 3 g/L (3000 ppm) de iones Zn^{+2} disueltos en salmuera de NaCl al 4 % (p/v), tamponada a pH 5 con 0,1 M de ácido acético/acetato: **(C₁)** durante 14 días, **(C₂)** durante 6 meses, **(C₃)** durante 10 días + test de almacenamiento acelerado (24h a 55°C). Identificación de picos: **Clorofilas:** **3.** Clorofila *b*; **4.** Clorofila *a*; **Precursores de los complejos metaloclorofílicos de cinc de la serie a:** **1.** 15² metil-fitil-clorina e₆ ester; **9.** Feofitina *a*; **10.** Feofitina *a'*; **11.** Pirofeofitina *a*. **Complejos**

metaloclorofilicos de cinc de la serie a: **2.** Zn-15² metil-fitol-clorina e₆ ester; **5.** Zn-15¹-OH-Lactona Feofitina a; **6.** Zn-Feofitina a; **7.** Zn-Feofitina a'; **8.** Zn-Pirofeofitina a.

Figura 3: Cromatogramas típicos de HPLC en fase reversa con detección a 640 nm, para la separación de clorofilas, derivados clorofilicos libres de Mg y complejos metaloclorofilicos de cinc, en aceitunas de la variedad Manzanilla, según las distintas fases del proceso de elaboración al estilo castelvetrano (EEC) y realización de la invención según ejemplo n°4: **(A)** Fruto fresco; **(B)** Fruto EEC, **(C)** Fruto EEC después de 9 días de tratamiento ácido en salmuera de NaCl al 4 % (p/v), tamponada a pH 4 con 0,1 M de ácido láctico/NaOH (ECC+Ac), **(D)** Fruto ECC+Ac y esterilizado a 117°C por 43 min, en una solución al 4% de NaCl (p/v) y 0,1M de glicina/NaOH a pH 9,5, conteniendo 0,1 g/L (100 ppm) de iones Zn²⁺.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para la mejora del color verde en frutos o vegetales en conserva, especialmente en aceituna de mesa, empleando una sal de cinc de grado alimentario, sin que la cantidad de Zn (II) incorporada al producto supere los límites legalmente establecidos (0,075 g/kg; 75 ppm). Aunque el procedimiento puede ser aplicado a cualquier producto que contenga pigmentos clorofilicos (clorofilas y/o derivados clorofilicos), el producto es especialmente aceituna verde de mesa procesada mediante tratamiento alcalino y sin fermentación y el aditivo alimentario es acetato de cinc (E-650).

La invención abarca cualquier fase de la elaboración de la aceituna de mesa cuando en la misma se empleen sales de cinc para la mejora del color y tiene la finalidad de proporcionar una mejora en el color del producto mediante la formación de complejos metaloclorofilicos de cinc (Zn-CIs), de color verde brillante y alta estabilidad. El procedimiento puede comprender los siguientes pasos:

- A) tratamiento con una solución ácida tamponada
- B) tratamiento con al menos una sal de cinc
- C) tratamiento con una solución básica tamponada
- D) lavados
- E) envasado en salmuera
- F) tratamiento térmico de conservación

El reverdecimiento del producto se atribuye a la formación de complejos metaloclorofilicos de cinc, mayoritariamente Zn-feofitina a, Zn-pirofeofitina a y Zn-15²-Me-fitol-clorina e₆ ester.

- 5 En la presente invención el término “**pigmento clorofilico**” se refiere a un compuesto coloreado con estructura química derivada de clorofila, es decir, formado por un anillo porfirínico sustituido, con un anillo isocíclico adicional, que puede estar abierto, y un resto de ácido propiónico esterificado o no con una cadena terpénica denominada fitol. El anillo de porfirina es un tetrapirrol, con cuatro anillos de pirrol enlazados para formar
- 10 un anillo mayor que es la porfirina. En el caso de la clorofila, en el centro de la porfirina se encuentra un átomo de Mg²⁺ unido a los nitrógenos de los grupos pirrol, pero este átomo de Mg²⁺ puede sustituirse por Zn²⁺, Cu²⁺ o 2H⁺ para formar otros pigmentos químicamente estables.
- 15 El término “**aceituna verde de mesa**” se refiere a un producto que se prepara a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado, recogidos durante el ciclo de maduración, antes del envero, cuando han alcanzado su tamaño normal y que se someten a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservado mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, y envasados con
- 20 líquido de gobierno. Ejemplos de aceitunas verdes de mesa son aceitunas verdes aderezadas en salmuera, aceitunas verdes al natural, o especialidades de aceitunas procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación, que tienen características y nombres específicos en los diferentes países productores: *Campo Real* en España, *Castelvetrano* en Italia, *Picholine* en Francia, y aceitunas verdes
- 25 estilo *Californiano* o *greenripe olives* en Estados Unidos.

- En la presente invención el término «**tratamiento con una solución ácida tamponada**» (**etapa A**) se refiere a la inmersión del material vegetal en una solución buffer a pH ácido durante un cierto periodo de tiempo. Según una realización preferida
- 30 el buffer es láctico/NaOH a una concentración 0,1M y pH ≤ 5, y preferiblemente 4, conteniendo NaCl en una proporción entre 3 y 6%, preferiblemente 4% (p/v), y en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 y preferiblemente 1:3 (p/v). El tiempo de tratamiento entre 1 min y 30 días, preferiblemente 9 días, a una temperatura entre 15°C y 90°C, preferiblemente temperatura controlada de 30°C.

En la presente invención el término **«tratamiento con una sal de cinc» (etapa B)** se refiere a la inmersión del material vegetal durante un periodo de tiempo en una solución buffer que contiene NaCl y una sal de cinc. La sal de cinc es una sal soluble en agua de grado alimentario, preferiblemente el aditivo alimentario acetato de cinc (E-650), y en una concentración entre 0,005 g/L (5 ppm) y 3 g/L (3000 ppm), preferiblemente 100 ppm y en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v). El tiempo de tratamiento es entre 1 min y 1 año, preferiblemente 72h y la temperatura entre 15°C y 129°C.

10 En la presente invención el término **«tratamiento con una solución básica tamponada» (etapa C)** se refiere a la inmersión del material vegetal durante un periodo de tiempo en una solución buffer a pH alcalino durante un cierto periodo de tiempo. Según una realización preferida el buffer es glicina/NaOH, en una concentración $\geq 0,1M$ y pH entre 8 y 10, preferiblemente de 9,5. La proporción de NaCl
15 puede ser entre 3 y 6%, preferiblemente 4% (p/v) y en una relación solido/líquido $\geq 1:1$ y preferiblemente 1:1 (p/v). El tiempo de tratamiento entre 5 min y 1 año, preferiblemente 72h, a una temperatura entre 15°C y 129°C.

La adición de la sal de cinc (**etapa B**) se puede realizar indistintamente en la solución
20 ácida tamponada (**etapa A**) o en la solución básica tamponada (**etapa C**).

En la presente invención el término **«lavados» (etapa D)** se refiere a sucesivos tratamientos del material vegetal con agua durante un tiempo. En una realización preferida el tratamiento se realiza por inmersión del fruto en agua durante un tiempo
25 entre 3 y 24h, preferiblemente 12h y el número de lavados es entre 0 y 5, en función de la concentración de cinc empleada en una etapa anterior.

En la presente invención el término **«envasado en salmuera de acondicionamiento» (etapa E)** se refiere a la inmersión del material vegetal en salmuera de NaCl en una
30 concentración entre 3 y 6%, preferiblemente 4% (p/v). Si la concentración del aditivo acetato de cinc en la etapa **B** es $\leq 0,1$ g/L (100 ppm), se eliminan del procedimiento las etapas de lavados (**etapa D**) y envasado en salmuera de acondicionamiento (**etapa D**).

En la presente invención el término **«tratamiento térmico de conservación»** se
35 refiere a un tratamiento térmico que garantice la seguridad del producto a largo plazo.

En una realización preferente el tratamiento térmico es una esterilización para 15 Fo, a una temperatura entre 117°C y 129°C, preferiblemente a 117°C durante un tiempo de 43 min. En otra realización preferente el tratamiento es una pasteurización a 80°C, en un tiempo entre 6 y 14 min, preferiblemente 6 min.

5

Para el análisis de pigmentos clorofílicos se requiere una técnica de extracción específica que ha sido desarrollada por Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit, *Olea europaea*. J. Agric. Food Chem. (1989) 37, 1-7). La técnica se basa en el reparto selectivo de componentes entre N,N-Dimetilformamida (DMF) y hexano. En la fase de hexano quedan los lípidos, la fracción de carotenos y xantofilas diesterificadas, mientras que la fase de DMF retiene los compuestos clorofílicos y xantofilas libres y monoesterificadas. Este sistema proporciona una solución de pigmentos libre de la materia grasa que es característica de estos frutos y que interfiere en la posterior separación e identificación de los pigmentos.

Una vez obtenido el extracto de pigmentos purificado se lleva a cabo la separación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC con una columna de fase reversa (20 × 0,46 cm) empaquetada con Mediterránea-Sea C18 (3 µm) (Teknokroma, Barcelona, España). La columna se protege con una precolumna (1 x 0,4 cm) empaquetada con el mismo material. La separación se realiza a una velocidad de flujo de 1,25 mL/min, mediante un sistema de elución en gradiente que utiliza dos mezclas de solventes: A.- Agua/reactivo supresor de iones/metanol (1:1:8 v/v/v) y B.- metanol acetona (1:1 v/v). El reactivo supresor de iones es acetato de tetrabutilamonio 0,05 M y acetato de amonio 1 M en agua (Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B, Montañó-Asquerino A, Garrido-Fernández J. "Determination of chlorophylls and carotenoids by HPLC during olive lactic fermentation". J. Chromatogr. (1991) 585, 259-266). El sistema de gradiente utilizado es una adaptación del descrito por Gandul-Rojas, Roca y Gallardo-Guerrero 2012 ("Detection of the colour adulteration of green table olive with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant)". LWT - Food Sci. Tech. (2012) 463, 11-318).

La detección espectrofotométrica de los pigmentos clorofílicos se realiza a 666, 650, 640 y 626 nm y se obtiene un registro on-line del espectro de absorción UV-Vis con un detector de fotodiodos. La identificación se realiza por co-cromatografía con los correspondientes estándares y a partir de las características espectrales descritas con

detalle en publicaciones específicas (Gandul-Rojas et al. 2012). La cuantificación se realiza a partir de las correspondientes rectas de calibrado (cantidad vs área de pico integrada). Las ecuaciones de calibración se obtienen mediante análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados en un rango de concentración acorde a los niveles de
5 concentración de estos pigmentos en aceitunas de mesa. Se realizan análisis duplicados de 5 diferentes volúmenes de cada solución estándar.

Para determinar el contenido en cinc se parte de 100 g de frutos que se lavan, secan, deshuesan y trituran. De la pasta resultante se pesan con exactitud 5 g en una cápsula
10 de porcelana y se coloca en un horno de mufla. La temperatura de la mufla se lleva rápidamente a 100°C y después se sube lentamente hasta que se alcance la temperatura de calcinación (550°C), a la que se mantiene durante 8-10 horas. Las cenizas, de color blanco-grisáceo, se humedecen ligeramente y disuelven en tres porciones de 2 mL de HCL 6 N y se filtra, poco a poco, a través de papel de filtro a un
15 matraz aforado de 25 mL. Posteriormente, el filtro se limpia tres veces con 3 mL de agua desionizada, que también se añade al matraz aforado, y se termina enrasando con agua desionizada. La disolución de las cenizas se facilita calentando ligeramente la cápsula después de cada adición de HCl. En paralelo se prepara un blanco que únicamente incluye los reactivos (López A, García P y Garrido A. "Multivariate
20 characterization of table olives according to their mineral nutrient composition". Food Chem. (2008) 106:369-378). Finalmente, el contenido en cinc se determina con un espectrofotómetro de absorción atómica (GBC, modelo 932), nebulizando la muestra en una llama de aire-acetileno y utilizando una lámpara de cátodo hueco de cinc. La absorbancia se mide a 213.9 nm con un slit de 0,5 nm (Hornero-Méndez D, Gallardo-
25 Guerrero L, Jarén-Galán M y Mínguez-Mosquera MI. "Differences in the activity of superoxide dismutase, polyphenol oxidase and Cu-Zn content in the fruits of Gordal and Manzanilla olive varieties". Z. Naturforsch. (2002) 57, 113-120).

La medida de color se obtiene con un espectrofotómetro BYK-Gardner, Modelo 9000,
30 equipado con un software para calcular las coordenadas cromáticas en la escala CIE L^* a^* b^* . El dato para cada medida será el valor medio obtenido con 20 aceitunas (Arroyo-López FN, Romero C, Durán-Quintana MC, López-López A, García-García P y Garrido-Fernández A. "Kinetic study of the physicochemical and microbiological changes in *seasoned* olives during the shelf-life period". J. Agric. Food Chem. (2005)
35 53, 5285-5292). Los cambios en el color verde se expresan con los parámetros L^* , a^* ,

b*, la relación $-a^*/b$, ángulo de tono (h) y croma (C*) (Koca N, Karadeniz F, Burdurlu HS. "Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas". Food Chem. (2006) 100, 609-615).

5 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento descrito en la presente invención.

10

Materia prima. Un lote de 78 kg de frutos de olivo de la variedad Manzanilla, recogidos mayoritariamente en el estado de madurez verde-amarillento se procesó a escala de laboratorio, como aceitunas verdes de mesa tratadas con álcali y sin fermentación, de acuerdo al "*estilo Castelvetro*". Antes del procesado se realizó una selección manual del fruto, eliminando aquellos dañados o en estados de madurez diferenciados (pintones, morados y negros). Estos frutos seleccionados se depositaron en contenedores de PET de 3,7 L de capacidad y se cubrieron con solución de NaOH al 2% (p/v) (2,2 kg de fruto + 1,8 L de solución alcalina). Después de una hora de tratamiento se adicionó 100 g de NaCl a cada contenedor (equivalente a una concentración final de 5,5 % en la solución de NaCl/NaOH) y los frutos se mantuvieron en esta salmuera alcalina durante 15 días, realizándose a continuación tres lavados con agua de 3,5 h; 18h y 3,5h de duración. Finalmente los frutos se colocaron en salmuera de NaCl al 6% (p/v) y se conservaron en cámara refrigerada a 4°C hasta su uso.

25

Ejemplo nº 1: Producto pasteurizado elaborado en tres etapas

a) Etapas A y B: tratamiento con sal de cinc en una solución ácida tamponada.

Tratamiento de aceitunas verdes de mesa elaboradas al estilo castelvetro en una solución 0,1 M de la mezcla buffer acético/acetato a pH 5, conteniendo 6% (p/v) de NaCl, y 3 g/L (3000 ppm) de iones Zn^{2+} como acetato de cinc. La relación solido/líquido es de 1:3 y el tratamiento de 6 meses a temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ C$.

Se rellenaron frascos de cristal de 445 mL de capacidad (16 RefTO77) con 20 aceitunas (99-103g) y 300 mL de la salmuera tamponada conteniendo 3 g/L (3000

35

ppm) de acetato de cinc. Los frascos cerrados se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente y oscuridad, y se analizaron para color y contenido en pigmentos clorofílicos a los 2, 4, 7, 8, 9, 10 y 14 días. Finalmente, los frutos se mantuvieron almacenados durante 6 meses y alternativamente se sometieron a un test de almacenamiento acelerado mediante calentamiento en estufa a 55 °C durante 24h. En paralelo se realizaron controles a frutos envasados y almacenados en idénticas condiciones pero sin la adición de Zn^{2+} a la salmuera de envasado.

Durante el almacenamiento, la pérdida del color verde de los frutos, medido a partir de la coordenada cromática a^* , fue muy lenta en los frutos envasados con cinc, no llegando a ser en ningún caso significativa ($p < 0,05$) (**figura 1**). En cambio, los frutos no tratados con cinc experimentaron una pérdida de verdor más rápida, que empezó a ser significativa a partir del día 9 ($p < 0,05$). Esta pérdida de verdor se asoció con la reacción de sustitución del Mg^{2+} por $2H^+$ que experimentan las clorofilas y derivados bajo condiciones ácidas. En cambio, en los frutos tratados con la sal de Zn^{2+} , esta reacción fue contrarrestada por la inserción de este metal divalente en el anillo porfirínico, provocando la formación de complejos metaloclorofílicos de color verde estable. En el día 8 comenzó a detectarse en la serie "a" la formación de estos complejos metaloclorofílicos de cinc, que fueron incrementando lentamente su concentración hasta el día 14 (**figura 2**). Con el test de almacenamiento acelerado se consiguió provocar un reverdecimiento muy significativo del fruto tratado con cinc, llegando el valor de a^* a superar incluso el valor inicial (-7,30).

Esta mejora del color se asoció con la formación de diferentes complejos metaloclorofílicos de cinc, mayoritariamente de la serie "a" (**figura 2**). Cuantitativamente, los complejos metaloclorofílicos de cinc suponen cerca del 45% del total de pigmentos clorofílicos presentes en las aceitunas sometidas al Test de almacenamiento acelerado (**tabla 1**):

Tabla 1: Coordenada cromática a* y contenido en pigmentos clorofílicos (%) y zinc (ppm) en aceitunas verdes de mesa de la variedad Manzanilla, con elaboración al estilo castelvetrano y realización de la inversión según diferentes ejemplos.

MUESTRA	a*	Pigmento clorofílico (%)				Cinc (ppm)
		con Mg	con 2H ⁺	con Zn ²⁺	Cinc (ppm)	
Fruto Fresco	-12.52±0.01	97.6±2.1	2.4±0.2	-	3.10±0.25	
Castelvetrano inicial	-5.57±0.51	50.1±4.4	49.9±4.4	-	Nd ^b	
Castelvetrano 6 meses a 4°C	-2.68±0.42	29.7±15.5	70.3±15.5	-	Nd	
ETAPAS DE LA INVENCIÓN ^a						
Ejemplo 1: 3 etapas y pasteurización (test de almacenamiento acelerado)	A	B	C	D	E	F
	pH 5 y 3000ppm (1:3)		ND	5	SI	P
Ejemplo 2: 4 etapas y pasteurización	pH 4 (1:3)	pH 9.5 (1:3) y Zn ²⁺ 3000 ppm		5	SI	P
		pH 9.5 (1:1) y Zn ²⁺ 50 ppm				
Ejemplo 3: 3 etapas y pasteurización	pH 4 (1:3)	100 ppm		NO	SI	P
		120 ppm				
		140 ppm				
		Control sin Zn ²⁺				
Ejemplo 4: 2 etapas y esterilización		pH 9.5 (1:1) y Zn ²⁺ 80ppm				
	pH 4 (1:3)	100ppm		NO	NO	E
		120ppm				
		140ppm				
Ejemplo 5: 2 etapas y esterilización		pH 4 (1:1) y Zn ²⁺ 100ppm	(1:1)			
	pH 9.5		pH 9.5	NO	NO	E
	pH 9		pH 9			

Notas: 1) Nd: no determinado; 2) A: tratamiento con solución ácida tamponada; B: tratamiento con sal de cinc; C: tratamiento con solución básica tamponada; D: lavados; E: envasado en solución; F: tratamiento térmico de conservación; P: pasteurización de 6 min a 80°C; E: Esterilización de 43min a 117°C.

Los resultados demuestran que las condiciones de almacenamiento ensayadas pueden ser útiles para mantener el deseado color verde de las aceitunas

elaboradas al “*estilo castelvetrano*”, y que esta mejora del color se intensificará a medida que transcurra el tiempo de almacenamiento en estas condiciones. Después de 6 meses de almacenamiento real a temperatura ambiente el producto tiene una mejora significativa del color aparente y puede ser lavado, envasado y pasterizado para su comercialización.

b) Etapa D: lavados. Inmersión de las aceitunas en agua del grifo durante 60h, con cambio de agua cada 12h (5 lavados).

c) Etapas E y F: envasado en salmuera de acondicionamiento y tratamiento térmico de conservación. Llenado de botes de vidrio de 370mL de capacidad con unos 156 g de frutos y unos 180 mL de una mezcla buffer 0,1 M ácido láctico/lactato a pH 4 y conteniendo un 4% (p/v) de NaCl a una temperatura de 70°C y pasterización a 80°C durante 6 min.

Los compuestos metaloclorofílicos de cinc formados, responsables de la mejora del color verde son estables y se mantienen después del tratamiento térmico de pasterización. En el producto que ha permanecido durante 6 meses en tratamiento, el valor de la coordenada a^* indicó una estabilización del color verde (0,27) y además presentó un alto porcentaje de complejos metaloclorofílicos de cinc (71,63%). Sin embargo, la extensa duración del tratamiento y la elevada concentración de sal de cinc provocó el desarrollo de manchas pardas en el producto, resultando por tanto rechazable.

Ejemplo nº 2: Producto pasterizado elaborado en cuatro etapas

1) Etapa A : tratamiento con solución ácida tamponada: Tratamiento de aceitunas verdes de mesa elaboradas al estilo castelvetrano en una solución buffer de láctico/NaOH a una concentración 0,1M y pH 4, conteniendo NaCl al 4% (p/v), y en una relación solido/líquido 1:3 durante 9 días, a temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

2) Etapas B y C: tratamiento con sal de cinc en una solución básica tamponada. Inmersión de los frutos en una mezcla buffer 0,1M de glicina/NaOH a pH 9,5, conteniendo NaCl al 4% (p/v) y el aditivo alimentario acetato de cinc, en una concentración de 3 g/L (3000 ppm) y en una relación solido/líquido 1:3, durante 6 días, a una temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

3) **Etapas D: lavados.** Inmersión de las aceitunas en agua del grifo durante 60 h, con cambio de agua cada 12 h (5 lavados).

4) **Etapas E y F: envasado en salmuera de acondicionamiento y tratamiento térmico de conservación.**

5 Llenado de botes de vidrio de 370mL de capacidad con unos 156 g de frutos y unos 180 mL de una mezcla buffer 0,1 M acético/acetato a pH 4,3 y conteniendo un 4% (p/v) de NaCl a una temperatura de 70°C y pasterización a 80°C durante 8 min.

10 Con este segundo ejemplo se realiza una primera optimización de las condiciones del tratamiento. Se ha puesto de manifiesto que el pH óptimo para la formación de los complejos metaloclorofílicos depende del tipo de sustrato clorofílico. En el caso de clorofilas y derivados que contengan Mg^{2+} , la reacción de complejación es más rápida a pH ácido, ya que estas condiciones favorecen el intercambio del Mg^{2+} por $2H^+$ y de los $2H^+$ por Zn^{2+} . En cambio, existen referencias bibliográficas que demuestran que en vegetales tratados térmicamente, donde todos los derivados clorofílicos son del tipo feofitinas (libres de Mg^{2+}) la formación de los complejos con Zn^{2+} se intensifica a pH alcalino. En este ejemplo, las etapas A y B se realizan por separado a distintos valores de pH, con objeto de disminuir el tiempo de tratamiento con la sal de cinc. El fruto se somete a un primer tratamiento ácido a pH 4 para provocar la feofitinización de los sustratos clorofílicos (**figura 3**), seguido de un segundo tratamiento con salmuera básica tamponada a pH 9,5, en presencia de 3 g/L (3000 ppm) de iones Zn^{2+} . En tan sólo 6 días de tratamiento con la sal de cinc se consigue la formación un 74,37% de complejos de cinc (**figura 3 y tabla 1**) y una consecuente estabilización del color verde, medida a partir del parámetro a^* , con un valor de -1,53. Los frutos se someten a 5 lavados para reducir el contenido en cinc y finalmente se envasan en salmuera ácida y se pasterizan. Los complejos formados son estables al tratamiento térmico y se mantiene estable el color verde, pero el contenido en cinc del producto fue de 0,5 g/kg (503,22 ppm), superando los límites legalmente establecidos.

Ejemplo nº 3: Producto pasterizado elaborado en tres etapas

35 1. **Etapas A: tratamiento con solución ácida tamponada.** Tratamiento de aceitunas verdes de mesa elaboradas al estilo castelvetrano en una solución

buffer de láctico/NaOH a una concentración 0,1M y pH 4, conteniendo NaCl al 4% (p/v), y en una relación solido/líquido 1:3 durante 9 días, a temperatura ambiente de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- 5 **2. Etapas B y C: tratamiento con sal de zinc en una solución básica tamponada.** Inmersión de los frutos en una mezcla buffer 0,1M de glicina/NaOH a pH 9,5, conteniendo NaCl al 4% (p/v) y el aditivo alimentario acetato de cinc en concentraciones de 0,08 g/L; 0,1g/L; 0,12 g/L; y 0,14 g/L (80, 100, 120, y 140 ppm) y en una relación solido/líquido 1:1, durante 48h a temperatura ambiente.
- 10 **3. Etapas E y F: envasado en salmuera de acondicionamiento y tratamiento térmico de conservación.** Llenado de botes de vidrio de 370mL de capacidad con unos 156 g de frutos y unos 180 mL de una mezcla buffer 0,1 M láctico/NaOH a pH 4,3 y conteniendo un 6% (p/v) de NaCl a una temperatura de 70°C y pasteurización a 80°C durante 6 min.

15 En este tercer ejemplo se reduce la cantidad de cantidad de sal de cinc empleada, lo que permite eliminar la etapa de lavado, sin embargo no se consigue una adecuada estabilización del color verde, manteniéndose los valores de a^* entre 0,30 y -0,35 en función de la cantidad de cinc adicionada

20 (tabla 1).

Ejemplo nº 4: Producto esterilizado elaborado en dos fases

- 25 **1) Etapa A: tratamiento con solución ácida tamponada.**
Tratamiento de aceitunas verdes de mesa elaboradas al estilo castelvetrano en una solución buffer de láctico/NaOH a una concentración 0,1M y pH 4, conteniendo NaCl al 6% (p/v), y en una relación solido/líquido 1:3, durante 9 días, a temperatura ambiente de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- 30 **2) Etapas B, C, E y F: envasado en salmuera de acondicionamiento a pH básico tamponado, adición de sal de cinc y tratamiento térmico de esterilización.**
Llenado de botes de vidrio de 370mL de capacidad con unos 156 g de frutos y unos 180 mL de la mezcla buffer 0,1 M de glicina/NaOH a pH 9,5, conteniendo un 4% (p/v) de NaCl y el aditivo alimentario acetato de cinc en concentraciones
- 35 de 0,08 g/L; 0,1g/L; 0,12 g/L; y 0,14 g/L (80, 100, 120, y 140 ppm) y en una

relación solido/líquido 1:1, dejando un espacio de cabeza de al menos 2 mL. Después de 48h de equilibrio se realiza un tratamiento térmico de esterilización técnica para al menos 15Fo (43 min a 117°C).

5 En este cuarto ejemplo se realiza una optimización adicional combinando las etapas B, C y E con un tratamiento térmico de esterilización. De esta forma se reduce la cantidad del aditivo empleada a $\leq 0,14$ g/L (140 ppm), se eliminan los lavados y se reduce el tiempo total de elaboración del producto. Después de la

10 etapa de tratamiento con buffer ácido a pH 4 durante 9 días, que provoca un porcentaje de feofitinización en los sustratos clorofílicos de al menos el 95% (**figura 3**), los frutos se envasan en una mezcla buffer a pH 9,5 conteniendo diferentes cantidades de cinc y se someten a tratamiento térmico de esterilización de 15Fo. Inmediatamente después del tratamiento térmico ya se consigue la

15 formación de un alto porcentaje de complejos de cinc ($> 43\%$) y una estabilización del color verde (a^* entre -4,28 y -5,00) (**Figura 3 y tabla 1**). Aunque todos los tratamientos consiguen la deseada mejora/estabilización del color verde, únicamente los tratamientos con 0,08 g/L y 0,1g/L (80 y 100 ppm) de acetato de cinc mantienen una cantidad de cinc en el producto acabado inferior a la

20 legalmente admitida de 0,075 g/L (75 ppm) (**tabla 1**). El producto estaría listo para su comercialización en 10 días y a diferencia de los productos de este tipo de elaboración de aceitunas tratadas térmicamente actualmente disponibles en el mercado, el color puede seguir evolucionando favorablemente durante el almacenamiento del producto a temperatura ambiente.

25 **Ejemplo nº 5: Producto esterilizado elaborado en dos fases**

- 1) **Etapas A y B: tratamiento con sal de cinc en una solución ácida tamponada.** Tratamiento de aceitunas verdes de mesa elaboradas al estilo castelvetrano en una solución buffer de láctico/NaOH a una concentración
- 30 0,1M y pH 4, conteniendo NaCl al 4% (p/v) y 0,1 g/L (100 ppm) del aditivo alimentario acetato de cinc. La relación solido/líquido es de 1:1, y el tratamiento de 9 días a temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.
- 2) **Etapas C, E, y F: envasado en salmuera de acondicionamiento a pH básico tamponado y tratamiento térmico de esterilización.**

5 Llenado de botes de vidrio de 370mL de capacidad con unos 156 g de frutos y unos 180 mL de la mezcla buffer 0,1 M de glicina/NaOH a pHs 9 y 9,5, conteniendo un 4% (p/v) de NaCl, en una relación solido/líquido 1:1, dejando un espacio de cabeza de al menos 2mL. Después de 48h de equilibrio se realiza un tratamiento térmico de esterilización técnica para al menos 15Fo (43 min a 117°C).

10 En este quinto ejemplo se realiza una optimización adicional combinando las etapas A y B (tratamiento en solución ácida tamponada y tratamiento con sal de cinc). De esta forma se consigue reducir aún más la cantidad de cinc que es incorporada al producto a < 40 ppm (**tabla 1**), formándose una cantidad de complejos metaloclorofílicos de cinc inferior a la del ejemplo anterior (entre 15 y 23%) pero suficiente para estabilizar el color verde, con un valor de a* entre -2,54 y -3,26. En este caso, al adicionar el cinc en la etapa del tratamiento
15 ácido, el grado de feofitinización de los pigmentos clorofílicos fue inferior, manteniéndose después del tratamiento térmico un 20% de los complejos nativos con magnesio.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos que comprende:
- 5 - tratamiento de los productos vegetales con al menos un compuesto de cinc
- tratamiento de los productos vegetales procedentes de la etapa anterior con una solución básica tamponada
- tratamiento térmico de conservación
- y caracterizado porque los productos vegetales se someten a un tratamiento con una
- 10 solución ácida tamponada que tiene lugar antes del tratamiento con la solución básica tamponada.
- 2.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 1, caracterizado
- 15 porque la propiedad organoléptica a optimizar es el color verde.
- 3.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el compuesto de cinc es una sal de cinc que se selecciona entre
- 20 acetato de cinc, bisglicinato de cinc, cloruro de cinc, citrato de cinc, gluconato de cinc, lactato de cinc, óxido de cinc, carbonato de cinc, sulfato de cinc o combinaciones de las mismas.
- 4.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos
- 25 vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 3, caracterizado porque el tratamiento con la sal de cinc consiste en poner en contacto los productos vegetales con una solución de la sal de cinc de concentración comprendida entre 0,005 y 3 g/L, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v) durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y
- 30 129 °C.
- 5.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la solución básica tamponada se

selecciona entre un solución tamponada de borato, tris(hidroximetil)aminometano, glicina, fosfato o carbonato o combinaciones de los mismos.

5 **6.-** Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 5, caracterizado porque el tratamiento con la solución básica tamponada consiste en poner en contacto los productos vegetales con la solución en una concentración igual o superior a 0,1M, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v), durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C.

10

7.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la solución ácida tamponada se selecciona entre los ácidos acético, ascórbico, benzoico, cítrico, láctico, málico, propanoico, succínico, o combinaciones de los mismos.

15

8.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 7, caracterizado porque el tratamiento con la solución ácida tamponada consiste en poner en contacto los productos vegetales con la solución en una concentración igual o superior a 0,1M, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v), durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 min y 10 días, a una temperatura entre 15°C y 90°C.

20

9.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado porque el tratamiento con la solución ácida tamponada tiene lugar antes del tratamiento con la sal de cinc.

25

10.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado porque el tratamiento con la solución ácida tamponada tiene lugar al mismo tiempo que el tratamiento con la sal de cinc.

30

11.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según una cualquiera de las

35

reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el tratamiento con la solución básica tamponada tiene lugar al mismo tiempo que el tratamiento con la sal de cinc.

5 **12.-** Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 11, caracterizado porque el tratamiento con la solución básica tamponada tiene lugar al mismo tiempo que el tratamiento con la sal de cinc y al mismo tiempo que un tratamiento térmico de esterilización.

10 **13.-** Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 caracterizado porque incluye adicionalmente al menos una de las siguientes etapas:

- lavado de los productos vegetales
- 15 - envasado en salmuera

14.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque los productos vegetales son aceitunas
20 verdes de mesa.

15.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 14, caracterizado porque los productos vegetales son aceitunas verdes de mesa
25 procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación.

16.- Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 15, caracterizado porque las aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento
30 alcalino y sin fermentación se someten a:

- tratamiento con solución ácida tamponada de láctico/NaOH a una concentración igual o superior a 0,1M y pH igual o inferior a 5, y en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1, y conteniendo NaCl en una proporción entre 3 y 6%, durante un tiempo entre 1 min y 10 días, y a una temperatura entre 15°C y 90°C.

- tratamiento con acetato de cinc durante un tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C, en una concentración entre 0,05 g/L y 0,5 g/L, y en una relación sólido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v).
 - tratamiento con solución básica tamponada de glicina/NaOH, en una concentración
5 igual o superior a 0,1M y pH entre 8 y 10, en una relación solido/líquido igual o superior a 1:1 (p/v) y durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 año, y a una temperatura entre 15°C y 129 °C.
 - lavado de las aceitunas verdes con agua durante un tiempo entre 3 y 24h, y en un número de lavados entre 0 y 5, en función de la concentración de cinc empleada en un
10 tratamiento anterior.
 - envasado en una salmuera de NaCl en una concentración entre 3 y 6%.
 - tratamiento térmico que se selecciona entre una esterilización para 15 Fo, a una temperatura entre 117°C y 129°C y tiempo entre 5 y 43 min o una pasteurización a 80°C, en un tiempo entre 6 y 14 min.
 - 15
- 17.-** Procedimiento para la optimización de propiedades organolépticas en productos vegetales que contienen pigmentos clorofílicos según la reivindicación 16, caracterizado porque:
- el tratamiento con la solución ácida tamponada de láctico/NaOH tiene lugar a pH
20 igual a 4, en una relación sólido – líquido 1:3 (p/v), conteniendo NaCl al 4% (p/v) durante 9 días y a una temperatura de 30°C
 - el tratamiento con acetato de cinc se hace a una concentración de 0,1 g/L y de forma simultánea al tratamiento con la solución básica tamponada, que tiene lugar a un pH igual a 9,5, incluye NaCl al 4%, y dura un periodo de 48h de equilibrio a una
25 temperatura de 30°C, seguido de 43min de esterilización a 117°C.
- 18.-** Aceitunas verdes de mesa procesadas mediante tratamiento alcalino y sin fermentación y preparadas mediante un procedimiento según se define en las reivindicaciones 16 y 17, caracterizadas porque presentan simultáneamente un
30 porcentaje de complejos Zn-clorofilas comprendido entre 15% y 75% y menos del 0,0075% de Zn.

FIG.1

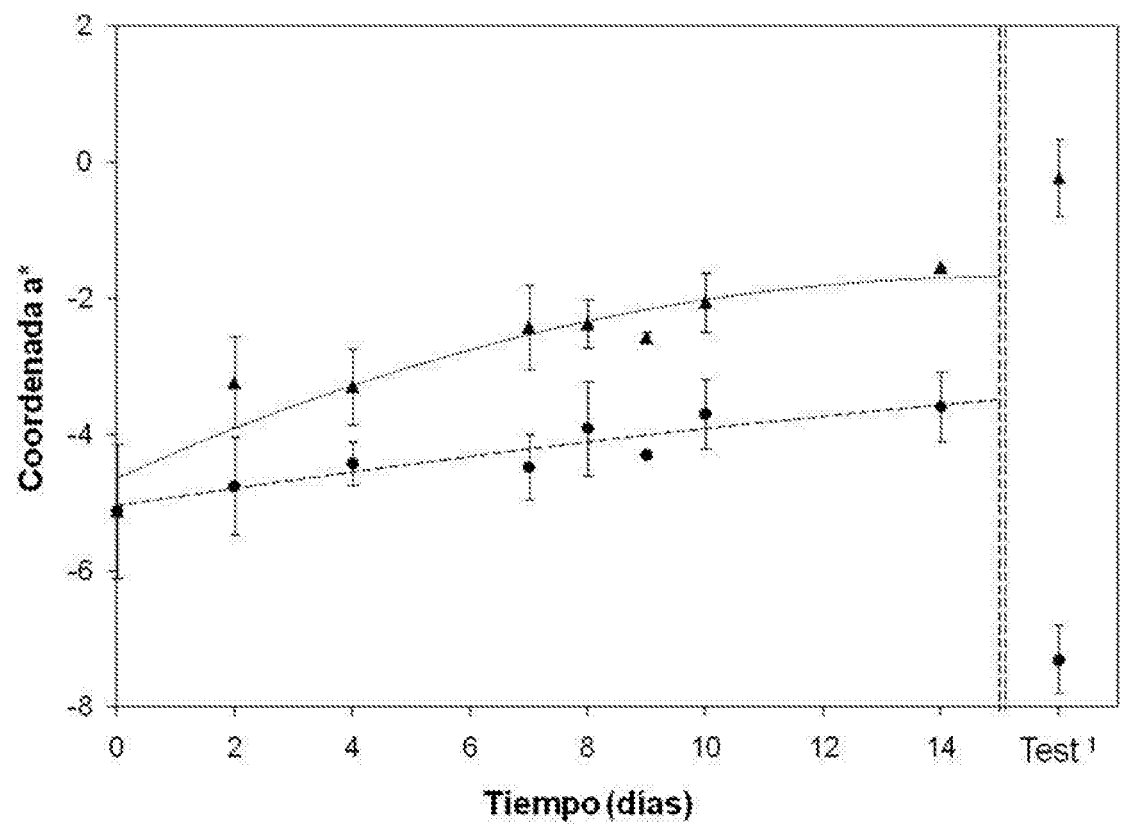


FIG.2

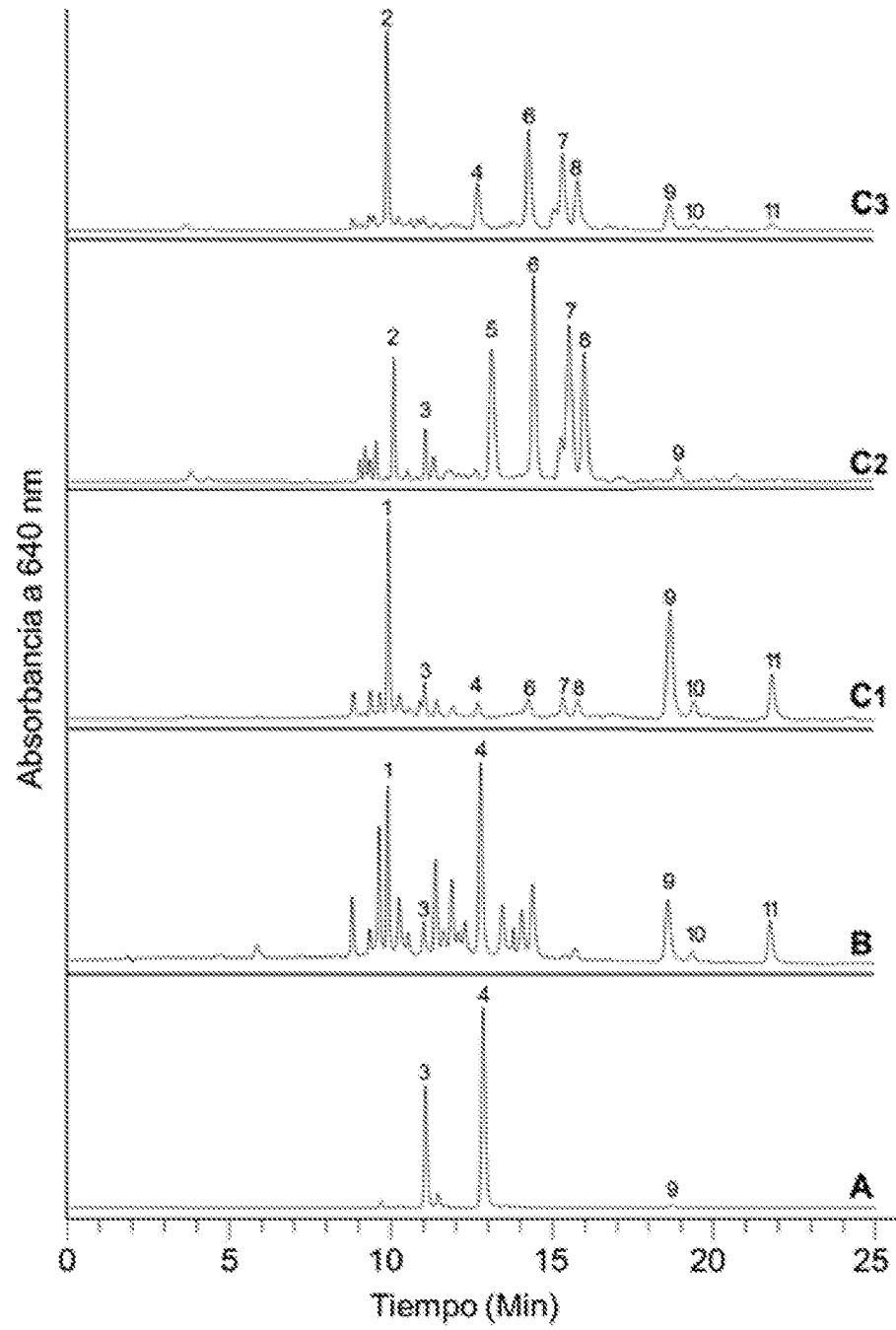
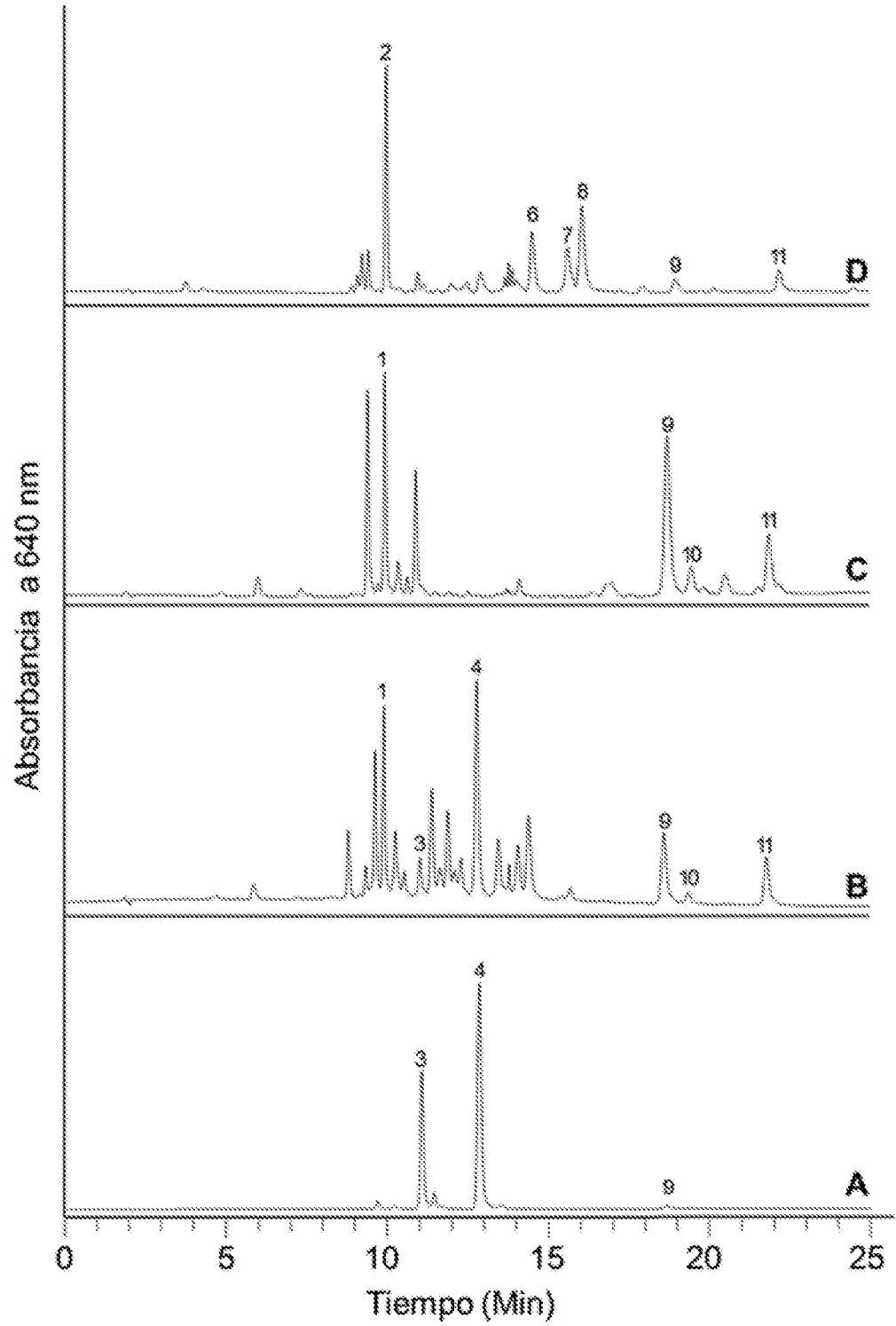


FIG.3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23B7/157 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4701330 A (ROGERS ANN M ET AL.) 20/10/1987, claims.	1-18
A	EP 0314298 A1 (BORDEN INC) 03/05/1989, claims.	1-18
A	US 6004601 A (DONATO KATJA K ET AL.) 21/12/1999, claims.	1-18
A	US 5114725 A (LEAKE LUTHER H ET AL.) 19/05/1992, claims.	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07/03/2017

Date of mailing of the international search report
(15/03/2017)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. Manso Tomico

Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070943

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHENG YONGJU et al. Effect of heat treatment, pH, sugar concentration, and metal ion Addition on green color retention in homogenized puree of Thompson seedless grape. LWT- Food Science and Technology Academic Press. 2014. VOL: 55 No: 2 Pags: 595 - 603 ISSN 0023-6438. Material and methods.	1-18
A	31/10/2010, PATRICIA SCIPIONI GRISELDA et al. The Effect of Mg ²⁺ , Cu ²⁺ and Zn ²⁺ Pre-treatment on the Color of Yerba Mate (Ilex paraguariensis) Leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology NOV-DEC 2010 December /2010 VOL: 53 No: 6 Pags: 1497-1502 ISSN 1516-8913(print) ISSN 1678-4324 (electronic). Abstract. Material and methods.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070943

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US4701330 A	20.10.1987	CA1325744 C	04.01.1994
-----	-----	-----	-----
EP0314298 A1	03.05.1989	US4840808 A	20.06.1989
		GR3004838T T3	28.04.1993
		ES2033440T T3	16.03.1993
		CA1334905 C	28.03.1995
		AT72931T T	15.03.1992
-----	-----	-----	-----
US6004601 A	21.12.1999	CA2269179 A1	17.10.1999
		CA2269179 C	09.01.2007
-----	-----	-----	-----
US5114725 A	19.05.1992	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO2011121164 A1	06.10.2011	ES2369183 A1	28.11.2011
		ES2369183 B1	11.10.2012
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070943

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD A23B7/157 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A23B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 4701330 A (ROGERS ANN M ET AL.) 20/10/1987, reivindicaciones.	1-18
A	EP 0314298 A1 (BORDEN INC) 03/05/1989, reivindicaciones.	1-18
A	US 6004601 A (DONATO KATJA K ET AL.) 21/12/1999, reivindicaciones.	1-18
A	US 5114725 A (LEAKE LUTHER H ET AL.) 19/05/1992, reivindicaciones.	1-18

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
07/03/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15 de marzo de 2017 (15/03/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico
Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2016/070943

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>ZHENG YONGJU et al. Effect of heat treatment, pH, sugar concentration, and metal ion addition on green color retention in homogenized puree of Thompson seedless grape. LWT- Food Science and Technology Academic Press. 2014. VOL: 55 No: 2 Pags: 595 - 603 ISSN 0023-6438. Material y métodos.</p>	1-18
A	<p>31/10/2010, PATRICIA SCIPIONI GRISELDA et al. The Effect of Mg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ Pre-treatment on the Color of Yerba Mate (Ilex paraguariensis) Leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology NOV-DEC 2010 Diciembre /2010 VOL: 53 No: 6 Pags: 1497-1502 ISSN 1516-8913(print) ISSN 1678-4324(electronic). Resumen. Material y métodos.</p>	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2016/070943

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US4701330 A	20.10.1987	CA1325744 C	04.01.1994
-----	-----	-----	-----
EP0314298 A1	03.05.1989	US4840808 A	20.06.1989
		GR3004838T T3	28.04.1993
		ES2033440T T3	16.03.1993
		CA1334905 C	28.03.1995
		AT72931T T	15.03.1992
-----	-----	-----	-----
US6004601 A	21.12.1999	CA2269179 A1	17.10.1999
		CA2269179 C	09.01.2007
-----	-----	-----	-----
US5114725 A	19.05.1992	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
WO2011121164 A1	06.10.2011	ES2369183 A1	28.11.2011
		ES2369183 B1	11.10.2012
-----	-----	-----	-----