



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE DIFERENTES
NUTRIENTES MINERALES EN
LA ELABORACIÓN DE
ACEITUNAS DE MESA**



D. Joaquín Bautista Gallego

Sevilla, 2012



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE LA GRASA

**EFECTO DE DIFERENTES
NUTRIENTES MINERALES EN
LA ELABORACIÓN DE
ACEITUNAS DE MESA**

TESIS DOCTORAL

D. Joaquín Bautista Gallego

Sevilla, 2012



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE LA GRASA

EFECTO DE DIFERENTES NUTRIENTES MINERALES EN LA ELABORACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

Memoria que presenta

D. Joaquín Bautista Gallego,

Licenciado en Biología,

Para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado

Interdepartamental “Estudios Avanzados en Alimentos”,

Universidad de Sevilla.

Sevilla, 2012



Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

Facultad de Química

D^a. Patricia Isabel Paneque Macías, Doctor y Profesora Contratada del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla, en calidad de Tutor,

AUTORIZA:

La presentación ante la comisión de doctorado de la Tesis,

“Efecto de diferentes nutrientes minerales en la elaboración de aceitunas de mesa”

realizada por el Licenciado en Biología D. Joaquín Bautista Gallego en el Instituto de la Grasa (CSIC), y dirigida por los Doctores D. Antonio Garrido Fernández y D. Francisco Noé Arroyo López.

El tutor de la Tesis Doctoral

D^a. Patricia Isabel Paneque Macías

Los Doctores D. Antonio Garrido Fernández, Profesor de Investigación del CSIC, y D. Francisco Noé Arroyo López, Contratado Ramón y Cajal, directores de la Tesis Doctoral, y adscritos al Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC),

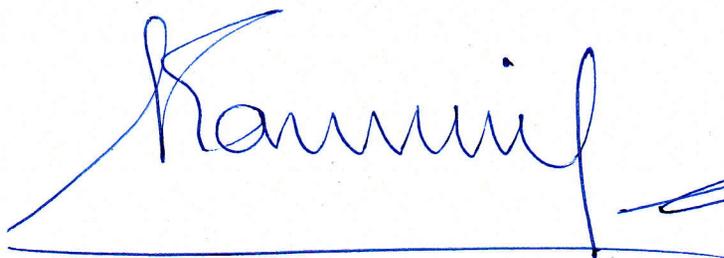
CERTIFICAN:

Que el Licenciado en Biología D. Joaquín Bautista Gallego ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al Grado de Doctor titulado,

“Efecto de diferentes nutrientes minerales en la elaboración de aceitunas de mesa”

Y para que conste, firmamos la presente certificación en Sevilla, a 27 de Diciembre de 2011.

Los directores de la Tesis Doctoral,



Prof. Antonio Garrido Fernández



Dr. Francisco Noé Arroyo López

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y al programa JAE, por la beca que ha permitido realizar esta Tesis. Asimismo, al Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa donde ha tenido lugar el desarrollo del trabajo experimental.

Al Dr. D. Antonio Garrido Fernández, Profesor de Investigación del Instituto de la Grasa, por su dirección, paciencia y por sacar fuerzas para uno de sus últimos proyectos.

Al Dr. D. Francisco Noé Arroyo López, por su incansable capacidad de colaboración y apoyo, por ser director, compañero y amigo. Gracias por tu apoyo.

A la Dra. D^a. Patricia Isabel Paneque Macías, por su ayuda y consejos en la elaboración y en los trámites necesarios para presentar esta Tesis doctoral.

A D. Francisco Rodríguez Gómez, por ayudarme en parte del trabajo experimental, porque tus consejos son siempre bien recibidos. A Verónica, por ser mi compañera de laboratorio, por tu ayuda y porque espero seguir ayudándote.

A D. José María Moreno Baquero, y por ende, al Dr. Antonio López López por su colaboración en la determinación de los elementos minerales en pulpa.

A todos los compañeros del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa, porque de una manera u otra, todos le han dado más valor a esta Tesis Doctoral. En especial al Dr. Javier Casado y D. Jesús Domínguez por su predisposición y ayuda.

Gracias a la Dra. Amparo Querol Simón (IATA-CSIC, Valencia), Dr. Luca Cocolin (UNITO, Turín-Italia), Dra. Lene Jespersen (LIFE-U. Copenhagen, Denmark) y sus respectivos grupos, por su hospitalidad y por enseñarme nuevos horizontes que seguir aplicando.

Al Dr. José Antonio Cortés Vázquez, por estar ahí desde hace 14 años, por nuestras charlas y dar siempre otro punto de vista.

A mi familia política, por servir de válvula de escape y apoyo incondicional.

A C. porque siempre consigues animarme, hasta en los peores momentos y por esos numerosos paseos y noches en las que me acompañaste.

A Manolo, M^a José y ahora María, os deseo todo lo mejor. Los golpes solo deben conseguir hacernos más fuerte. M^a José, tú mejor que nadie sabes lo que cuestan estos momentos, ánimo y suerte. Tu constancia fue siempre un ejemplo y reto a superar, no la pierdas.

A mis padres, Pepi y Joaquín, gracias, todo esto es por y para vosotros. Espero que estéis orgullosos. Os quiero.

A Elena, gracias por estar conmigo en los momentos difíciles, por ser pilar, sin ti nada de esto tendría sentido.

A mi familia y a Elena

ABREVIATURAS

A: índice de validación relacionado con la exactitud de las predicciones

a_w : actividad del agua

ACP: Análisis de componentes principales

ACJ: Análisis de cluster Jerárquico

ADC: Análisis descriptivo cuantitativo

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria

A_f: área fraccional

B: índice de validación relacionado con el sesgo de las predicciones

BAL: bacterias ácido lácticas

Ca: calcio

CaCl₂: cloruro cálcico

COI: Consejo Oleícola Internacional

CP: Componente principal

DO: densidad óptica

DOP: denominación de origen protegida

Eq: equivalente

g: gramo

GRAS: "Generally recognized as safe"

h: hora

IDR: Ingesta Diaria Recomendada

K: potasio

KCl: cloruro potásico

kg: kilogramo

L: litro

log₁₀: logaritmo en base decimal

Mg: magnesio

MgCl₂: cloruro magnésico

mg: miligramo

min: minuto

mM: milimolar

MIC: concentración mínima inhibitoria

mL: mililitro

nm: nanómetro

mmoles: milimoles

Na: sodio

NaCl: cloruro sódico

NIC: concentración máxima no inhibitoria

N_{max} : máximo tamaño poblacional alcanzado

PLS: mínimos cuadrados parciales

SR: superficie de respuesta

t: tonelada

UE: Unión Europea

UFC: unidades formadoras de colonias

x g: gravedad

Zn: zinc

ZnCl₂: cloruro de zinc

μ l: microlitro

μ_{max} : máxima velocidad de crecimiento específica

λ : duración de la fase de latencia

°C: grado Celsius

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. EL CULTIVO DEL OLIVO	5
2.2. LAS ACEITUNAS COMO ALIMENTO	6
2.3. DEFINICIÓN, TIPOS Y PRESENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA	9
2.4. PRODUCCIÓN DE ACEITUNAS DE MESA	11
2.5. SUCINTA DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA	15
2.5.1. Elaboración de aceitunas verdes estilo español o sevillano	15
2.5.2. Elaboración de aceitunas colocadas directamente en salmuera	19
2.5.3. Especialidades	22
2.6. CONTENIDO EN NUTRIENTES MINERALES DE LAS ACEITUNAS DE MESA	25
2.7. RELACIÓN ENTRE LA INGESTA DE NUTRIENTES MINERALES Y SALUD	29
2.8. ESTUDIOS PARA LA REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE SAL EN VEGETALES FERMENTADOS	35
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1. DISEÑOS DE EXPERIENCIAS	47
4.1.1. Efecto de las sales minerales sobre el crecimiento de los microorganismos en medios de laboratorio	47
4.1.1.1. Efecto del NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂ sobre <i>L. pentosus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	47
4.1.1.1.1. Efecto individual de las sales	47
4.1.1.1.2. Efecto combinado de las sales	50
4.1.1.2. Efecto de ZnCl₂ sobre el crecimiento de levaduras	51

4.1.2. Estudio del efecto de la sustitución de NaCl por otras sales minerales en fermentaciones de aceitunas	54
4.1.2.1 <i>Aceitunas y preparación de salmueras</i>	54
4.1.2.2. <i>Fermentación de aceituna Gordal al estilo sevillano</i>	54
4.1.2.3. <i>Fermentación de aceituna Manzanilla al estilo sevillano</i>	56
4.1.2.4. <i>Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga colocada directamente en salmuera</i>	58
4.1.3. Estudio del efecto de la sustitución de NaCl por otras sales minerales en los envasados	59
4.1.3.1. <i>Envasado de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano</i>	59
4.1.3.2. <i>Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional</i>	61
4.1.4. Estudio de la adición de ZnCl₂ en los envasados	62
4.1.4.1. <i>Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano</i>	62
4.1.4.2. <i>Envasado de aceituna verde fresca Aloreña de Málaga</i>	63
4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS REALIZADOS	64
4.2.1. Determinación del pH, acidez libre y acidez combinada	64
4.2.2. Determinación del color en la superficie de las aceitunas	64
4.2.3. Determinación de la textura instrumental de las aceitunas	66
4.2.4. Determinación de azúcares en salmuera	66
4.2.5. Determinación de ácidos en salmuera	67
4.2.6. Determinación de minerales en pulpa	67
4.2.7. Análisis sensorial	70
4.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	71
4.3.1. Medios de cultivo e instrumental utilizado para estudiar el crecimiento de los microorganismos	71
4.3.2. Aislamiento e identificación de microorganismos	73
4.3.2.1. <i>Identificación de lactobacilos</i>	73
4.3.2.2. <i>Identificación de levaduras</i>	74
4.4. ANÁLISIS Y AJUSTES ESTADÍSTICOS	75
4.4.1. Estudio del efecto combinado de las diversas sales minerales sobre los parámetros de crecimiento de <i>L. pentosus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	75

4.4.2. Estudio del efecto de la composición de las mezclas de sales minerales sobre los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, descriptores sensoriales y contenido mineral de las fermentaciones y envasados de aceitunas	77
4.4.3. Análisis quimiométricos	79
4.4.4. Modelos cinéticos aplicados	80
4.4.4.1. <i>Modelos de crecimiento/decrecimiento de microorganismos</i>	80
4.4.4.1.1. Crecimiento de microorganismos	80
4.4.4.1.2. Crecimiento/decrecimiento de microorganismos	81
4.4.4.2. <i>Modelos cinéticos aplicados a la producción de ácido láctico o acidez total</i>	82
4.4.4.2.1. Modelo cinético de tercer orden para la formación de ácido	82
4.4.4.2.2. Modelo basado en la ecuación de Gompertz reparametrizada	82
4.4.4.3. <i>Modelos cinéticos aplicados a la evolución del color</i>	83
4.4.4.3.1. Modelo de cinética de decrecimiento o descenso de pseudo segundo orden	83
4.4.4.3.2. Modelo cinético de primer orden	83
4.4.5. Programas informáticos	84
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5.1. EFECTO DE LAS SALES MINERALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS EN MEDIO DE LABORATORIO	87
5.1.1. Efecto individual del NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂	87
5.1.1.1. <i>Efecto sobre S. cerevisiae</i>	87
5.1.1.2. <i>Efecto sobre L. pentosus</i>	89
5.1.1.3. <i>Rango de inhibición de las sales</i>	90
5.1.2. Efecto combinado del NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂	92
5.1.2.1. <i>Efecto sobre S. cerevisiae</i>	92
5.1.2.2. <i>Efecto sobre L. pentosus</i>	100
5.1.3. Efecto del ZnCl₂ sobre el crecimiento de levaduras	108

5.1.3.1. Susceptibilidad y resistencia de las levaduras frente a $ZnCl_2$	108
5.1.3.2. Respuesta de las levaduras por encima del valor MIC	112
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE CLORURO SÓDICO POR OTRAS SALES MINERALES EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS	117
5.2.1. Fermentación de aceitunas de mesa estilo sevillano de la variedad Gordal	117
5.2.1.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	117
5.2.1.1.1. pH y acidez libre	117
5.2.1.1.2. Cambios en el contenido de azúcares y ácidos en las salmueras	120
5.2.1.1.3. Contenido de minerales en pulpa	132
5.2.1.1.4. Análisis sensorial	136
5.2.1.1.5. Análisis multivariante del contenido en minerales y descriptores sensoriales	142
5.2.1.2. <i>Efectos sobre los microorganismos</i>	144
5.2.1.2.1. Análisis multivariante de los parámetros relacionados con el crecimiento de los microorganismos	149
5.2.1.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras y BAL	150
5.2.2. Fermentación de aceitunas de mesa de la variedad Manzanilla al estilo sevillano	151
5.2.2.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	151
5.2.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	151
5.2.2.1.2. Color	155
5.2.2.1.3. Textura instrumental	156
5.2.2.1.4. Contenido de minerales en pulpa	158
5.2.2.1.5. Análisis sensorial	163
5.2.2.2. <i>Efectos sobre los microorganismos</i>	168
5.2.2.2.1. Análisis Multivariante	176
5.2.2.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras y BAL	178
5.2.3. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga colocada directamente en salmuera	179

5.2.3.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	179
5.2.3.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	179
5.2.3.1.2. Color	183
5.2.3.1.3. Textura instrumental	184
5.2.3.1.4. Contenido de minerales en pulpa	186
5.2.3.1.5. Análisis sensorial	191
5.2.3.2. <i>Efecto sobre los microorganismos</i>	194
5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE CLORURO SÓDICO POR OTRAS SALES MINERALES EN LOS ENVASADOS	202
5.3.1. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano	202
5.3.1.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	203
5.3.1.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	203
5.3.1.1.2. Color	207
5.3.1.1.3. Textura instrumental	209
5.3.1.1.4. Contenido de minerales en pulpa	211
5.3.1.1.5. Análisis sensorial	217
5.3.1.1.6. Análisis multivariante	221
5.3.1.2. <i>Efecto sobre los microorganismos</i>	224
5.3.2. Envasado de aceitunas Aloreña de Málaga tradicional	226
5.3.2.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	226
5.3.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	226
5.3.2.1.2. Color	228
5.3.2.1.3. Textura instrumental	229
5.3.2.1.4. Contenido de minerales en pulpa	230
5.3.2.1.5. Análisis sensorial	235
5.3.2.2. <i>Efecto sobre los microorganismos</i>	239
5.3.2.2.1. Análisis multivariante	240
5.3.2.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras	242
5.4. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE CLORURO DE ZINC EN LOS ENVASADOS	243
5.4.1. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con ZnCl₂	243
5.4.1.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	244

5.4.1.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	244
5.4.1.1.2. Color	246
5.4.1.1.3. Contenido de Zn en pulpa	246
5.4.1.1.4. Análisis sensorial	247
5.4.1.2. <i>Efecto sobre los microorganismos</i>	251
5.4.2. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl₂	254
5.4.2.1. <i>Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos</i>	255
5.4.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada	255
5.4.2.1.2. Cambios en el contenido de azúcares y ácidos en salmuera	257
5.4.2.1.3. Color	260
5.4.2.1.4. Textura instrumental	264
5.4.2.1.5. Contenido de Zn en pulpa	266
5.4.2.1.6. Análisis sensorial	267
5.4.2.1.7. Análisis multivariante	268
5.4.2.2. <i>Efecto sobre los microorganismos</i>	270
6. CONCLUSIONES	275
7. BIBLIOGRAFÍA	281
8. ANEXO	299

1. RESUMEN

El cloruro sódico (NaCl) juega un papel fundamental en la fermentación y envasado de las aceitunas de mesa ya que influye sobre la estabilidad microbiológica y las características organolépticas de las mismas. Sin embargo, debido a los problemas de salud que una dieta rica en sodio (Na) puede provocar, los consumidores demandan cada vez con más énfasis alimentos con bajo contenido en este elemento. Por lo tanto, se hace necesario disminuir los niveles de Na en las aceitunas de mesa y la sustitución del NaCl por otras sales minerales representa una alternativa razonable. Sin embargo, es conveniente, en primer lugar, conocer el efecto que dicha sustitución producirá sobre el crecimiento de los microorganismos que se desarrollan en ellas, para, posteriormente, examinar las posibles influencias sobre las características nutricionales y organolépticas de los nuevos productos.

Por lo tanto, la primera parte del presente trabajo de investigación evalúa los efectos individuales y combinados de diferentes sales minerales (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ y ZnCl₂) sobre el crecimiento de los microorganismos en medios de laboratorio. Se han elegido como modelos *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus pentosus*, especies ampliamente relacionadas con los procesos de elaboración de aceitunas de mesa. En una primera etapa se han obtenido las mínimas y máximas concentraciones inhibitoras (NIC y MIC respectivamente) de cada una de las sales antes mencionadas frente a dichos organismos. El NaCl y CaCl₂ muestran los mayores efectos inhibidores sobre el crecimiento de los mismos, ambos con valores muy similares, mientras que el KCl, y sobre todo el MgCl₂, tienen actividades menos acentuadas. Posteriormente, se evalúa, utilizando un diseño D-óptimo de mezclas, el efecto de la sustitución parcial del NaCl por otras sales (con la limitación de que la suma total de todas ellas no supere el 9%) sobre los parámetros de crecimiento (máxima velocidad de crecimiento específico, fase de latencia y máximo tamaño poblacional) de *S. cerevisiae* y *L. pentosus*. Los resultados indican que el NaCl podría ser reemplazado, en parte, por el CaCl₂ con efectos similares sobre el crecimiento de ambos gérmenes. Sin embargo, el KCl y, particularmente, el MgCl₂ no muestran grandes efectos inhibidores, por lo que, en especial la utilización de este último, debe estar más orientada hacia su empleo como suplemento que se añada en el envasado a determinadas aceitunas de mesa con la finalidad de aumentar su valor nutricional. Por otra parte, el ZnCl₂ ha presentado un claro efecto inhibitor sobre levaduras, habiéndose estudiado los NIC y MIC del mismo

para las especies más representativas aisladas de aceitunas de mesa. En todos los casos, dicho compuesto presentó un gran efecto fungicida en medio de laboratorio, impidiendo el crecimiento de todas las levaduras a concentraciones iguales o superiores a 250 mg/L.

En la segunda parte del trabajo, se evalúa el efecto de las mismas sales antes mencionadas tanto en fermentaciones como en envasados de diferentes variedades de aceitunas (Gordal, Manzanilla y Aloreña de Málaga). Las investigaciones realizadas han demostrado que la sustitución del NaCl por CaCl₂ en las fermentaciones muestra un comportamiento favorable sobre algunas características, ya que, en general, baja el pH inicial y final de la salmuera, reduce la velocidad de difusión de los azúcares, pero no disminuye la acidez libre (y, por tanto, la estabilidad microbiológica del producto); desde el punto de vista organoléptico, la presencia de calcio proporciona a las aceitunas una mayor textura y una menor sensación de salado pero puede llegar a incrementar la sensación de amargor. En el caso de la adición de ZnCl₂ a los envasados, la presencia de la sal no afecta a la mayoría de las características físico químicas al tiempo que se confirma su efecto inhibitor sobre las poblaciones de levaduras y enterobacterias en determinadas condiciones y se observa que reduce la sensación de amargor. De esta manera, el mismo se vislumbra como un posible sustituto del sorbato potásico como conservante en el envasado de aceitunas de mesa. Su uso, además, aumentaría también el valor nutricional de estos productos, que presentan habitualmente una baja concentración de este mineral.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden resultar de gran utilidad para el desarrollo de nuevos procesos de fermentación y envasado de aceitunas de mesa, que den lugar a nuevas presentaciones microbiológicamente estables y seguras y, sobre todo, con un valor nutricional añadido, debido al aumento de la concentración de determinados elementos minerales considerados favorables desde el punto de vista de la salud.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL CULTIVO DEL OLIVO

El olivo (*Olea europea*, L.) es un árbol milenario de la cuenca del Mediterráneo, de gran envergadura, que crece actualmente tanto de manera salvaje como cultivado. Los primeros olivos surgieron posiblemente hace alrededor de 5000 a 6000 años en una amplia zona del este del Mediterráneo. [Vavilov \(1951\)](#) considera que el olivo proviene originariamente de las actuales Siria e Irán; sin embargo, [Almeida \(1963\)](#) lo sitúa en Afganistán en donde todavía hay numerosas especies que pertenecen a la familia Oleaceae. Sin embargo, [Simmonds \(1976\)](#) lo relaciona con el Norte de África. Desde su lugar de origen, su cultivo se extendió en una primera fase por todo el área mediterránea y, a partir del descubrimiento de América, a prácticamente todo el mundo en una zona templada comprendida entre los 25° y 45° de latitud Norte y los 15° y 35° de latitud Sur ([Fernández Díez y col., 1985](#); [Garrido Fernández y col., 1997](#); [Barranco y col., 1998](#)).

Este árbol tiene hojas con el ápice obtuso, verde oscuro por el haz y blanquecino por el envés. Las flores se reúnen en panículas y sus drupas son las conocidas aceitunas, con mesocarpio bien desarrollado y una forma elipsoide o con parecido a manzana (de ahí posiblemente el nombre de Manzanilla para la variedad que más se aproxima a ella). A partir de su formación el fruto evoluciona lentamente durante la primavera; pero, al comenzar el verano, se acelera su crecimiento y la drupa, que se había mantenido verde hasta finales de septiembre, comienza a madurar de forma rápida. De esta manera, a primeros de octubre presenta, primero una tonalidad rosada, que suele aparecer por el ápice y, después, una tonalidad más oscura que se extiende de manera progresiva al resto del mismo. No obstante, para la maduración completa deben transcurrir todavía algunos meses e, incluso, esperar la llegada del nuevo año.

El fomento del cultivo del olivo y del uso de los productos derivados se empleó por los romanos para el asentamiento de las poblaciones situadas en torno al Mediterráneo y todavía se sigue utilizando como herramienta política para el desarrollo de estos países. Al final de la segunda guerra mundial, las Naciones Unidas auspiciaron la creación del Consejo Oleícola Internacional (COI) en una conferencia celebrada en La Habana. La finalidad de dicha institución, financiada por todos sus miembros, es la de fomentar la producción, consumo y comercio internacional tanto del aceite de oliva como de la aceituna de mesa así como la regulación de las transacciones internacionales

de ambos productos. Para ello, se llevan a cabo actividades de promoción, formación, legislación, etc. Una de las tareas más interesantes realizadas por el COI ha sido la promulgación de las correspondientes normas de calidad del aceite de oliva y las aceitunas de mesa, que han permitido dar una seguridad y estabilidad al comercio internacional de ambos productos.

2.2. LAS ACEITUNAS COMO ALIMENTO

La totalidad de los autores considera que el uso de los frutos del olivo como alimento se remonta a la antigüedad. La referencia escrita más antigua de diversas recetas para la preparación de aceitunas de mesa se encuentra en el libro *De Re Rustica*, escrito por Lucius Junius Moderatus Columella en el año 54 después de Cristo (Columella, 54), cuyos doce volúmenes se consideran la fuente más importante de información sobre la agricultura romana.

Como se ha comentado anteriormente, la aceituna es el fruto del olivo. Se trata de una drupa carnosa que posee un componente amargo (oleuropeína), una baja concentración en azúcares (2,6-6%) y un alto contenido graso (10-30%), aunque estos valores dependen del grado de maduración y de la variedad. Ello hace que no pueda ser consumida directamente del árbol y que necesite ser procesada para dotar al producto final de unas características organolépticas adecuadas (Garrido Fernández y col., 1997). Su alto contenido en polifenoles (antioxidantes naturales) y fibra encuadran a las aceitunas de mesa dentro de lo que ha venido en llamarse alimentos con fibra antioxidante, lo que las convierten en un alimento con interesantes propiedades funcionales.

El hecho de que el olivo sea un árbol tan ampliamente difundido y haberse aclimatado a lugares geográficamente tan distanciados, hace que con el transcurso del tiempo se hayan ido diferenciando una serie de variedades más o menos relacionadas entre sí. Suele distinguirse entre variedades destinadas a la producción de aceite y de aceitunas de mesa, ya que las características que se les exigen a cada una de ellas son diferentes. En este sentido, las propiedades que deben reunir las destinadas a la elaboración de aceitunas de mesa son las siguientes:

- Buena relación pulpa/hueso.
- Tamaño apropiado.
- Fácil mecanización (deshuesado, relleno, obtención de rodajas, etc.).
- Forma atractiva para los consumidores.
- Adecuada proporción de azúcares.
- Piel fina y textura agradable.

Por ello, solo se destinan a mesa una selección muy reducida de todas las variedades disponibles en España. En esta Tesis sólo se describirán con cierto detalle las empleadas en el presente trabajo (Figura 2.1).



Figura 2.1. De izquierda a derecha, aceitunas de las variedades Manzanilla, Gordal y Aloreña de Málaga, utilizadas en las experiencias del presente trabajo.

Manzanilla

Es sin duda la más conocida de las variedades españolas y, a su vez, la más extendida por todo el mundo. Se dedica fundamentalmente a la elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano o español, preparación en la que da un producto de gran calidad. Además, por su forma, redondeada que recuerda a la manzana, y textura, puede mecanizarse con bastante facilidad, por lo que el número de presentaciones de la misma en el mercado es muy amplio. Su cultivo está ampliamente extendido en nuestro país, si bien adquiere su mejor calidad en climas suaves, como la ribera del Guadalquivir, el Aljarafe o la campiña Sevillana. Se suelen encontrar algunas variantes de la misma que reciben diferentes denominaciones tales como Fina, Carrasqueña y Serrana. Su tamaño es mediano, entre 200 y 300 frutos por kg, con una relación pulpa/hueso de

aproximadamente 6:1. Tiene un contenido medio en aceite (15-19%), siendo su piel de color verde claro, con ligeras motas blanquecinas, y muy fina. De hecho, es relativamente sensible al denominado “despellejado” o desprendimiento de la piel a causa del tratamiento con lejía.

Gordal

Su característica más destacada es su gran tamaño (70-120 frutos por kg) y su facilidad para la fermentación según el estilo español o sevillano. Sin embargo, se emplea también para preparar aceitunas aliñadas, presentación que tiene una gran aceptación en el mercado, y para tipo negras. Se cultiva principalmente en la provincia de Sevilla. Su epicarpio es fino, verde claro, con pintas blancas características y su mesocarpio de agradable textura. Su relación pulpa:hueso es de 7-8:1 y sus frutos son elipsoides, con ligero aspecto acorazonado, y hueso de forma regular con estrías profundas. Es de una madurez temprana y su recolección se suele realizar a partir de los primeros días de septiembre.

Aloreña de Málaga

Se la relaciona con la Manzanilla y, de hecho, se le ha venido denominando Manzanilla-Aloreña, si bien tiene cualidades que la diferencian claramente. Tiene forma de manzana, con un color superficial verde y posee una concentración de componentes amargos relativamente baja, lo que hace que se pueda comercializar desde el mismo momento de su recolección, denominándose, en este caso, Aceituna Aloreña de Málaga verde fresca. Su zona de producción se centra en el suroeste de la provincia de Málaga. La comarca está perfectamente delimitada por un conjunto de montañas, siendo el río Guadalhorce el eje de la misma. Una de las señas de identidad de esta variedad es el hecho de que posee un hueso flotante y que se desprende con gran facilidad. Normalmente, se parte antes de someterla al proceso de conservación. Es una variedad muy apreciada en toda la Costa del Sol, cuando se comercializa como verde fresca, y en el resto del país, cuando se prepara a partir de frutos conservados. Es la única aceituna que posee Denominación de Origen Protegida (DOP) en nuestro país (BOJA 215, 4 Noviembre 2009, pp 52-66).

2.3. DEFINICIÓN, TIPOS Y PRESENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA

Según la norma vigente de Calidad para las Aceitunas de Mesa elaborada por el COI (2004), se denomina “aceituna de mesa al producto preparado a partir de frutos sanos de variedades del olivo cultivado (*Olea europea*, L.), elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometidos a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservados mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, envasados con o sin líquido de gobierno”.

Esta norma clasifica las aceitunas de mesa en tres tipos, atendiendo al grado de madurez de los frutos que constituyen la materia prima:

- *Aceitunas verdes*: frutos recogidos durante el ciclo de maduración, cuando han alcanzado su tamaño normal.
- *Aceitunas de color cambiante*: frutos recogidos antes de su completa madurez durante el envero.
- *Aceitunas negras*: frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella.

Sin embargo, la legislación española contempla un cuarto tipo, las negras por oxidación ([Ministerio de la Presidencia, 2001](#)).

A partir de estos tipos de frutos se pueden elaborar diferentes preparaciones comerciales, que se diferencian, fundamentalmente, en cuanto a la forma de eliminar o reducir el amargor natural de los frutos. De esta manera se pueden tener:

· *Aceitunas aderezadas*: preparadas a partir de cualquiera de los tipos anteriores cuando las mismas se someten a un tratamiento alcalino (NaOH).

· *Aceitunas al natural*: obtenidas a partir de cualquiera de los tipos anteriores tratadas directamente en salmuera.

· *Aceitunas deshidratadas o arrugadas*: obtenidas a partir de cualquiera de los tipos anteriores, tratadas o no con álcali, cuando las mismas están parcialmente deshidratadas.

· *Aceitunas ennegrecidas por oxidación*: obtenidas a partir de aceitunas verdes o de color cambiante, conservadas en salmuera o cualquier otra solución y ennegrecidas por oxidación.

Además de las presentaciones arriba mencionadas, la norma del COI contempla también las denominadas “*especialidades*”, apartado en el que se engloba cualquier otro tipo de preparación que no encaje en las anteriores (COI, 2004). En este apartado, es en el que debe ubicarse el producto denominado Aceituna Aloreña de Málaga, para la que se emplea salmuera con adición de hierbas aromáticas naturales o esencias (aliñada).

Los sistemas de conservación de los productos finales pueden ser diversos. Están más explícitamente descritos en la normativa española (Ministerio de la Presidencia, 2001), aunque en las normas del COI se establecen asimismo unos límites relativamente estrictos, con objeto de evitar riesgos sanitarios (COI, 2004). En el caso de las aceitunas verdes completamente curadas, se puede llevar a cabo la estabilización únicamente atendiendo a las características físico-químicas. En caso de productos menos estables bien sea por una fermentación solo parcial (aceitunas verdes) o por la propia idiosincrasia del producto como las aceitunas colocadas directamente en salmuera o las aliñadas, es necesario acudir a tratamientos de pasteurización o al uso de conservantes (sorbato potásico y benzoato sódico). Finalmente, las tipo negras, al ser un producto de baja acidez ($\text{pH} > 4,6$) requieren obligatoriamente un tratamiento térmico de esterilización.

Las aceitunas pueden igualmente ofrecerse al consumidor según diversas formas de presentación: enteras, deshuesadas, machacadas o partidas, seccionadas o rajadas, mitades, en cuartos, gajos, lonjas o rodajas, troceadas, rotas, rellenas de múltiples materias, para ensalada, alcaparrado (mezcla de aceitunas y alcaparras) o pasta. De todo lo anterior cabe deducirse que las formas de presentación que pueden encontrarse en los mercados son muy diversas y el número de presentaciones comerciales crece continuamente debido al desarrollo por parte de los técnicos de nuevos tipos de rellenos,

aliños, formas de envases, etc. Esta constante renovación está dando un gran dinamismo al sector tanto en España como a escala mundial.

2.4. PRODUCCIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

El cultivo del olivo se ha expandido de una manera espectacular a partir de la segunda mitad del Siglo XX. En consecuencia, tanto la producción de aceite de oliva como la producción mundial de aceitunas de mesa ha crecido también de forma progresiva a lo largo de todo este periodo de tiempo. A ello ha contribuido decisivamente la fermentación en grandes masas y la mecanización de las operaciones de deshuesado y relleno. En estos momentos la producción se sitúa ya claramente por encima de los dos millones de toneladas/año. La evolución en las últimas campañas de la producción, consumo y exportación a escala mundial se recoge en la Figura 2.2 (la campaña 2008/2009 es la última para la que se dispone de cifras definitivas en el momento de redactar esta Tesis). En función de dichos datos, puede afirmarse, sin lugar a dudas, que las aceitunas de mesa constituyen el producto vegetal fermentado de mayor difusión en los países occidentales y el pilar fundamental de las economías de muchos países oleícolas.

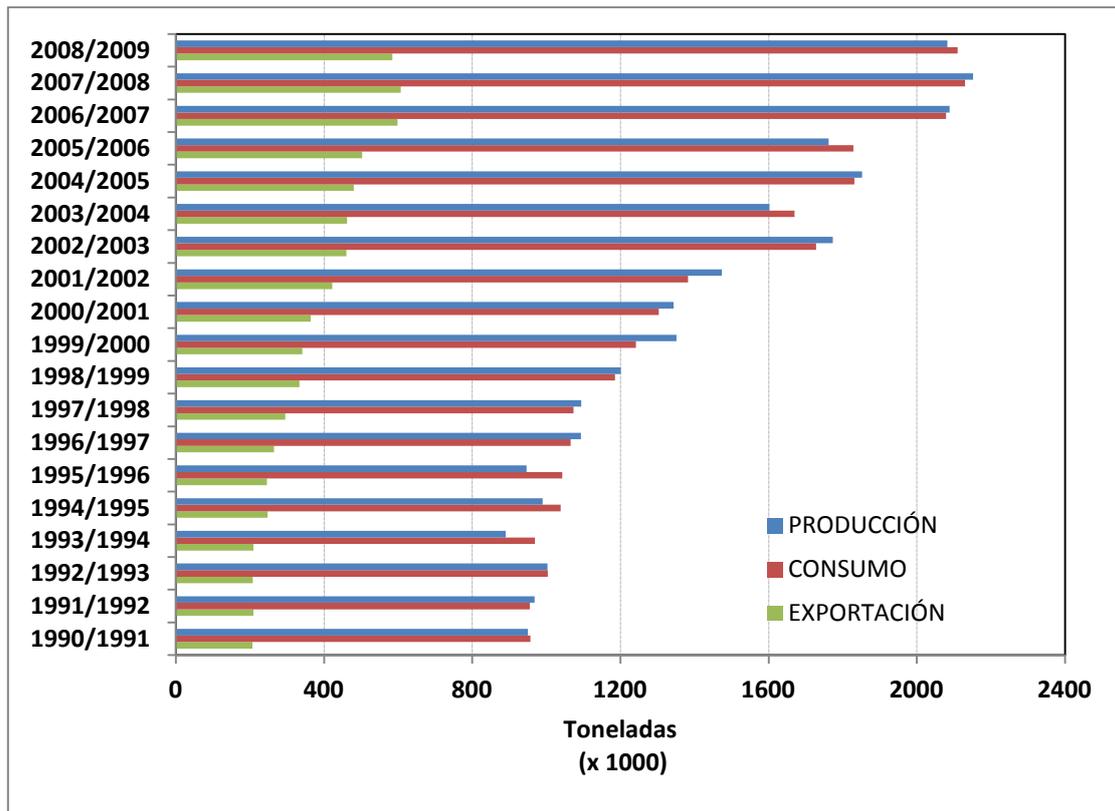


Figura 2.2. Producción y consumo mundial de aceitunas de mesa en las últimas campañas. Fuente: COI, 2011.

El principal productor a escala mundial es la Unión Europea (UE), cuya contribución representa aproximadamente un tercio del total (Figura 2.3). Le sigue en importancia Egipto, que es el país que ha experimentado el mayor crecimiento de todo el mundo oleícola. Sus olivares se sitúan en las proximidades del desierto y han constituido un verdadero desafío para la moderna agricultura. Otros países que también superan o se aproximan a las 100.000 t son Turquía, Siria, Marruecos, Argelia y Argentina. En cualquier caso, como ya se ha apuntado, estas cifras sitúan a las aceitunas de mesa a la cabeza de los productos vegetales fermentados.

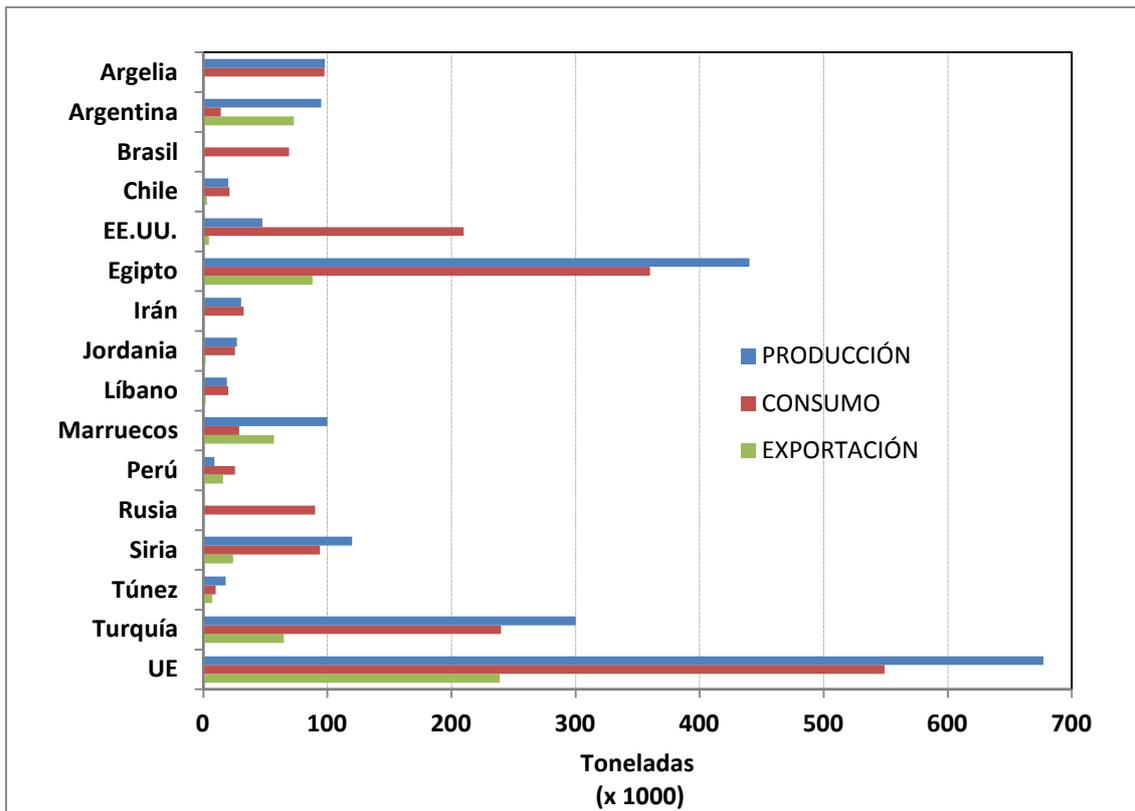


Figura 2.3. Producción, consumo y exportación (x 1.000 t) de aceitunas de mesa en los principales países oleícolas (producción > 10.000 t). Campaña 2008/2009. Fuente: COI, 2011.

Como puede apreciarse del estudio de la Figura 2.3, los países productores son, a su vez, consumidores, especialmente en aquellas áreas en las que existe una larga tradición de elaboración de estos productos. En esa lista, existe solo un caso en el que el consumo supera claramente a la producción, que es EE.UU. Por lo tanto, la mayoría de las aceitunas que se producen son para consumo interno de los propios países oleícolas.

Por lo que respecta a la situación dentro de la UE, la Figura 2.4 muestra la producción de los principales países oleícolas dentro de ella. Destaca de manera muy clara la preponderancia de España en este sector con 485.700 t para la campaña 2008/2009. Le sigue en importancia Grecia, que es en torno a la quinta parte de España (105.000 t) e Italia, alrededor de la séptima (68.500 t).

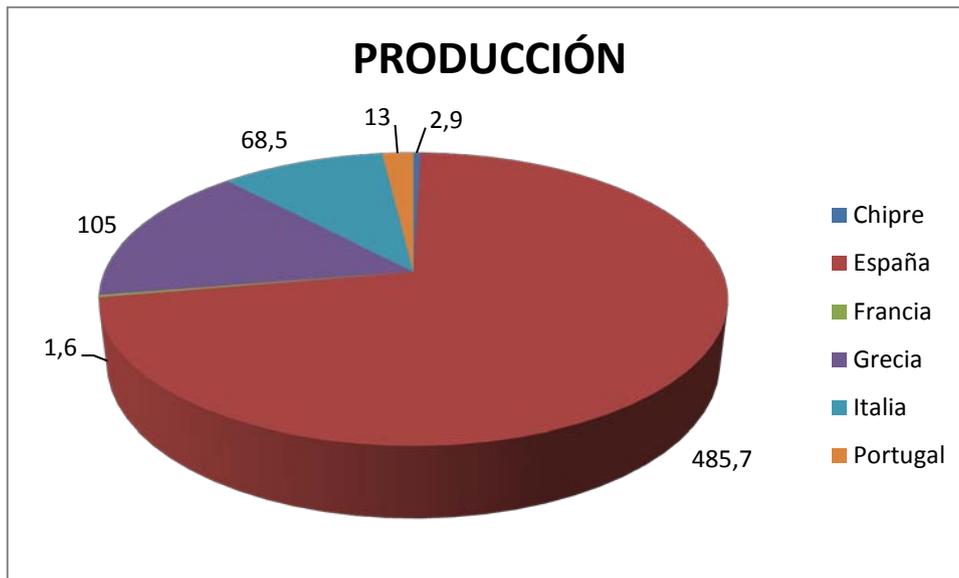


Figura 2.4. Producción (x 1.000 t) de aceitunas de mesa en los principales países oleícolas de la UE. Campaña 2008/2009. Fuente: COI, 2011.

Del estudio de las exportaciones de aceitunas de mesa a terceros países por parte de la UE se desprende que, de todos sus miembros, únicamente España y Grecia destinan una proporción destacada al comercio internacional; pero, sobre todo España, que es el líder mundial indiscutible en producción y exportación de aceitunas de mesa. Comparando la cifra de exportación (que únicamente contempla, como se ha comentado, los envíos a terceros países), España representa el 69,1% del total de las transacciones extra comunitarias de este producto, posición que se refuerza incluso más cuando se tiene en cuenta, asimismo, los envíos de aceitunas que se destinan al resto de los socios de la UE.

De todo lo anterior, se deduce claramente el importante papel que desempeña España en la producción mundial de las aceitunas de mesa y en el comercio internacional y, por tanto, la significación de dichos productos en la economía nacional y autonómica. Existen olivos prácticamente en toda España y por ello la tradición de la preparación casera de aceitunas y su utilización habitual en la dieta. A pesar de ello, resulta sorprendente que el consumo *per cápita* español se sitúe por debajo del de muchos otros países oleícolas. Por ello, de la producción de aceitunas de mesa españolas, aproximadamente, tan solo un 20-30% se consume en el mercado interno español; el resto se exporta, lo que tiene una indudable repercusión favorable en la

balanza de pagos nacional. El total de exportaciones nacionales representa aproximadamente 500 millones de euros anuales (ASEMESA, 2007). La industria de la aceituna genera más de 9.000 empleos directos, lo que supone el 27% del sector nacional de conservas y preparados vegetales.

En Andalucía, la producción de aceitunas de mesa es de gran importancia dentro del sector agrario y comercial con 403.136 t en la campaña 2009/2010. La contribución de cada provincia es asimismo muy dispar. La mayoría de esa cosecha, 284.120 t, se obtuvieron en la provincia de Sevilla, lo que constituye el 70,5% del total de la región. Le sigue Córdoba (65.249 t), principalmente por la incorporación al mercado de la variedad de doble uso *Hojiblanca*, muy abundante en esta zona. Asimismo, Málaga tiene una producción muy destacada, habiendo recibido en los últimos años un impulso decisivo gracias al incremento de la elaboración de la Aceituna Aloreña de Málaga. Las producciones de aceitunas de Huelva (4.302 t) se deben principalmente a plantaciones ubicadas en las zonas limítrofes con Sevilla.

2.5. SUCINTA DESCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES PROCESOS DE ELABORACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

Los tres principales estilos de elaboración de aceitunas de mesa son: verdes estilo español o sevillano, tipo negras (o estilo californiano) y colocadas directamente en salmuera. Dentro de estas últimas se encuentran la Aceituna Aloreña de Málaga y las aceitunas aliñadas denominadas como “especialidades”. A continuación se comentan los principales tipos de elaboración de aceitunas de mesa que se han utilizado en el presente trabajo.

2.5.1. Elaboración de aceitunas verdes estilo español o sevillano.

a) Tratamiento alcalino y lavado.

La primera etapa de elaboración de este estilo de aceitunas consiste en la eliminación mediante hidrólisis alcalina (lejía) de la oleuropeína, componente fenólico que da el característico sabor amargo a estos frutos. Las soluciones suelen tener una

concentración 2,0-2,5% en NaOH y se les deja penetrar hasta los 2/3 de la pulpa. El tratamiento suele durar en total alrededor de unas 7-9 h o algo más en las variedades más sensibles. En el transcurso del mismo se permeabiliza la piel y se solubilizan los azúcares, minerales y otros nutrientes necesarios para la posterior etapa de fermentación. A continuación, los frutos se lavan con objeto de eliminar el exceso de álcali (Borbolla y Alcalá y Rejano Navarro, 1978). Actualmente se suele dar un solo lavado y su duración no suele exceder de las 18-24 h con objeto de no favorecer el excesivo crecimiento de microorganismos que puedan dar lugar a posteriores alteraciones (Bacterias gram-negativas, *Bacillus*, etc.). En esta etapa se eliminan nutrientes en cantidades proporcionales a la duración del tiempo que los frutos permanecen sumergidos en el agua.

b) Fermentación

Una vez finalizado el tratamiento alcalino en su conjunto, las aceitunas se colocan en salmuera (10 -12% NaCl), con el pH corregido o no, e inmediatamente después comienza el proceso de fermentación. En el transcurso de este proceso, los azúcares se transforman fundamentalmente en ácido láctico. Al mismo tiempo, los elementos orgánicos solubles y los minerales se diluyen a la salmuera por lo que los frutos pueden experimentar pérdidas importantes desde el punto de vista nutricional. En el transcurso de la fermentación espontánea de las aceitunas verdes estilo español se distinguen tradicionalmente cuatro fases.

La primera se prolonga desde que los frutos se colocan en salmuera hasta que transcurren 48-72 h. La mayoría de los microorganismos presentes en esta fase son contaminantes de los fermentadores, utensilios, bombas, etc. Entre los mismos se han encontrado gérmenes pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y numerosas bacterias gram-negativas, principalmente pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (González Cancho, 1960). Por tanto, es muy recomendable evitar al máximo la contaminación en esta fase, extremando la limpieza.

La segunda fase comienza cuando el pH ha descendido ya a 6,0 unidades. En su forma tradicional, se caracteriza por una disminución progresiva de las bacterias gram-negativas y un incremento del desarrollo de bacterias lácticas (BAL) resistentes a concentraciones bajas de ácido, principalmente cocos lácticos (González Cancho y

Durán Quintana, 1981). Los mismos pertenecen mayoritariamente a los géneros *Pediococcus* (homofermentativo) y *Leuconostoc* (heterofermentativo) (Fernández Díez y col., 1985; Garrido Fernández y col., 1997).

La tercera fase se caracteriza por el crecimiento abundante de lactobacilos, principalmente de las especies *Lactobacillus plantarum* (según las primeras identificaciones) (González Cancho, 1963) y *Lactobacillus pentosus* (más adelante). También se ha descrito la presencia de *Lactobacillus delbrueckii*, aunque con un papel bastante menos relevante. Esta fase se distingue por un crecimiento elevado de BAL que transforman los azúcares en ácido láctico y originan una importante bajada del pH.

La cuarta fase comienza en el momento en que deja de producirse ácido láctico y se han agotado los azúcares. Los microorganismos que se encuentran en mayor abundancia en esta fase son especies del género *Propionibacterium* (Borbolla y Alcalá y col., 1975; Rejano Navarro y col., 1978) que producen ácido acético y propiónico a partir del láctico generado en el transcurso del proceso principal. Dicho crecimiento suele dar lugar a una elevación del pH (0,1-0,3) sin mayor trascendencia. Únicamente cuando la elevación es superior a estos valores puede suponer un riesgo microbiológico. Un adecuado control de la salmuera por encima de 8% en NaCl es generalmente suficiente para evitar la aparición de dicha alteración.

Durante prácticamente todo el tiempo que dura la fermentación de las aceitunas verdes, las salmueras también contiene una abundante flora de levaduras (González Cancho, 1960). Se considera que las mismas contribuyen de una manera muy destacada a las propiedades sensoriales del producto así como al crecimiento de las propias BAL, debido a la producción de vitaminas. Sin embargo, cuando las mismas son muy abundantes pueden dar lugar a cambios que terminen por producir alteraciones, debido a la subida del pH que puede provocar el consumo de algunos ácidos tales como láctico, acético o cítrico en condiciones aeróbicas (Ruiz Cruz y González Cancho, 1969). Se han descrito muchas especies tanto de tipo fermentativo como oxidativo (Fernández Díez y col., 1985; Garrido Fernández y col., 1997). Entre las más destacadas se encuentran *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Pichia membranifaciens* y *Debaryomyces hansenii* (Arroyo-López y col., 2008b).

c) Conservación

A veces, la cuarta fase se prolonga durante un largo periodo de tiempo a la espera de que el producto pueda comercializarse. En este caso, dicha etapa adquiere una relevancia especial y deben tomarse medidas complementarias para asegurar la estabilidad del producto. En condiciones normales, debe haberse producido una acidez láctica suficientemente elevada como para bajar el pH a valores seguros (por debajo de 4,5 unidades). Sin embargo, este descenso depende también de la capacidad tampón del medio, lo que se denomina acidez combinada. Una elevada acidez combinada puede contribuir a mantener un pH relativamente alto, lo que puede dar lugar a alteraciones cuando se aproxime la época de altas temperaturas. En esta etapa, la población microbiana suele estar constituida por BAL y levaduras, ambas en la fase de disminución de sus respectivas poblaciones, debido a que el medio no presenta ya condiciones favorables de crecimiento y los nutrientes escasean. De la misma manera pueden crecer las bacterias propiónicas, como se comentó anteriormente, si la concentración de sal es baja.

d) Acondicionamiento y envasado

Las aceitunas verdes estilo español tienen unas características adecuadas para someterlas a diversas operaciones de acondicionamiento tales como deshuesado, formación de rodajas, deshuesado y relleno, etc. Para llevar a cabo de manera adecuada estas transformaciones, normalmente, se procede de manera previa a la clasificación por calibres porque, además, el tamaño del fruto es también un atributo de calidad que el consumidor estima de manera destacada. En el envasado, independientemente de la forma de presentación, las características físico-químicas del producto final se encuentran dentro de los siguientes rangos: pH, 3,2-4,1; acidez libre, 0,4-0,6%; sal, 5-7% NaCl; acidez combinada; 0,02-0,07 Eq/L (Garrido Fernández y col., 1997). Por tanto, antes de envasarse deberán ajustarse dichas características para que se alcancen en el producto final en equilibrio los niveles anteriores. En general, los valores de los diferentes parámetros mencionados determinan la estabilidad del producto y, por tanto, la posibilidad de que pueda conservarse solo en base a los mismos, sin recurrir a tratamiento térmico alguno o adición de conservantes, siempre que las aceitunas se hayan sometido a un proceso de curado completo.

2.5.2. Elaboración de aceitunas colocadas directamente en salmuera

Representa el sistema más simple y de menor consumo energético. Las aceitunas para este tipo de elaboración abarcan un amplio abanico que va normalmente desde verdes hasta negras naturales, pasando por color cambiante. Al ser aceitunas que se colocan directamente en salmuera, la flora que trae el fruto adquiere una gran importancia al convertirse en un inóculo potencial para la salmuera en la que se colocan. Unos de los primeros autores en estudiar dicha flora fueron [Florenzano y col. \(1973\)](#), quienes encontraron una abundante población de bacterias, levaduras y mohos.

a) Lavado

Debido a que estas aceituna se colocan directamente en salmuera, es necesario someterlas a un lavado antes de introducirlas en los fermentadores con objeto de que no arrastren polvo o tierra. De no hacerlo, se formarán una serie de lodos que pueden ser una fuente de contaminación. También se ha argumentado en alguna ocasión que los mismos, sobre todo si se aplican sumergiendo los frutos en agua, podrían tener un cierto efecto de endulzamiento de los frutos. La realización de lavados estáticos con los frutos sumergidos en salmuera no es en absoluto conveniente. Lo mejor es aplicar lavados dinámicos que eliminen la suciedad y permitan que los últimos líquidos adheridos a los frutos que se arrastren a los depósitos de fermentación sean limpios ([Garrido Fernández y col. 1997](#)).

b) Fermentación

Antes de introducir los frutos en los depósitos, estos se llenan con una cierta cantidad de salmuera con objeto de que la misma amortigüe su caída. Usualmente, la concentración de sal que se utiliza suele ser del 5-10%, estando esta operación mucho menos estandarizada. El principal criterio que se sigue para elegir la concentración de sal es la sensibilidad de la variedad al arrugado, empleándose las concentraciones más bajas en el caso de los frutos más sensibles. La difusión de la sal en las aceitunas colocadas directamente en salmuera es mucho más lenta que en los frutos que sufren un tratamiento con solución alcalina. De todas formas, es una práctica habitual subir la concentración de manera periódica con objeto de restituir los niveles originales o incluso para elevarlos, sobre todo cuando comienza a subir la temperatura en primavera.

Lo mismo ocurre con la solubilización de los nutrientes hacia la salmuera, que es, asimismo, lenta. El proceso fermentativo se realiza para permitir que los frutos se vayan endulzando, debido a la difusión de los fenoles, así como para que adquieran las características organolépticas que el desarrollo microbiológico les comunica, debido a la formación de ciertas cantidades de ácido y, sobre todo, volátiles. En este caso, pueden desarrollarse BAL, pero en la mayoría de los casos el proceso no se lleva a cabo precisamente mediante una fermentación láctica típica, sino que en muchos de ellos el desarrollo de levaduras es el aspecto más importante (Arroyo-López y col., 2008b). La mayoría de los principales cambios físico-químicos que tienen lugar en el transcurso de esta fermentación son debidas a procesos de difusión. Sin embargo, en este caso, los productos suelen tener unos aromas más destacados, al predominar normalmente la presencia de levaduras sobre la de BAL.

Los procesos pueden ser diferentes, dependiendo del tipo de fruto que se emplee (verde o color cambiante o negra natural) y el sistema de fermentación que se aplique (anaerobio o aerobio). Normalmente, los procesos aerobios solo se aplican a las aceitunas que tienen ya coloreada la piel, mientras que las aceitunas verdes sin tratar se conservan en salmuera bajo condiciones anaeróbicas, con objeto de evitar el obscurecimiento superficial. La fermentación de aceitunas verdes o de color cambiante se caracteriza por la mayor textura de los frutos. En la mayoría de los casos, los mismos se destinan a la comercialización como aceitunas “aliñadas”, aunque también pueden presentarse simplemente en salmuera. El proceso fermentativo de estas aceitunas está influenciado de manera muy destacada por la presencia de polifenoles en las salmueras y la relativa escasez de nutrientes. Debido a la inhibición que ejercen algunos polifenoles sobre las BAL y su diferente contenido en las diversas variedades, es común encontrar comportamientos muy variados en estas aceitunas colocadas en salmuera, especialmente, cuando se emplean bombonas para realizar los procesos. Esto se debe a que las empresas dedicadas a estas elaboraciones tienen unos volúmenes de producción relativamente bajos y para ellos, las bombonas representan una unidad de almacenamiento bastante adecuada. Dado que el proceso de endulzamiento de las aceitunas y la formación de volátiles no requiere necesariamente la presencia de BAL, no ha existido un interés por el uso de cultivos iniciadores en estas fermentaciones. Además, no está claro que la producción de acidez sea precisamente conveniente para

los productos finales a los que se destinan estos frutos. Por ello, a escala industrial la utilización de inóculos en estas preparaciones es muy rara.

c) Conservación

A lo largo de todo este periodo sigue la solubilización de sustancias tanto orgánicas como minerales. Muchas de las primeras, aunque no sean directamente azúcares libres, pueden contenerlos formando parte de sus moléculas y ser liberados por las enzimas segregadas por las levaduras presentes. En cuanto a los minerales del fruto, el elemento que se solubiliza en mayor proporción es el potasio (K), que es el más abundante. Por otra parte, el fruto se enriquece en sodio (Na) debido a la presencia de NaCl en la salmuera.

En esta preparación, el proceso no es tan definido como en las verdes, en las que hay claramente una fase de fermentación bien caracterizada, al final de la cual se han agotado los azúcares reductores. En el caso de las aceitunas colocadas directamente en salmuera, la cantidad de sustancias hidrosolubles es considerablemente mayor que en las verdes, sobre todos en las maduras, y, por otra parte, como se ha comentado, la solubilización de sustancias es marcadamente más lenta (excepto en los frutos partidos). Por ello, el crecimiento de microorganismos se mantiene durante periodos prolongados, que, en la práctica, se extiende a todo el tiempo que las aceitunas permanecen en la salmuera. Durante el transcurso de la conservación pueden darse con frecuencia problemas de alteraciones (“alambrado” principalmente) si no se adoptan las medidas adecuadas para su prevención. Este riesgo es mayor cuando la temperatura comienza a subir al llegar la primavera. En el caso de la fermentación en medio anaerobio, se suele aumentar la concentración de sal por encima del 8%. Sin embargo, el procedimiento es eficaz tan solo en el caso de aceitunas verdes, pero no en las de color cambiante o maduras. En estas, la mejor manera de prevenir problemas de “alambrado” es continuar manteniendo el sistema aerobio hasta que se comercialice el producto.

d) Acondicionamiento y envasado

En general, la primera operación a la que se someten las aceitunas colocadas directamente en salmuera es la de escogido. Esta operación es muy importante en este caso, porque a la entrada de los frutos, normalmente, no se ha realizado ninguna

operación para seleccionarlos y porque, además, el proceso fermentativo de las aceitunas colocadas en salmuera da lugar al deterioro de una proporción de ellas algo mayor que en el caso de las verdes estilo español. Este escogido es, por supuesto, mucho más importante cuando se realiza con frutos maduros. A continuación los frutos se pueden clasificar por tamaños, puesto que los más gruesos siempre tienen una mayor aceptación en el mercado. Por otra parte, las aceitunas verdes que se conservan en salmuera presentan siempre una textura elevada y no demasiado apta para que las mismas se sometan a las operaciones tales como deshuesado, formación de rodajas, etc. que se han descrito para la verdes estilo español. Normalmente, se comercializan como “aliñadas”, y la operación más frecuente es el “partido”. En el caso de las aceitunas maduras, el escogido y la clasificación se aprovecha también para mantener los frutos expuestos al aire durante un cierto periodo de tiempo con objeto de que recuperen el color y se produzca un cierto oscurecimiento de la superficie. En el caso del sistema aerobio esta operación no es necesaria.

En general, la estabilización de estas aceitunas durante el envasado es más complejo que en las verdes debido a esa mayor tendencia a ir solubilizando nutrientes de manera lenta, pero continuada. Por ello, para asegurar una adecuada vida de mercado debe recurrirse al uso de conservantes, que tienen un efecto limitado, o a pasterización, no aplicable en muchos casos a las aceitunas aliñadas, por los sabores a “cocinado” o desagradables que producen los aliños después del tratamiento térmico. Esto hace que la pasterización sea la mejor elección cuando los frutos están enteros y en salmuera. Sin embargo, si se usan aliños, lo más habitual es emplear conservantes.

2.5.3. Especialidades

En este apartado se comentará una preparación diferente a las típicas de aceitunas de mesa, pero que cuenta asimismo con una larga tradición. Se trata de la “Aceituna Aloreña de Málaga”, que es la primera presentación comercial de aceitunas en nuestro país que cuenta con DOP. Como se desprende de su nombre, dicho producto se elabora exclusivamente a partir de la variedad Aloreña. En el Reglamento se contemplan tres formas de presentación: Verdes Frescas, Tradicionales y Curadas. La última de ellas se realiza a partir de frutos conservados en salmuera en recipientes de

gran capacidad y aplicando unas condiciones tales que al llegar la primavera experimentan una fermentación láctica. Sin embargo, las otras dos presentan peculiaridades interesantes de comentar. Las Verdes Frescas se preparan a partir del fruto fresco partido sin conservar, con la sola limitación de que deben elaborarse con aceitunas que permanezcan almacenadas al menos durante 72 h con objeto de que el proceso respiratorio se haya detenido prácticamente. En el caso de la forma de presentación denominada Tradicional, las aceitunas pueden ser conservadas en salmuera después de partidas, manteniéndose en el patio bajo sombra o en cámara frigorífica.

a) Colocación en salmuera

Los frutos se recogen a mano cuando están todavía verdes, aunque ya con una ligera tonalidad amarillenta. Se transportan a las instalaciones en contenedores diversos, pero lo más general es que tengan una capacidad de 1000 kg y las paredes perforadas para permitir la respiración. [Arroyo López \(2007\)](#) realizó un estudio durante varias campañas de la flora que portaba la aceituna en el momento de la recolección, observando que la superficie de la misma se hallaba prácticamente libre de microorganismos. Solo el grupo de los aeróbicos mesófilos totales se encontraban en una cierta proporción ($<2,5 \log_{10}$ ufc/mL). En la mayoría de los casos se trataba de formas bacilares esporuladas que por sus características pertenecían al género *Bacillus*. Sin embargo, ya durante el primer lavado con los frutos todavía intactos, el número de microorganismos en la superficie de la misma se incrementó considerablemente.

b) Conservación-fermentación

Cuando la aceituna se conserva, se recoge ya directamente en bombonas, que se depositan en las cámaras o en el patio, y a las que se añaden una salmuera con una concentración de sal en torno al 11%. Según los estudios realizados por [Arroyo López \(2007\)](#) al comienzo de la conservación no se aíslan enterobacterias ni BAL, pero sí levaduras y bacilos esporulados. A medida que pasa el tiempo van desapareciendo los bacilos esporulados (que dejan de detectarse hacia las 48 h), crecen las levaduras y comienza el desarrollo de BAL, que terminan alcanzando poblaciones de $\sim 6 \log_{10}$ ufc/mL. El comportamiento en este sentido es similar al que ya se ha descrito para las aceitunas en salmuera, cuando la variedad permite el crecimiento de las BAL. De hecho, el comportamiento es similar al descrito por [García García y col. \(1992\)](#) con aceituna

entera Aloreña conservada en grandes fermentadores, en los que se alcanzaba un máximo crecimiento de $6,5 \log_{10}$ ufc/mL para levaduras y BAL. Normalmente, el crecimiento de las BAL comienza una vez que ha descendido la concentración de NaCl y de polifenoles a causa del efecto del “requerido” con salmuera de las bombonas.

c) *Envasado*

El envasado se puede realizar con aceitunas frescas o conservadas en salmuera (patio o cámara y fermentadores). En síntesis, consiste en lavar los frutos, mezclarlos con la proporción adecuada de aliño (pimiento rojo, ajo e hierbas aromáticas) y añadirle la salmuera (conteniendo sorbato potásico, ácido cítrico, láctico, acético o una mezcla de ellos, y ácido ascórbico). Al comienzo del envasado de frutos frescos, la flora microbiana está compuesta, principalmente, por enterobacterias, *Bacillus*, levaduras y BAL. Tanto las enterobacterias como los *Bacillus* se inhiben rápidamente en un periodo de, aproximadamente, 48 h; sin embargo, puede existir un desarrollo limitado (con respecto, por ejemplo, a la preparación de aceitunas verdes) de la población de BAL ($\sim 5,5 \log_{10}$ ufc/mL). Este desarrollo poco regular de BAL se puede deber al efecto inhibitorio de algunos de los polifenoles de las aceitunas sobre estos microorganismos así como a la competencia de las levaduras, aparentemente mejor adaptadas al medio, por los sustratos disponibles. Por el contrario, el desarrollo de la población de levaduras, si no se añade conservante o este ha sido insuficiente, presenta durante el envasado la típica curva sigmoidea de crecimiento. Ello se debe a que con los aliños se agrega materia fermentable que facilita la multiplicación celular. Este comportamiento es, incluso, más intenso en estas circunstancias que cuando se trata de fruto fresco, que todavía conserva una cantidad importante de azúcares. En general, estas aceitunas presentan las mismas dificultades de conservación que ya se han mencionado al hablar de las aceitunas colocadas directamente en salmuera. Requieren el uso de conservantes o la pasteurización para su estabilización, aunque esta no es aplicable en el caso de frutos Verdes Frescos o Tradicionales, porque les comunica al producto unas características organolépticas desagradables.

2.6. CONTENIDO EN NUTRIENTES MINERALES DE LAS ACEITUNAS DE MESA

Se ha realizado un estudio completo de las concentraciones de minerales en la gran mayoría de las presentaciones de aceitunas de mesa (López y col., 2008). En este trabajo solo se va a considerar especialmente aquellos que están en mayor proporción y pueden ser objeto de cambios en sus contenidos durante la preparación de aceitunas verdes y en salmuera.

Los contenidos de algunos de ellos se modifican profundamente durante las diferentes etapas de la elaboración, como le ocurre al K o al magnesio (Mg) que se solubilizan en las diferentes soluciones en las que se introducen las aceitunas a lo largo de la elaboración. Sin embargo, el Na, se añade de manera abundante en todos los procesos en forma de sal (NaCl), por lo que su contenido aumenta en el producto final con respecto a la materia prima. Finalmente, el calcio (Ca) normalmente se encuentra fuertemente fijado en la pulpa y los tratamientos con lejía, salmuera o lavados no afecta de manera importante a su contenido. A continuación se va a comentar de manera breve los contenidos de estos minerales en las aceitunas de mesa elaboradas.

El K es el elemento en mayor abundancia en las aceitunas frescas, porque su presencia esta habitualmente muy extendida en todos los frutos. No obstante, al ser muy soluble y no ser retenido por la pulpa, se elimina de forma bastante intensa a lo largo de las diferentes etapas de la elaboración. Los contenidos medios y sus desviaciones, que incluye la variabilidad debida las diversas presentaciones de cada tipo, se dan en la Figura 2.5.

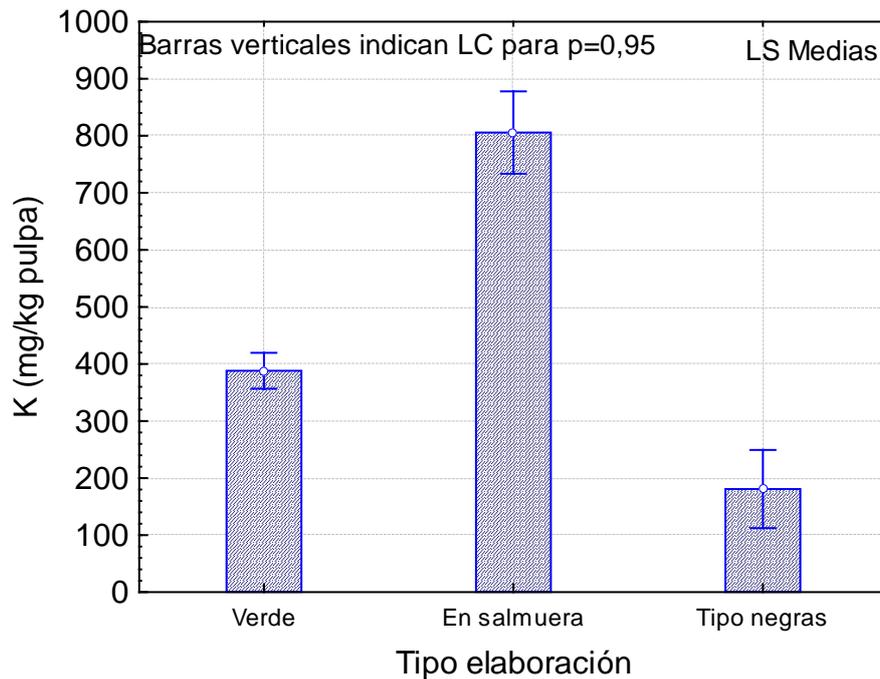


Figura 2.5. Contenido en K en los tres tipos de elaboraciones de aceitunas más importantes, incluyendo diversas formas de presentación con diferentes variedades.

Fuente: López y col. (2008).

En las verdes, los límites de confianza oscilan entre 361 mg/kg pulpa y 414 mg/kg pulpa, con un valor medio de 387 mg/kg pulpa (Figura 2.5). En aceitunas en salmuera su presencia es mayor debido a que las mismas se someten a menos diluciones que las tipo verdes. Los límites de confianza para ellas son 665 mg/kg pulpa y 946 mg/kg pulpa, con un valor medio de 805 mg/kg pulpa (Figura 2.5). Lógicamente, los valores más bajos de K se encuentran en las aceitunas tipo negras, puesto que son las que sufren más tratamientos en soluciones acuosas durante su elaboración. En ese caso, la media se sitúa en torno a 181 mg/kg pulpa, con unos límites de confianza de 153 mg/kg pulpa a 208 mg/kg pulpa (López y col., 2008).

El contenido en Ca de las aceitunas suele ser también elevado, ya que el mismo se encuentra en abundancia en la materia prima y es fuertemente retenido en la pulpa, que, en ocasiones, actúa como sumidero de dichos cationes (Garrido Fernández y col., 1997). Los contenidos de Ca en las aceitunas elaboradas se representan en la Figura 2.6.

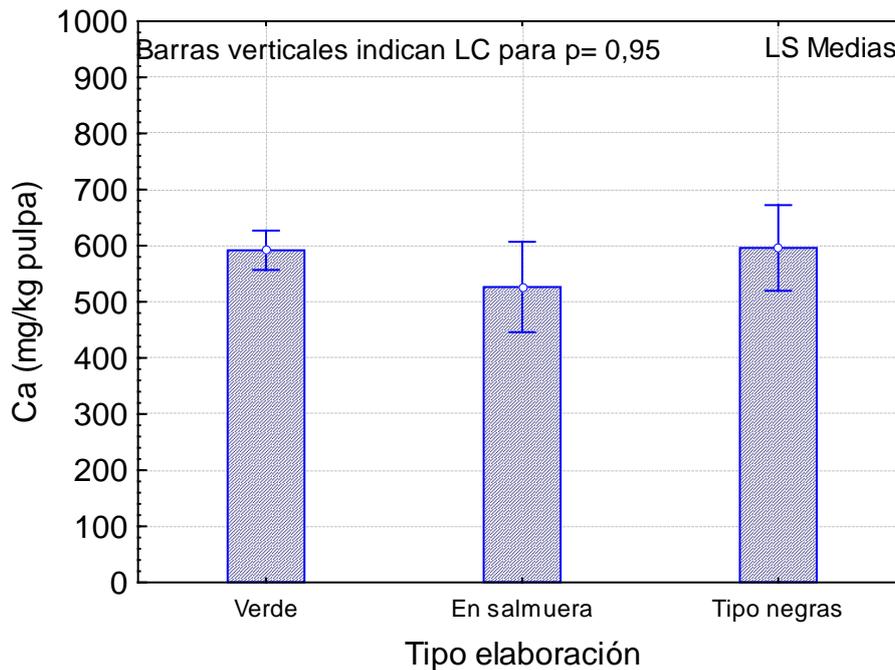


Figura 2.6. Contenido en Ca en los tres tipos de elaboraciones de aceitunas más importantes, incluyendo diversas formas de presentación con diferentes variedades.

Fuente: López y col. (2008).

En verdes (Figura 2.6), la media es de 592 mg/kg pulpa, oscilando entre 552 mg/kg pulpa (límite inferior de confianza) y 631 mg/kg pulpa (límite superior). En las aceitunas en salmuera (Figura 2.6) la media es de 526 mg/kg pulpa, mientras que los límites de confianza son 470 mg/kg pulpa y 582 mg/kg pulpa. Finalmente en el caso de las aceitunas tipo negras (Figura 2.6), la media es de 596 mg/kg pulpa y los límites de confianza inferior y superior son 545 mg/kg pulpa y de 647 mg/kg pulpa, respectivamente (López y col., 2008).

En cuanto al Mg, los contenidos medios y sus límites de confianza se han reflejado en la Figura 2.7.

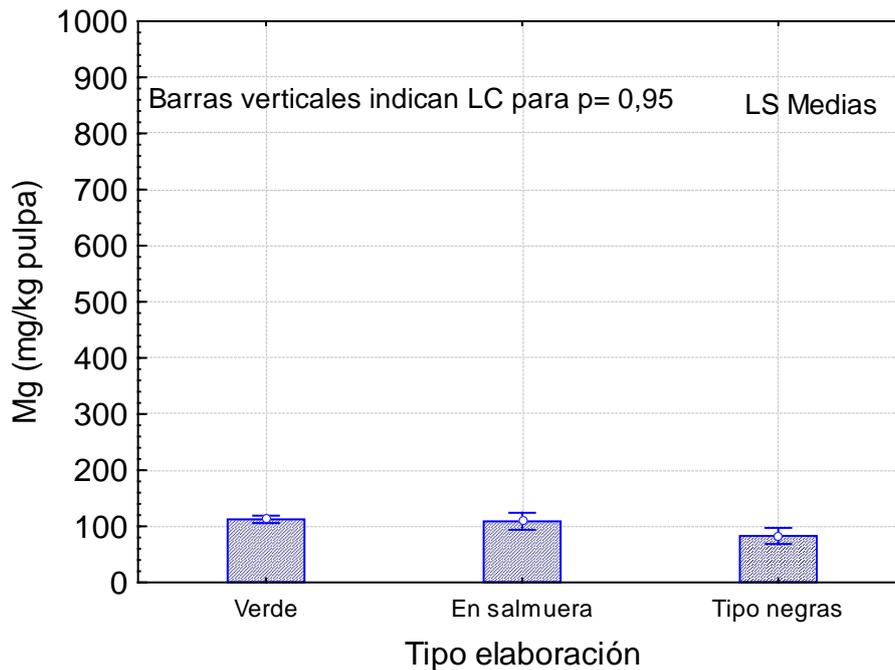


Figura 2.7. Contenido en Mg en los tres tipos de elaboraciones de aceitunas más importantes, incluyendo diversas formas de presentación y variedades de aceitunas.

Fuente: López y col. (2008).

Como puede observarse, las concentraciones de Mg en todos los tipos de aceitunas de mesa son inferiores que las encontradas para cualquiera de los dos minerales anteriores (K y Ca). En este caso, los contenidos disminuyen en el sentido verdes > en salmuera > tipo negras (Figura 2.7); los niveles parecen estar relacionados con la madurez de la aceituna y, en el caso del tipo negras, también con el número de lavados que se realizan durante su elaboración. El Mg forma parte, entre otros compuestos, de la clorofila, que es mucho más abundante en las verdes. Por eso, aunque a medida que disminuye el pH éstas se descomponen, son más elevadas en las verdes, puesto que en este estado de madurez dichos compuestos abundan. El contenido medio de las aceitunas tipo verdes es: 112 mg/kg pulpa, con unos límites de confianza de 105 mg/kg pulpa y 119 mg/kg pulpa, respectivamente. Como se ha comentado, disminuye ligeramente en las aceitunas en salmuera, que normalmente contienen menos clorofilas al estar algo más maduras (color cambiante y comenzar a virar el fruto a rosado o púrpura); la media es de 109 mg/kg pulpa y los límites de confianza 88 mg/kg y 128 mg/kg pulpa, respectivamente.

El contenido en Na, finalmente, es el más abundante, dado que la sal se emplea ampliamente en todos los procedimientos de elaboración con la doble finalidad de conservar el producto y enmascarar el saber amargo en el caso de las aceitunas directamente colocadas en salmuera, en las que suele quedar todavía una proporción importante de fenoles. El orden del contenido en Na decrece en el sentido tipo verdes > en salmuera > tipo negras. En verdes, la media es en torno a 15620 mg/kg de pulpa, con unos límites de confianza de 15030 mg/kg pulpa y 16220 mg/kg pulpa. En este caso, la ingesta de solo 100 g de pulpa podría cubrir alrededor del 60% de las necesidades diarias de este elemento. En las aceitunas en salmuera, en las que, al no haber sufrido tratamiento con NaOH, la estructura de la pulpa se mantiene bastante integra, la penetración de la sal es algo menos acusada, ofreciendo una media de 13700 mg/kg pulpa y 12540 mg/kg pulpa y 14870 mg/kg pulpa en los extremos de la distribución (López y col., 2008). En este caso, 100 g de pulpa pueden cubrir casi el 55% de los requerimientos. Por último, en las aceitunas tipo negras, los niveles de Na son del orden de la mitad de lo que se encuentra en las otras preparaciones, presentando una media cercana a los 7500 mg/kg de pulpa, con un límite inferior de 6941 mg/kg y superior de 7915 mg/kg pulpa.

2.7. RELACIÓN ENTRE LA INGESTA DE NUTRIENTES MINERALES Y SALUD

De acuerdo con el estudio epidemiológico INTERSALT, llevado a cabo a escala mundial con una muestra de más de 10.000 individuos de 32 países entre 20 y 59 años, el consumo de Na en cantidades superiores a 100 mmoles/día tiene un efecto significativo sobre la salud humana. El estudio concluyó afirmando que el consumo habitual de altas cantidades de sal era uno de los factores cuantitativos más importantes con efectos desfavorables sobre la tensión arterial, que es uno de los riesgos más frecuentes en caso de enfermedades cardiovasculares o de accidentes cerebrales. Además, en él se afirmaba que el problema no se limitaba a las personas mayores sino a toda la población en general (Stamler, 1997). A pesar de la controversia que tal estudio suscitó, es un hecho que el consumo de sal sigue relacionándose con la aparición de problemas cardiovasculares. Un estudio actual (Bibbins-Domingo y col., 2010) ha

estimado que una reducción de sal de 3 g por día (1,2 g de Na) podría disminuir el número anual de nuevas enfermedades cardiovasculares en EE.UU. entre 60.000 y 120.000 casos, el de infartos de miocardio entre 54.000 y 99.000 y evitar un número de muertes anuales por estas causas entre 44.000 y 92.000. Tal beneficio podría afectar a prácticamente toda la población. La disminución podría ser similar a la que se le asigna al consumo de tabaco, la obesidad o los niveles altos de colesterol. El ahorro de costes por atención médica podría ser de 24.000 millones de dólares. En el “Health Bulletin” de la ciudad de Nueva York (www.nyc.gov/health), se pide con gran alarde tipográfico, que se reduzca el consumo de sal con objeto de mejorar la hipertensión y reducir los ataques cardíacos. En este caso se hace hincapié en que no se trata solo de reducir la sal que uno voluntariamente añade a las comidas sino también, y fundamentalmente, de evitar los alimentos procesados que lo contengan en elevada proporción, aconsejando que se elijan aquellos que tienen menos de un 5% de la cantidad diaria recomendada (2.300 mg) por servicio. De acuerdo con el “Center for Sciences in the Public Interest”, en el periodo 2005-2008 no ha habido ningún cambio en el contenido de Na de los alimentos en EE.UU. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el exceso de sal en EE.UU. es responsable de la muerte de 150.000 personas cada año, dicha organización ha pedido al FDA que cambie la situación en que se encuentra la sal (Generally Recognized as Safe, GRAS) y limite su cantidad en una serie de alimentos. Hubo una petición para que se remitieran comentarios al respecto en 2007, pero hasta ahora no se ha tomado ninguna medida en este sentido (CSPI, 2008).

En otros países desarrollados, como por ejemplo Suiza, tampoco se ha observado una variación importante en los últimos 12 años, mostrando una media de la ingesta de sal de 10,6 g/día y 8,1 g/día para hombres y mujeres, respectivamente. En este país las fuentes más importantes de Na fueron el pan, el queso, la carne y los productos cárnicos, las sopas y los productos precocinados (Bear-Borst y col, 2009). Sin embargo, un estudio reciente en Finlandia ha demostrado que el consumo de sal ha ido disminuyendo progresivamente desde 1980, pero aun se encuentra por encima de las cantidades recomendadas por las OMS (Reinivuo y col., 2006).

En 2008, el Congreso de los EE.UU. pidió al Institute of Medicine (IOM, 2010) un informe sobre las posibilidades de reducir el consumo de Na en dicho país. Según el mismo, los americanos tienen una ingesta de Na por encima de 3.400 mg Na/día, un

50% por encima de los 2.300 mg/día recomendados. Por ello, aconseja que se aborden estrategias para reducir tal consumo de manera progresiva, para lo cual se debe ir incorporando paulatinamente menos Na a los alimentos. El impacto sobre las características organolépticas y de seguridad se podría evitar mediante la incorporación de sustancias que lo evitara.

Por todo ello, está claro que existe una creciente presión por parte de la sociedad y las administraciones para reducir la concentración de sal en los alimentos. Un revisión sobre los posibles efectos de tal actuación sobre la seguridad alimentaria, la calidad de los productos y la salud humana se ha publicado recientemente (Doyle y Glass, 2010). Uno de los interrogantes más importantes que tal actuación plantea es el relacionado con la seguridad, ya que, aparte de su contribución a las características organolépticas de los alimentos, la sal ha jugado desde hace mucho tiempo un papel esencial también en la estabilidad y seguridad microbiológica de un gran número de alimentos. Sleator y Hill (2007) advierten de la necesidad de no caer en la simple sustitución de unas sales por otras sin antes no haber realizado un completo estudio del efecto que tales cambios puedan tener en el desarrollo microbiano de los mismos y sus alteraciones. No obstante, a pesar de los obstáculos que todavía quedan por salvar, un reciente sondeo de mercado ha puesto de manifiesto las grandes oportunidades que existen en el mundo para el desarrollo de productos bajos en Na, ya que la sensibilidad hacia este elemento se ha situado al mismo nivel que la preocupación existente para la grasa, hidratos de carbono o azúcares (Package Facts, 2004).

Según un información difundida por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN, 2009) la media de consumo diario de sal en España es de 9,7 g, que es el doble de la cantidad recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), proviniendo la mayoría de la misma de los alimentos procesados. A la vista de estos datos, AESAN se ha propuesto reducir progresivamente esa ingesta hasta los 5 g/día recomendado por OMS. Con este consumo se podrían evitar al año 20.000 accidentes cerebro-vasculares y unos 30.000 eventos cardiacos. AESAN ha diseñado un plan para que en 2014 se haya llegado ya a un consumo de tan solo 8,5 g/día. Estudios llevados a cabo por AESAN, pusieron de manifiesto que el pan era una de las mayores fuentes de ingesta de Na en España. Por eso, dentro de la Estrategia para la Nutrición, la Actividad Física, y la prevención de la Obesidad (NAOS), se estableció un acuerdo con

las Confederación Española de Organizaciones de Panadería (CEOPAN), con el objetivo de pasar del 2,2% de sal al 1,8% en el periodo 2005-2008. Los resultados, según AESAN (2008) se han conseguido, puesto que la media al final de 2008 era incluso algo más baja (1,63%). A la vista del éxito, AESAN ha planteado la conveniencia de iniciar un nuevo plan para reducir la sal en los embutidos, los productos lácteos y la bollería, que ahora resultan los productos españoles que más Na aportan a la dieta (AESAN, 2009). El mismo está basado en una información exhaustiva reunida por la propia AESAN.

Al igual que ocurre en el resto del mundo, el 72% de la sal que ingieren los españoles proceden de alimentos procesados y de ahí el interés de AESAN en reducir su contenido en los mismos. De acuerdo con el estudio comparativo sobre el contenido en sal de alimentos españoles publicado por Consumer Eroski (2009), la concentración de sal en las aceitunas rellenas de anchoas osciló entre 0,77 y 1,41 g Na/100 g pulpa (1,96 y 3,59 g sal/100 g de NaCl en pulpa). Otro estudio de la OCU (2010) que formaba parte del anteriormente mencionado de la AESAN, mostraba que la media de las aceitunas analizadas era de 2,3 g/100g. Alimentos con cantidades superiores fueron los filetes de anchoas en aceite, embutidos, sopas, cremas, caldos y pescado ahumado. Por tanto, las aceitunas están en una posición comprometida, salvándolas hasta este momento el hecho de que su consumo se considere esporádico dentro de la dieta española.

Por otra parte, la ingesta recomendada de K en la UE es de 2000 mg/día y el de Ca de 800 mg/día (Commission of the European Communities, 2008). Es decir, se requiere ingerir importantes cantidades de estos elementos para una dieta normal. Además, los mismos tienen funciones vitales muy destacadas, como mantener el buen funcionamiento del sistema nervioso o el transporte celular. Una deficiencia en K puede dar lugar a debilidad, pérdida de apetito, náuseas, fatiga, hipertensión y arritmias cardíacas (Medicine On Line, 2010). Por ejemplo, una dieta baja en Na pero alta en K y Ca es recomendable para bajar la presión arterial (Leiba y col., 2005). Un estudio reciente (Cook y col., 2009) llevado a cabo con casi 3.000 personas ha indicado que más que la ingesta de Na o K por separado, era la relación Na:K la que estaba directamente relacionada con las enfermedades cardiovasculares. También se han descritos otros efectos tales como que una dieta rica en K puede prevenir o, al menos, retardar la progresión de enfermedades renales o reducir la excreción de Ca en la orina. El K

también juega un papel importante en la retención de Ca y en la formación de cálculos renales (He y Macgregor, 2008).

Asimismo, el Ca tiene un efecto protector frente a la osteoporosis, presión arterial alta y el cáncer de colon, siendo las ventas de suplementos conteniendo Ca muy importantes, principalmente en EE.UU. (Berner y col., 1990). Pero, a pesar de hacer más de 25 años de haberse demostrado la importancia del Ca para la salud, en EE.UU., y se supone que también en el resto del mundo, la ingesta del mismo continúa estando por debajo de los valores óptimos. Por ello, la fortificación de alimentos con este elemento puede ser la manera más eficaz de luchar contra la deficiencia de este mineral en la dieta, porque de esta manera se tiene la oportunidad de llegar a los segmentos de población más necesitados en lugar de confiar en la ingestión voluntaria del mismo (Raferty y col., 2007). Efectos nocivos por ingesta excesiva de Ca se han descrito solo cuando el mismo se ha suministrado en forma de carbonato cálcico y se ha debido más al efecto alcalinizante del carbonato que al catión en sí, aunque se recomienda un límite máximo de 3 g/día (FAO/WHO, 2002).

Por otra parte, existen 19 g de Mg en un individuo de unos 70 kg de peso, encontrándose el mismo formando parte de los huesos, los dientes, así como en la sangre y otros fluidos orgánicos. La ingesta recomendada por la UE es de 800 mg/día. Sin embargo, las necesidades parecen variar de acuerdo con los estilos de vida y el desarrollo de los pueblos, por lo que puede que no se puedan dar cifras con carácter completamente general (FAO/WHO, 2002). El Mg actúa como co-factor en numerosas enzimas implicadas en la obtención de energía, síntesis de proteínas, síntesis de DNA y RNA y en el mantenimiento del potencial eléctrico de los tejidos nerviosos y las membranas celulares. Particularmente importante es la función de este elemento en la regulación de los flujos de K y en el metabolismo del Ca (FAO/WHO, 2002). Deficiencias en este mineral pueden dar lugar a arritmias, taquicardias, síndrome premenstrual, convulsiones, etc. (Acu-cell Nutrition, 2010; PennState Hershey Children Hospital, 2010). Existe también una relación inversa entre consumo de Mg y depresión y ansiedad (Jacka y col., 2009) así como con la aparición de diabetes tipo 2 (Villegas y col., 2009). Sin embargo, el consumo de Mg en exceso procedente de la dieta es relativamente inocuo (FAO/WHO, 2002).

El contenido total de Zn en un cuerpo humano de 70 kg de peso se ha estimado en 2 g. El Zn es un elemento esencial para una gran cantidad de enzimas que participan en la síntesis y degradación de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, así como en el metabolismo de otros micronutrientes. Tiene también un papel esencial en el proceso de la expresión genética y en el sistema inmunológico. Deficiencias en Zn retardan el crecimiento, la madurez sexual y la formación de los huesos, causan lesiones en la piel, diarrea y caída del cabello. Se le ha relacionado igualmente con cambios en el comportamiento (FAO/WHO, 2002). Las cantidades diarias recomendadas están alrededor de 10 mg/día (Commission of the European Communities, 2008), aunque durante la gestación aumentan ligeramente los requerimientos hasta los 20 mg en la segunda mitad del embarazo y a 25 mg durante la lactancia. La biodisponibilidad del Zn depende mucho de la composición de la matriz (FAO/WHO, 2002). La toxicidad aparece solo cuando se ingiere a dosis elevadas (4-8 g/día) y consiste en náuseas, vómitos, diarrea, fiebre y aletargamiento. Una ingesta prolongada, mayor de 50 mg/día puede interferir con las acciones de otros microelementos, principalmente cobre. Por eso, el límite máximo de ingesta de Zn para una persona adulta se ha establecido en 45 mg/día (FAO/WHO, 2002). Es fácil satisfacer los requerimientos de Zn si se conocen los alimentos que más concentran este elemento mineral. Así, los de origen animal son una fuente dietética relevante y entre ellos destacan el hígado de ternera (7,8 mg/100 g), la carne roja (3-4 mg/100 g), los mariscos (2-3 mg/100 g), los moluscos que concentran de dos a tres veces más Zn que los pescados (las ostras contienen unos 52 mg/100 g), los huevos (2 mg/100 g) y, dentro de los lácteos, sobresalen los quesos curados (5 mg/100 g). Dentro de los vegetales, destaca el germen de trigo (8,40 mg/100 g), los frutos secos (3-5 mg/100 g; sobresaliendo entre ellos los piñones, las semillas de sésamo y las pipas de girasol), las semillas de calabaza y las legumbres (3-4 mg/100 g), que son los más interesantes, además de los cereales integrales. Una combinación variada de alimentos garantiza alcanzar normalmente los requerimientos diarios.

2.8. ESTUDIOS PARA LA REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE SAL EN VEGETALES FERMENTADOS

La sal se utiliza ampliamente en la preparación de alimentos, siendo, por tanto, imposible hacer siquiera una somera revisión exhaustiva de los esfuerzos realizados para reducir el contenido en todos y cada uno de ellos. Por tanto, en esta aproximación solo se mencionaran algunos de los trabajos relacionados con vegetales fermentados.

El estudio de sistemas modelos de salmueras conteniendo jugo de pepinillos, utilizando *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus pentosaceus*, y una mezcla de *Propionibacterium shermani* y *P. pentosaceus* en una concentración de sal baja (2,5% NaCl) mostró que cada fermentación difería cuantitativamente en la utilización de sustratos y producción de productos finales, indicando que, aunque daban productos diversos, todos podían emplearse para fermentar pepinillos en presencia de bajos niveles de Na (Chavasti y col., 1991). Sin embargo, la mayoría de los trabajos que han empleado bajas concentraciones de sal en pepinillos la han usado casi siempre en combinación con CaCl₂ para evitar el ablandamiento de dichos frutos. Guillou y Floros (1993) realizaron un estudio muy minucioso para encontrar la cantidad mínima de Na en la fermentación y almacenamiento de pepinillos, utilizando superficies de respuestas múltiples. Del mismo concluyeron que la utilización de salmueras con ~3,0% NaCl, 0,28% CaCl₂ y 0,3% sorbato potásico permitía una fermentación vigorosa, libre de levaduras y mohos, que mantenía una buena textura de los frutos después de 6 meses de conservación. Resultados similares se han obtenido también empleando concentraciones del 4,0% NaCl, 0,20-0,25% CaCl₂, ácido acético y metabisulfito sódico (Sahin y Akbas, 2001). Un estudio detallado realizado por McFeeters y Fleming (1989) sobre el mecanismo de actuación de los iones Ca²⁺ en los tejidos vegetales les llevó a la conclusión de que la teoría del “egg box type cross linking” que se había desarrollado para explicar la unión de los iones Ca²⁺ por las cadenas de poliuronatos no era aplicable a estos casos y que podían darse relaciones directas con las paredes celulares de las plantas. En la penetración del Ca parece que influye más la presión osmótica de la solución que la presencia de Na. Walter y col. (1996) demostraron que el Ca penetraba solo en las capas externas de los pepinillos cuando se utilizaban concentraciones de CaCl₂ con la misma

presión osmótica que tenían las células, pero que, cuando se conseguía un sobre presión osmótica añadiendo NaCl, entonces el Ca se distribuía de una manera más homogénea por todo el fruto y provocaba una pérdida de peso del mismo. Ello podría explicarse en el hecho de que la presencia de NaCl al cruzar la epidermis y penetrar en los tejidos, podría extraer agua de las células (debido a la diferencia en presión osmótica), rellenar los espacios intercelulares y saturar las paredes celulares, facilitando de esta manera el movimiento del Ca. Se ha estudiado el efecto de la presencia de Ca^{2+} en la concentración de otros cationes presentes de manera natural en los frutos tales como Mg^{2+} , K^+ y Na^+ . En general, la incorporación de Ca produce un desplazamiento de los otros cationes. De hecho, Na y Ca añadidos cooperan en el desplazamiento del Mg y K, mientras compiten entre ellos por los sitios a los que unirse (Buescher y Hudson, 1986). Recientemente, McFeeters y Pérez-Díaz (2010) han comprobado la posibilidad de realizar la fermentación de pepinillos en presencia exclusivamente de CaCl_2 , obteniendo una acidificación suficiente para bajar el pH por debajo de 3,5 unidades. El producto fue estable durante el almacenamiento y no detectaron producción de ácido propiónico o butírico, que pudieran indicar el crecimiento de bacterias productoras de alteraciones.

La utilización de cantidades reducidas de sal se ha aplicado también en otros vegetales fermentados. El empleo de un cultivo iniciador de *L. mesenteroides* utilizado en la fermentación de col en salmueras del 2,00-2,25% NaCl dio un producto con idéntica textura y sabor, mientras que permitió reducir la sal en un 50% (Johanningsmeier y col., 2007). La presencia de Ca se ha empleado igualmente en la fermentación de puré de pimiento, dando lugar a la liberación de más azúcares solubles, aumento de la producción de alcohol y disminución del pH así como en el control del crecimiento microbiológico (Flores y col., 2007).

Fermentaciones en gran escala usando concentraciones de sal bajas, en combinación con KCl, se han utilizado asimismo en la preparación de chucrut (coles fermentadas). En este caso, se obtuvieron concentraciones más bajas cuando se empleó el 50% de sal mineral conteniendo el 50% de KCl; dicho producto recibió también la puntuación organoléptica más alta (Viander y col., 2003). Pepinillos y rabanillos se han fermentado, igualmente, en mezclas de varias sales, resultando la combinación más adecuada 3% NaCl, 0,5% KCl y 0,5% CaCl_2 , sin que el empleo de cultivos iniciadores tuviera efecto sobre los resultados (Yamani y col., 1999). Un estudio llevado a cabo con

extractos de jugo de pepinillos mostró que las sales de Na y K dieron lugar a los ambientes más selectivos en los extractos crudos, mientras que las de K lo fueron en los jugos pasterizados y las sales de Ca fueron más selectivas que las de Mg en ambas (Naewbanij y col., 1986). Una investigación sobre la obtención de “kimchi”, un producto fermentado chino compuesto por col, cebollita, ajo y jengibre, mostró que todos los productos obtenidos a partir de salmueras conteniendo una mezcla de NaCl y KCl en diversas proporciones se consideraron aceptables por un panel de catadores (Choi y col., 1994).

En aceitunas de mesa, Tassou y col. (2002) estudiaron los cambios microbiológicos y físico-químicos en aceitunas negras naturales fermentadas en diferentes concentraciones de NaCl, encontrando que un nivel moderado del 6% resultaba el más adecuado. Al igual que en pepinillos, el empleo conjunto de NaCl y CaCl_2 , se ha investigado en repetidas ocasiones. El efecto del CaCl_2 en las propiedades mecánicas y en las características microbiológicas de las aceitunas negras de la variedad *Conservolea* fermentada a diferentes concentraciones de NaCl ha sido estudiado por Tassou y col. (2007). Los resultados indican que la pulpa se vuelve más dura y rígida cuando se añade 40 g/l CaCl_2 en la salmuera. Kanavouras y col. (2005) utilizando i) concentraciones elevadas de sal (16%), ii) solución tampón de CaCl_2 y acético a pH 4,3 y iii) 12,8% NaCl tamponada con CaCl_2 (0,025 M) y acético (0,05 M) a pH 4,3, encuentran que esta última combinación da un producto con menor sal, ausencia de microorganismos alterantes y una textura y color significativamente mejor.

Jiménez y col. (1997) han estudiado la absorción selectiva de Na y Ca por aceitunas verdes estilo español; la presencia de Ca produce un incremento logarítmico de la textura a pH 11 mientras que es solo lineal a pH 3; por otra parte, el Na lo produce lineal a pH 11 y no tiene efecto alguno a pH 3. A la vista de los resultados obtenidos, dichos autores concluyen que el Ca desplaza al Na de las estructuras de la pared celular pero no al contrario y que, por lo tanto, la estabilización de las paredes celulares se produce por dos efectos; uno debido a la formación de complejos de coordinación, solo por el Ca, y otro causado solo por uniones electrostáticas en la que intervienen tanto el Ca como el Na.

Tsapatsaris y Kotzekidou (2004) han aplicado un diseño central para estudiar mediante superficie de respuesta el efecto de la fermentación de jugos de aceitunas mediante *L. plantarum* y *D. hansenii*, utilizando NaCl, acetato cálcico, a fuerzas iónicas equivalente a 2-10% de sal, así como la sustitución del 50% de la sal por KCl. El crecimiento específico del co-cultivo en las mezclas NaCl/KCl fue bastante similar al encontrado en las condiciones óptimas (378 mM NaCl, 34 mM acetato cálcico y 40 mM lactato cálcico). Papoff y col. (1996) estudian el efecto de la combinación del 8,2% de NaCl o KCl con el uso de inóculos de *L. plantarum* solo o en co-cultivo con *Streptococcus faecium* y *S. cerevisiae* en la fermentación de aceitunas verdes estilo español, sin encontrar efecto del tipo de inóculo. La absorción de KCl es superior a la de la sal común; pero, el KCl comunica sabores anormales. En esta experiencia, se estudia en detalle la absorción de NaCl y KCl (Papoff y col., 1997), encontrándose que, hasta las 72 h, la absorción de NaCl es más lenta que la de KCl, pero a partir de este momento, y hasta 312 h, el efecto es precisamente el inverso, lo que indujo a dichos autores a recomendar el uso de concentraciones más elevadas de KCl que de NaCl. Estudios realizados por Marsilio y col. (2002), utilizando concentraciones de 6% NaCl, 6% KCl y una mezcla 3% NaCl + 3% KCl, muestran, tras un análisis organoléptico, que las aceitunas que provienen de la mezcla de sales tienen un ligero sabor amargo y son aceptables para el consumo mientras que las que se han fermentado solo en KCl muestran un sabor demasiado amargo. Parece, pues, que la sustitución completa de NaCl por KCl no es recomendable. Mulè y col. (2000) utilizaron salmueras del 8% compuestas de solo NaCl, mezclas al 50% de este y CaCl₂ y mezclas al 33,3% de NaCl + KCl + CaCl₂ en la elaboración de aceitunas negras al natural. No hubo diferencias significativas en cuanto al proceso fermentativo y, en cuanto a los ensayos organolépticos, las puntuaciones, usando solo NaCl, son prácticamente las mismas que con la mezcla de las tres sales; no obstante, el uso de NaCl y CaCl₂ da una puntuación ligeramente más elevada. Por supuesto, las aceitunas elaboradas con NaCl tienen un contenido en Na superior al de las otras, el contenido en K es superior en el segundo de los casos y el de Ca aumenta del primer supuesto al tercero, debido al incremento de la proporción de Ca en la salmuera también en este sentido. Conviene mencionar en este punto, asimismo, que diversas sales de Ca, Mg y K gozan de status GRAS (US Food and Drug Administration, 2011).

Finalmente, no se ha encontrado ningún estudio referente al uso de Zn en la fortificación de alimentos vegetales fermentados ni se ha empleado tampoco hasta la fecha en el control de la flora microbiana de los mismos. La deficiencia nutricional en ciertos minerales como Zn afecta a la población a escala mundial, con graves efectos sobre la salud, dependiendo fundamentalmente del grado de incidencia y de su magnitud. Recientemente se ha empleado Zn como agente conservante de la tonalidad verde en peras, pero el proceso requiere la aplicación de calor para estabilizar el color del producto final (Ngo y Zhao, 2007). La FDA (Food and Drug Administration) reconoce el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) como GRAS, lo cual permite su utilización en la fortificación de alimentos (Office of Dietary Supplements, 2011). Las diferentes sales de Zn (cloruro, gluconato y sulfato, entre otras) así como el óxido de Zn, también gozan del estatus GRAS de acuerdo con la US Food and Drug Administration (2010) y están permitidos en la Unión Europea para la fortificación de alimentos (Directive 2002/46/CE).

3. OBJETIVOS

De todo lo anteriormente reseñado se deduce que existe una creciente preocupación de las autoridades por el consumo excesivo de sal debido a su relación con la aparición de accidentes vasculares cerebrales y problemas cardiacos isquémicos. Ello implica costes de atención sanitaria y un número elevado de muertes en España y en todo el mundo. En consecuencia, los países más desarrollados han puesto en marcha planes para reducir el contenido de Na en alimentos y, por tanto, su ingesta.

Dado que, en general, las aceitunas de mesa hacen un uso amplio de la sal como compuesto esencial durante la fermentación, conservación y envasado, este trabajo, siguiendo las pautas marcadas por la OMS, Comisión Europea y AESAN, acomete estudios dirigidos a investigar las posibilidades de sustituir el cloruro sódico actualmente utilizado en estos productos por otras sales de elementos minerales nutrientes tales como cloruro potásico, cloruro cálcico y cloruro magnésico. También se aborda el uso de sales de zinc no solo con la finalidad de mejorar su contenido en los frutos sino también por su efecto antifúngico sobre determinados microorganismos potencialmente alterantes que pueden desarrollarse en las salmueras.

Para afrontar estos retos en las diversas fases de elaboración de las aceitunas de mesa se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudio del comportamiento individual de las especies de microorganismos más representativos (bacterias ácido lácticas y levaduras) en presencia de las diferentes sales minerales.
- 2) Investigación pormenorizada del efecto del cloruro de zinc frente a las levaduras, con la finalidad de evaluar la actividad inhibidora que ejerce este compuesto sobre dichos microorganismos.
- 3) Realización de fermentaciones de aceitunas verdes estilo español o sevillano y de aceitunas colocadas directamente en salmuera, con objeto de investigar los efectos de las diversas mezclas de sales sobre las características físico-químicas y microbiológicas de los correspondientes procesos así como sobre el contenido en minerales nutrientes y en los perfiles sensoriales de los productos obtenidos.

- 4) Comparación de los perfiles físico-químicos y microbiológicos de los nuevos procesos con los habituales tanto de aceitunas verdes estilo español o sevillano como de aceitunas colocadas directamente en salmuera.
- 5) Aislamiento de la flora más característica (bacterias ácido lácticas y levaduras) de dichas fermentaciones e identificación de la misma mediante métodos moleculares.
- 6) Efecto de las diversas mezclas de sales sobre los productos finales envasados de aceitunas verdes estilo español o sevillano y de aceitunas colocadas directamente en salmuera.

En todo momento, el plan de trabajo realizado ha tenido la finalidad de cumplir con los objetivos propuestos, procurándose siempre, además, la obtención de resultados prácticos que faciliten la comercialización del producto por parte de la industria y favorezcan la revalorización del sector.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DE EXPERIENCIAS

Las experiencias realizadas en esta tesis doctoral se engloban dentro de dos grandes apartados que se complementan entre sí:

- 4.1.1. Estudio del efecto de diferentes sales minerales (NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2 y ZnCl_2) y sus mezclas (excepto en el último de los compuestos) sobre el crecimiento de microorganismos habitualmente presentes en las fermentaciones y envasados de aceitunas de mesa.
- 4.1.2. Investigación de la influencia que la sustitución de la sal común (NaCl) por otras sales minerales (KCl , CaCl_2 o MgCl_2) tiene sobre los procesos de fermentación de aceitunas tipo verdes (Gordal, Manzanilla) y colocadas directamente en salmuera (Aloreña de Málaga) o en sus envasados, incluyendo la adición de ZnCl_2 a estos.

Se detalla a continuación la metodología utilizada para conseguir los objetivos planteados en cada uno de estos aspectos.

4.1.1. Efecto de las sales minerales sobre el crecimiento de los microorganismos en medios de laboratorio

4.1.1.1. Efecto del NaCl , KCl , CaCl_2 y MgCl_2 sobre *L. pentosus* y *S. cerevisiae*

Existe una gran diversidad de microorganismos en los diferentes procesos de fermentación y/o almacenamiento de aceitunas de mesa. En este estudio se han seleccionados dos cepas de las especies más representativas: *L. pentosus* TOMC LAB1 y *S. cerevisiae* TOMC Y4, pertenecientes a la colección (TOMC) del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla).

4.1.1.1.1. Efecto individual de las sales

Los dos microorganismos se han mantenido a -80°C en 20% de glicerol hasta el momento de su utilización. Colonias aisladas procedentes de cultivos puros de cada especie se introducen separadamente en 5 mL de MRS líquido (en el caso de *L. pentosus*) o YM líquido (para *S. cerevisiae*) y se incuban a 30°C durante 48 h (ver

descripción de los medios más adelante). Después de este periodo, los tubos se centrifugan a 9.000g durante 15 min, para eliminar el exceso de medio de cultivo, y el pellet se re-suspende en 5 mL de agua de peptona estéril (0,01%) para conseguir de este modo las diferentes soluciones madre de los inóculos.

El medio basal de crecimiento seleccionado para todas las experiencias ha sido YM líquido (para *S. cerevisiae*) o MRS líquido (para *L. pentosus*), modificado individualmente con las diferentes concentraciones de las sales en un rango comprendido entre 0 y 44%. Se preparan un total de 65 medios diferentes (14 + 14 + 19 + 18 niveles de NaCl, CaCl₂, KCl y MgCl₂, respectivamente) para *S. cerevisiae*, mientras que para *L. pentosus* son 53 (13 + 11 + 15 + 14, para el NaCl, CaCl₂, KCl y MgCl₂, respectivamente). Después de la adición de la sal, los medios se reparten en tubos de 10 mL y se esterilizan a 121°C durante 15 min.

El crecimiento microbiano a lo largo del tiempo se ha seguido con un espectrofotómetro automatizado modelo Bioscreen C (Labsystem, Helsinki, Finlandia). Todas las experiencias se han llevado a cabo a 30° C y se controlan durante al menos 7 d tomando mediciones de la DO cada 2 h. Los pocillos del Bioscreen C se llenan con 0,05 mL de inóculo y 0,35 mL de medio de cultivo MRS o YM líquido en función del microorganismo estudiado, obteniéndose un tamaño de inóculo inicial de $\sim 1,5 \times 10^6$ ufc/mL para *L. pentosus* y $\sim 2,5 \times 10^5$ ufc/mL para *S. cerevisiae*. Todas las experiencias se realizan, al menos, por duplicado, incluyendo también un pocillo control sin inocular.

La metodología para estimar la susceptibilidad y resistencia de los microorganismos frente a las sales se basa en la comparación de las áreas obtenidas bajo la curva DO/tiempo de los diferentes ensayos (en los cuales se añaden sucesivas concentraciones de las respectivas sales) con respecto al área de un control positivo (en el cual no se añade ningún tipo de sal). El área bajo la curva DO/tiempo ha demostrado ser un buen indicador del crecimiento global de los microorganismos al estar relacionada directamente con los parámetros de crecimiento μ_{\max} , N_{\max} y λ (Arroyo López y col., 2009a). En general, a medida que se incrementa la concentración del compuesto también aumenta el efecto inhibitorio sobre el microorganismo, lo que da lugar a una reducción en el área bajo la curva DO/tiempo respecto al control positivo que no lleva la sal. En el presente trabajo las áreas bajo la curva DO/tiempo se han calculado mediante integración, utilizando el programa informático OriginPro 7.5 (ver

programas informáticos más adelante). De esta manera, la cantidad relativa de crecimiento, denominada área fraccional (af), se puede calcular como el cociente entre el área de la experiencia que se estudia ($area_{test}$) respecto a la experiencia control ($area_{cont}$), según la fórmula:

$$af = (area_{test} - area_{uni}) / (area_{cont} - area_{uni}) \quad (4.1)$$

Donde $area_{uni}$ se corresponde con el área bajo la curva DO/tiempo de un pocillo control no inoculado que sirve para restar la señal correspondiente al ruido de fondo de las áreas anteriormente mencionadas. La representación de las af obtenidas para las diferentes concentraciones de las sales (expresadas estas últimas como \log_{10}) genera una curva sigmoidea que puede ajustarse correctamente con la función de Gompertz modificada por Lambert y Pearson (2000) para inhibición, cuya expresión matemática es la siguiente:

$$af = A + C * \exp[-\exp(B(x - M))] \quad (4.2)$$

Donde A es la asíntota inferior para af (aproximadamente 0), B es un parámetro relacionado con la pendiente de la curva, C es la distancia entre la asíntota superior e inferior (aproximadamente 1), M es el \log_{10} de la concentración de la sal a la que se obtiene el punto de inflexión de la curva, y x es la concentración de sal (\log_{10}). El ajuste de estos parámetros se ha realizado mediante un análisis de regresión no lineal con el programa informático Statistica 7.0. Posteriormente, los valores de NIC (susceptibilidad) y MIC (resistencia) (Figura 4.1) se han estimado mediante las siguientes expresiones:

$$NIC = 10^{M - (\frac{e}{B})} \quad (4.3)$$

$$MIC = 10^{M - (\frac{1}{B})} \quad (4.4)$$

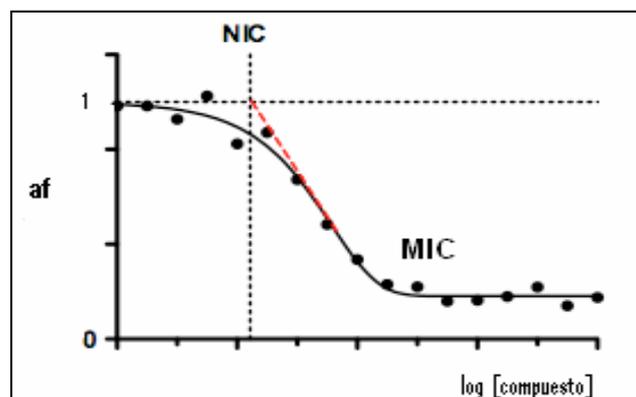


Figura 4.1. Esquema donde se representan los valores NIC y MIC.

4.1.1.1.2. Efecto combinado de las sales

Para estimar el efecto de las diferentes combinaciones de sales sobre los parámetros de crecimiento de *L. pentosus* y *S. cerevisiae* se utiliza un diseño de mezclas D-óptimo con restricciones ($\text{NaCl} + \text{KCl} + \text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2 \leq 9,0\%$), generado con el programa informático Design-Expert v.6. El diseño consiste en 20 niveles o combinaciones de las variables ambientales (tipo de sal) más seis replicados, elegidos por el programa informático para la estimación del puro error (Tabla 4.1). Todos los experimentos se realizan a 30° C, por duplicado, y su evolución se sigue durante, al menos, 10 d por recuento en placa.

Tabla 4.1. Diseño de mezclas D-óptimo con restricciones ($\text{NaCl} + \text{KCl} + \text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2 \leq 9,0\%$) utilizado para estudiar los efectos de diferentes combinaciones de sales sobre los parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* y *L. pentosus*.

Tratamiento	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)	MgCl ₂ (%)
1	3	3	0	3
2*	0	4,5	0	0
3	9	0	0	0
4	2,25	2,25	2,25	2,25
5*	4,5	0	0	0
6	3	0	3	3
7	0	0	4,5	4,5
8	0	9	0	0
9*	0	0	4,5	0
10*	0	4,5	0	0
11	0	3	3	3
12	0	0	9	0
13	4,5	0	0	4,5
14*	0	0	4,5	0
15	0	0	0	9
16*	0	0	0	4,5
17	4,5	4,5	0	0
18	0	4,5	4,5	0
19	4,5	0	4,5	0
20*	0	0	0	0
21*	0	0	0	0
22*	4,5	0	0	0
23	0	4,5	0	4,5
24*	0	0	0	4,5
25	3	3	3	0
26*	0	0	0	0

*experiencias duplicadas. Nota: el diseño se realiza independientemente para cada uno de los microorganismos.

El medio basal de crecimiento seleccionado para todas las experiencias es de nuevo YM líquido para *S. cerevisiae* y MRS líquido para *L. pentosus*, modificado con las diferentes proporciones de las sales según se indica en la Tabla 4.1. Después de la adición de sal, se dispensan 100 mL de medio en frascos ISO de 250 mL que se esterilizan a 121°C durante 15 min. El valor de pH después de la esterilización es aproximadamente de 5,5 unidades. Una vez atemperados, los medios se inoculan independientemente con *S. cerevisiae* y *L. pentosus*, alcanzando un tamaño poblacional de $\sim 3,6 \log_{10}$ ufc/mL y $\sim 4,3 \log_{10}$ ufc/mL, respectivamente. A partir de este momento, se toman un total de 8-15 muestras de los frascos de experimentación. La toma de muestra se distribuye entre las diferentes fases de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria) y las muestras se siembran sobre YM agar o MRS agar, según el tipo de microorganismo. Tras 48 h de incubación a 30°C, los recuentos se expresan como \log_{10} ufc/mL. Como se detallará más adelante, estos datos se utilizarán para obtener los parámetros de crecimiento de los microorganismos para cada uno de los tratamientos.

4.1.1.2. Efecto de $ZnCl_2$ sobre el crecimiento de levaduras

Se utilizan un total de 22 cepas de levaduras, aisladas previamente de diferentes fermentaciones de aceitunas de mesa, y pertenecientes a la colección (TOMC) del departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla). Todas las cepas se identifican previamente mediante métodos moleculares. En la Tabla 4.2 se muestran las referencias y el origen de cada una de ellas.

Colonias aisladas procedentes de cultivos puros de cada cepa se introducen separadamente en 5 mL de YM líquido. Después de 48 h de incubación a 30°C, se centrifuga 1 mL de cada tubo a 9.000g durante 10 min. Los pellets se lavan con una solución salina estéril (9 g/L), se centrifugan y se re-suspenden en 0,5 mL de solución salina estéril para obtener una concentración cercana a $7 \log_{10}$ ufc/mL, confirmada mediante siembra en placas de YM agar.

Tabla 4.2. Referencia y origen de las 22 cepas de levadura utilizadas para los ensayos con ZnCl₂.

Referencia	Referencia abreviada	Proceso de elaboración
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> TOMC Y10	Y10	Aceituna en salmuera
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> TOMC Y2	Y2	Fermentación estilo sevillano
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> TOMC Y11	Y11	Aceituna en salmuera
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> TOMC Y12	Y12	Fermentación estilo sevillano
<i>Debaryomyces etchellsii</i> TOMC Y24	Y24	Fermentación estilo sevillano
<i>Debaryomyces hansenii</i> TOMC Y25	Y25	Aceituna en salmuera
<i>Issatchenkia occidentalis</i> TOMC Y3	Y3	Envasado aceitunas en salmuera
<i>Issatchenkia orientalis</i> TOMC Y6	Y6	Fermentación estilo sevillano
<i>Candida diddensiae</i> TOMC Y26	Y26	Aceituna en salmuera
<i>Candida diddensiae</i> TOMC Y1	Y1	Envasado aceitunas en salmuera
<i>Pichia galeiformis</i> TOMC Y15	Y15	Aceitunas en salmuera
<i>Pichia galeiformis</i> TOMC Y27	Y27	Aceituna en salmuera
<i>Pichia galeiformis</i> TOMC Y28	Y28	Fermentación estilo sevillano
<i>Pichia membranifaciens</i> TOMC Y31	Y31	Aceituna en salmuera
<i>Candida tropicalis</i> TOMC Y29	Y29	Aceituna en salmuera
<i>Candida sorbosivorans</i> TOMC Y17	Y17	Fermentación estilo sevillano
<i>Candida boidinii</i> TOMC Y13	Y13	Aceituna en salmuera
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TOMC Y4	Y4	Envasado aceitunas en salmuera
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TOMC Y18	Y18	Aceituna en salmuera
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TOMC Y30	Y30	Aceituna en salmuera
<i>Kluyveromyces lactis</i> TOMC Y32	Y32	Fermentación estilo sevillano
<i>Torulasporea delbrueckii</i> TOMC Y36	Y36	Fermentación estilo sevillano

Como medio de cultivo se emplea YM líquido, suplementado con una solución estéril de ZnCl_2 (10 g/L), para obtener las siguientes concentraciones finales de ZnCl_2 en el medio: 0, 20, 30, 50, 70, 80, 100, 120, 140, 150, 170, 180, 200, 220 y 250 mg/L.

El crecimiento microbiano a lo largo del tiempo se sigue mediante un espectrofotómetro automatizado modelo Bioscreen C. Todas las experiencias se llevan a cabo a 30° C y se controlan durante 100 h, tomando mediciones de la DO cada 2 h. Los pocillos del Bioscreen C se llenan con 0,01 mL de inóculo y 0,34 mL de YM líquido (modificado con ZnCl_2). La DO inicial siempre está por encima de 0,2 (inóculo inicial de $\sim 6,0 \log_{10}$ ufc/mL). Además, se incluyen pocillos sin inocular (control negativo) para cada una de las experiencias. Todos los tratamientos se realizan por triplicado, obteniéndose un total de 990 curvas de crecimiento (15 niveles de ZnCl_2 * 22 cepas * 3 replicados). Para determinar la concentración no-inhibidora (NIC) y la concentración mínima inhibidora (MIC) para cada una de las cepas se emplea la misma metodología de *af* (Lambert y Pearson, 2000) explicada en el apartado anterior.

A continuación, para determinar si este elemento es fungiestático o por el contrario fungicida, se ensayan la supervivencia de la levadura a 3 concentraciones (250, 500 y 1000 mg/L) por encima del máximo valor de MIC obtenido. En este caso, la evolución de la población inicial ($\sim 10^6$ células/mL) se sigue mediante siembra de 100 μL (o su apropiada dilución) en placas de YM agar. Para ajustar la reducción de la población de levaduras a lo largo del tiempo, se usa el modelo de Weibull (Van Boekel, 2002), con la siguiente expresión:

$$\text{Log}_{10} N_t/N_0 = -(t/D_\beta)^\beta \quad (4.5)$$

en el que N_t es el número de células en un tiempo determinado (t), N_0 es el nivel de inóculo inicial, D_β es el tiempo (h) para la primera reducción decimal y β está relacionado con la forma de la curva de inhibición. $\beta=1$ indica una cinética de inactivación de primer orden (valor D), $\beta<1$ indica una curva de supervivencia cóncava (presencia de cola), y $\beta>1$ una curva convexa (con hombro). Cuando $\beta \neq 1$, son necesarios los parámetros D_β y β para predecir el nivel de reducción de la población microbiana (Van Boekel, 2002). Ambos parámetros se obtienen mediante un ajuste de regresión no-lineal con el programa informático Statistica 7.0. La idoneidad del ajuste

se comprueba mediante la proporción de la varianza explicada por el modelo (R^2) con respecto a los datos experimentales.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los parámetros de inhibición (NIC, MIC y D_{β}) para las diversas levaduras, se realiza el correspondiente análisis de la varianza, aplicando el módulo ANOVA del programa informático Statistica 7.0. Una vez comprobada la existencia de tales diferencias, para identificar las mismas, se aplica una comparación post-hoc múltiple mediante la prueba de Scheffé, que está considerada como una de las más conservadoras (Winer, 1962).

4.1.2. Estudio del efecto de la sustitución de NaCl por otras sales minerales en fermentaciones de aceitunas

4.1.2.1 Aceitunas y preparación de salmueras

La materia prima utilizada en este trabajo ha sido frutos frescos (recogidos en campaña) o conservados (almacenados en una salmuera del 11% de NaCl) de aceitunas de mesa de las variedades Aloreña de Málaga, Manzanilla y Gordal. Las muestras han sido proporcionadas por dos empresas elaboradoras: Aceitunas Bravo S.A. (Alhaurín el Grande, Málaga) y JOLCA S.A. (Huévar del Aljarafe, Sevilla) durante las campañas de recogida de aceituna de los años 2007, 2008, 2009 y 2010. Para el estudio del efecto de un determinado tratamiento sobre las etapas de conservación o envasado, las salmueras se preparan en el laboratorio y se transportan hasta la fábrica donde se procede al llenado de los fermentadores o envases. A lo largo de este trabajo, las concentraciones de las salmueras se expresan en porcentajes (%), equivalente a g/100 mL) dado que esta es la forma habitual que utiliza el sector de la aceituna para expresar las mismas (Garrido Fernández y col., 1997).

4.1.2.2. Fermentación de aceituna Gordal al estilo sevillano

Los frutos frescos de la variedad Gordal se obtienen directamente de JOLCA S.A. Las aceitunas se procesan al estilo Sevillano, tratándose con una solución de NaOH al 2% hasta llegar a las 2/3 partes de la pulpa y aplicándoles un solo lavado de 18

h de duración. Posteriormente, se añaden las diferentes salmueras, preparadas a las concentraciones seleccionadas de NaCl, KCl y CaCl₂ según contempla el diseño experimental (Tabla 4.3). Después de 20 h, se burbujea CO₂ hasta saturación para hacer descender el pH inicial hasta ~6.5 unidades. Los fermentadores (~2,90 kg aceitunas + 2,35 L salmuera) (Figura 4.2) se dejan equilibrar durante otras 20 h y, entonces, se inoculan con la cepa de *L. pentosus* TOMC LAB1 hasta alcanzar una población inicial de ~6 log₁₀ ufc/mL, con el objetivo de inducir una fermentación ácido láctica en todos los tratamientos. El resto del crecimiento de la microbiota (enterobacterias y levaduras) es espontáneo.

El diseño experimental consiste en un total de 15 tratamientos compuestos de 10 mezclas independientes más 5 duplicados (Tabla 4.3) y se genera con el programa informático Design Expert 6.06. En esta ocasión, el contenido total de las concentraciones iniciales de las diferentes sales, expresadas en porcentajes (%), equivalente a g/100 mL), se restringe a NaCl + KCl + CaCl₂ = 10% (similar al empleado en la industria), con los niveles de NaCl entre 4 y 10%, KCl entre 0 y 4% y CaCl₂ entre 0 y 6%. Los rangos de concentraciones de estas experiencias se eligen en base a resultados previos, que no son favorables a la sustitución completa del NaCl sino que más bien sugieren la conveniente hacerlo de manera parcial.



Figura 4.2. Recipientes utilizados para estudiar la fermentación de aceitunas Gordal y Manzanilla con diferentes mezclas de sales minerales.

Tabla 4.3. Diseño de mezclas “simplex centroide”, utilizado para estudiar los efectos de NaCl, KCl y CaCl₂ en la fermentación de aceitunas de la variedad Gordal.

Tratamientos	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1*	10	0	0
2	5	1	4
3*	4	3	3
4	7	3	0
5	8	1	1
6*	6	2	2
7	5	4	1
8*	4	6	0
9*	10	0	0
10*	4	0	6
11*	4	3	3
12*	4	0	6
13	7	0	3
14*	4	6	0
15*	6	2	2

* Experiencias duplicadas.

En esta experiencia se determinan diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, acidez libre, azúcares, ácidos, y contenido de minerales en pulpa), perfil sensorial de las aceitunas y evolución e identificación de la microbiota presente en cada uno de los fermentadores. Al final de esta sección se explica la metodología utilizada para cada uno de estos análisis.

4.1.2.3. Fermentación de aceituna Manzanilla al estilo sevillano

Las aceitunas frescas de la variedad Manzanilla se obtienen de JOLCA S.A. Tras su recogida, se procesan según el estilo sevillano, siguiéndose un procedimiento similar al ya descrito para la variedad Gordal, con la sola excepción de utilizar una solución alcalina ligeramente más elevada (2,1%). Se emplean también el mismo tipo de fermentadores. El diseño experimental (“simplex-centroide”) consiste en 15

tratamientos compuestos de 10 mezclas independientes más 5 duplicados como se muestra en la (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Diseño “simplex-centroide”, utilizado para estudiar los efectos de NaCl, KCl y CaCl₂ en fermentaciones de aceitunas de la variedad Manzanilla.

Tratamientos	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1*	10	0	0
2	5	1	4
3*	4	3	3
4	7	3	0
5	8	1	1
6*	6	2	2
7	5	4	1
8*	4	6	0
9*	10	0	0
10*	4	0	6
11*	4	3	3
12*	4	0	6
13	7	0	3
14*	4	6	0
15*	6	2	2

*Tratamientos duplicados.

El diseño se obtiene nuevamente con el programa informático Design Expert 6.06. El contenido total de las concentraciones iniciales de las diferentes sales, expresadas en porcentajes (%), se restringe a $\text{NaCl} + \text{KCl} + \text{CaCl}_2 = 10\%$, con NaCl entre 4 y 10%, KCl entre 0 y 6% y CaCl₂ entre 0 y 6%. Como en el caso anterior, la fermentación ácido láctica se induce mediante la inoculación de todos los tratamientos con *L. pentosus* TOMC LAB1, hasta alcanzar una población inicial de $\sim 6 \log_{10}$ ufc/mL. El resto del crecimiento de la microbiota (enterobacterias y levaduras) se deja evolucionar de manera espontánea.

En esta experiencia se controlan diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, acidez libre, acidez combinada, color final, textura final y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas, y evolución e identificación de la microbiota presente en cada uno de los tratamientos.

4.1.2.4. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga colocada directamente en salmuera

Las aceitunas se toman directamente de la industria (Aceitunas Bravo, Málaga) ya partidas, se lavan y se colocan en recipientes anaeróbicos de plástico con una capacidad de 5,0 kg de fruto y 4,2 L de salmuera (Figura 4.3).



Figura 4.3. Contenedores utilizados para estudiar la fermentación de aceitunas Aloreña de Málaga con diferentes mezclas de sales minerales.

El diseño experimental, como en los casos anteriores, se genera con el programa informático Design Expert v. 6.06, eligiéndose un diseño “simplex-centroide” de mezclas con 13 tratamientos independientes y 4 duplicados (Tabla 4.5). La concentración inicial total de las diversas sales se restringe a $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2 + \text{KCl} = 11\%$, oscilando el nivel de cada sal dentro del rango 0-11%. Dicha concentración se elige para alcanzar una proporción en el equilibrio próxima al 5,5%. Las fermentaciones se dejan evolucionar de manera espontánea, para reproducir lo más fielmente posible el proceso industrial.

En esta experiencia se controlan diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, acidez libre, acidez combinada, color, textura final y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas, y evolución de la microbiota presente en cada uno de los tratamientos.

Tabla 4.5. Diseño “simplex-centroide”, utilizado para estudiar los efectos de NaCl, CaCl₂ y KCl en la fermentación de aceitunas de mesa Aloreña de Málaga.

Tratamientos	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1	11,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	11,000
3	0,000	11,000	0,000
4	3,667	0,000	7,333
5	3,667	7,333	0,000
6	0,000	7,333	3,667
7	7,333	0,000	3,667
8	7,333	3,667	0,000
9	0,000	3,667	7,333
10*	3,667	3,667	3,667
11*	7,333	1,833	1,833
12*	1,833	1,833	7,333
13*	1,833	7,333	1,833
14*	3,667	3,667	3,667
15*	7,333	1,833	1,833
16*	1,833	1,833	7,333
17*	1,833	7,333	1,833

* Tratamientos duplicados.

4.1.3. Estudio del efecto de la sustitución de NaCl por otras sales minerales en los envasados

4.1.3.1. Envasado de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano

Los frutos de la variedad Manzanilla, fermentados de la manera habitual, se obtienen de JOLCA S.A. Tras su recogida, se elimina la salmuera de conservación y se colocan en agua para reducir el exceso de NaCl. Durante 5 d se controla la evolución de la concentración de NaCl, pH, acidez libre y acidez combinada, hasta observar que se alcanza el equilibrio. En este momento, las aceitunas muestran las siguientes características: NaCl (obtenida a partir de la determinación de cloruros), 3,85%; pH, 3,35; acidez libre, 0,48%; y acidez combinada 0,019 Eq/L.

Una vez eliminada el agua utilizada para desalarlas, las aceitunas se colocan en envases de vidrio (130 g de aceitunas y 150 mL de salmuera) con un septo de silicona

en la tapa superior para facilitar la toma de muestras aseptica y evitar la contaminación del contenido. A continuación, se añaden las diferentes salmueras mostradas en la Tabla 4.6. El diseño (“simplex-centroide”) consiste, en este caso, en 19 tratamientos compuestos de 13 mezclas independientes más 5 duplicados y un tratamiento similar al empleado a escala industrial (5% NaCl). El contenido total de las concentraciones iniciales de las diferentes sales, expresadas en porcentajes, se limita al 5%, con el NaCl oscilando entre 2,5 y 5%, KCl entre 0 y 2,5%, CaCl₂ entre 0 y 1,5% y MgCl₂ entre 0 y 1,5%. Todas las salmueras se corrigen de manera que alcanzan en el equilibrio, una vez envasadas, valores de pH entre 1,98 y 2,20 unidades, 0,5% de acidez libre y una acidez combinada de 0,025 Eq/L. La experiencia se realiza por duplicado, contando, por tanto, con un total de 38 envases a analizar. El seguimiento de la evolución de los envasados de los diferentes tratamientos se estudia durante 120 d.

Tabla 4.6. Diseño “simplex-centroide” utilizado para estudiar los efectos de NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂ en el envasado de aceitunas Manzanilla.

Tratamientos	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)	MgCl ₂ (%)
1*	2,500	2,500	0,000	0,000
2*	2,500	1,500	0,500	0,500
3*	2,500	1,750	0,000	0,750
4*	2,500	1,000	1,500	0,000
5*	2,500	1,500	0,500	0,500
6*	2,500	1,750	0,000	0,750
7*	2,500	2,500	0,000	0,000
8*	2,500	1,000	0,907	0,593
9	2,500	1,201	0,352	0,948
10	2,500	1,000	0,000	0,500
11	2,500	1,993	0,253	0,254
12*	2,500	1,000	0,907	0,593
13*	2,500	1,000	1,500	0,000
14	2,500	1,750	0,750	0,000
15	2,500	1,709	0,285	0,506
16	2,500	1,000	0,000	1,500
17	2,500	1,462	0,565	0,473
18	2,500	1,306	1,041	0,153
19	5,000	0,000	0,000	0,000

* Tratamientos duplicados.

En esta experiencia se determinan diferentes parámetros fisicoquímicos en el punto final (pH, acidez libre, acidez combinada, color, textura, y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas, y evolución de la microbiota presente en los envasados.

4.1.3.2. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional

Las experiencias se llevan a cabo en la empresa Aceitunas Bravo S.A. Se emplea aceituna Aloreña de Málaga previamente conservada por la empresa durante 5 meses, que se coloca en envases de plástico con septo en la tapa superior para facilitar la toma de muestras. A continuación, se llenan los envases con las diferentes salmueras previamente preparadas en el laboratorio. La experiencia consiste en un diseño “simplex-centroide”, mostrado en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Diseño experimental “simplex-centroide” utilizado en el estudio del efecto del NaCl, KCl, y CaCl₂ en el envasado de aceitunas de la variedad Aloreña de Málaga tradicional.

Tratamientos	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1*	5,000	0,000	0,000
2*	5,000	0,000	0,000
3*	2,500	0,000	2,500
4*	2,500	0,000	2,500
5	2,917	1,667	0,417
6*	2,500	1,250	1,250
7*	2,500	2,500	0,000
8	4,167	0,417	0,417
9	3,750	1,250	0,000
10	3,750	0,000	1,250
11	3,333	0,833	0,833
12*	2,500	2,500	0,000
13	2,917	0,417	1,667
14*	2,500	1,250	1,250
15*	5,000	0,000	0,000

* Tratamientos duplicados

El diseño contempla un total de 15 tratamientos, incluyendo 5 replicados. La concentración total del contenido inicial de las diferentes sales, expresadas en porcentajes, se limita al 5% (que es la concentración habitualmente empleada por la empresa cuando solo usa NaCl en las salmueras de envasado), oscilando el NaCl entre 2,5 y 5%, el KCl entre 0 a 2,5% y el CaCl₂ entre 0 y 2,5%. Todas las salmueras contienen, además, la siguiente composición general (utilizada por la industria): 0,170% (p/v) sorbato potásico, 0,263% (p/v) ácido cítrico, 0,064% (p/v) ácido ascórbico, y 0,017% (v/v) ácido láctico (85% pureza). El seguimiento de la evolución de los envasados con los diferentes tratamientos se lleva a cabo durante 50 días, tiempo aproximado de la vida de mercado de este producto.

Para esta experiencia se determinan diferentes parámetros fisicoquímicos en el punto final (pH, acidez libre, acidez combinada, color, textura, y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas, y evolución e identificación de la microbiota presente en los diferentes tratamientos.

4.1.4. Estudio de la adición de ZnCl₂ en los envasados

4.1.4.1. Envasado de aceitunas Manzanilla estilo sevillano

Se utilizan aceitunas conservadas de la variedad Manzanilla, proporcionadas por la empresa JOLCA S.A. Los frutos se lavan y se introducen en bolsas de plástico (75 g de aceitunas + 105 mL de salmuera) de poliéster-poliestireno (Figura 4.4). A continuación, se añade a las bolsas cuatro salmueras diferentes: a) la misma salmuera que utiliza habitualmente la industria, con sorbato potásico al 0,01% (control); b) salmuera con 0,050% (p/v) de ZnCl₂; c) salmuera con 0,075% (p/v) de ZnCl₂; y d) salmuera con 0,100% (p/v) de ZnCl₂, realizando un total de cuatro tratamientos diferentes. Posteriormente, las bolsas se cierran mediante doble sellado (a 177°C durante 3 s, dos veces). Para cada tratamiento se preparan un total de 40 envases, manteniéndolos a temperatura ambiente (20±3°C) durante un periodo similar a la vida de mercado media del producto (134 d). Periódicamente, se toman y analizan dos envases (replicados) por tratamiento.



Figura 4.4. Bolsas de plástico de poliéster-poliestireno utilizadas para estudiar el envasado de aceitunas Manzanilla con diferentes mezclas de sales minerales.

En esta experiencia se determinaron diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, acidez libre, acidez combinada, color, textura, y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas en el punto final, y evolución de la microbiota presente.

4.1.4.2. Envasado de aceituna verde fresca Aloreña de Málaga

Las aceitunas empleadas en este caso son frutos frescos de la variedad Aloreña de Málaga de calibre 240/260 (frutos por kg) suministrados por Aceitunas Bravo S.A., que se lavan, parten y se mantienen en salmuera durante tres días antes de envasarlos. A continuación, se colocan en recipientes de plástico (400 g de aceitunas y 310 mL de salmuera) con un 4% de una mezcla de ajo picado, pimienta, hinojo y tomillo. Posteriormente, los envases se llenan con cuatro salmueras diferentes: a) la que utiliza habitualmente la industria, con 0,12% de sorbato potásico (control); b) salmuera con 0,050% (p/v) de $ZnCl_2$; c) salmuera con 0,075% (p/v) de $ZnCl_2$; y d) salmuera con 0,100% (p/v) de $ZnCl_2$, realizando un total de cuatro tratamientos diferentes. Todas las soluciones de envasado contienen además: 0,213% (p/v) de ácido cítrico, 0,064% (p/v) de ácido ascórbico, y 0,15% (v/v) de ácido láctico. Para cada tratamiento se preparan un total de 24 envases, que se mantienen a temperatura ambiente ($20\pm 3^\circ C$) durante un periodo similar a la vida de comercialización media del producto (~3 meses). Periódicamente, se retiran y analizan dos envases (replicados) por tratamiento.

En esta experiencia se determinan diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, acidez libre, acidez combinada, color, textura, azúcares, ácidos, y contenido en minerales), perfil sensorial de las aceitunas, y evolución de la microbiota presente en cada uno de los tratamientos.

4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS REALIZADOS

4.2.1. Determinación del pH, acidez libre y acidez combinada

Los análisis de pH, acidez libre (expresados como g láctico/100 mL de salmuera) y acidez combinada (meq de HCl añadidos a 1 L de salmuera para alcanzar un pH de 2,6) se realizan con un equipo Titroprocessor 670 (Metrohm instrumental INC, Suiza), que estima dichos parámetros a partir de la valoración, con soluciones de NaOH (0,5 M) o HCl (2 N) según el caso, de un volumen de muestra (salmuera de fermentación o líquido de gobierno en el envasado) de 25 mL (Fernández Díez y col., 1985).

4.2.2. Determinación del color en la superficie de las aceitunas

El color de la superficie de las aceitunas se analiza mediante un espectrofotómetro Color-view™ BYK-Gardner, modelo 9000 (Silver Spring, MD, USA), mostrado en la Figura 4.5.



Figura 4.5. Espectrofotómetro Color-view™ BYK-Gardner, modelo 9000.

El color superficial se expresa en función de los parámetros colorimétricos CIE: L^* , a^* , b^* (Figura 4.6). Las medidas se realizan empleando un iluminante tipo C a 10° . Cada valor es la media de 10 determinaciones, siendo cada una de estas, a su vez, la media de 10 medidas efectuadas en zonas del fruto no dañadas, sobre aceitunas previamente secadas superficialmente. Para minimizar la interferencia con la luz ambiental, las aceitunas se cubren con una cápsula cuyo interior es negro para evitar distorsiones en la medida.

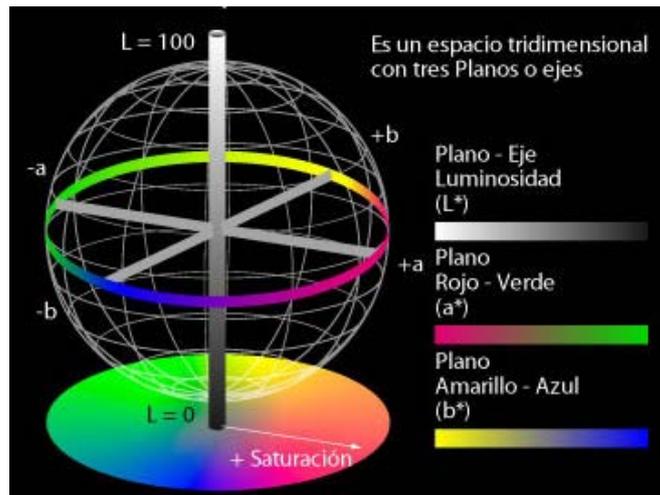


Figura 4.6. Representación tridimensional del espacio de color CIE lab.

Para la determinación del índice de color (I_c) en aceitunas verdes se aplica el procedimiento desarrollado por Sánchez y col. (1985). Para ello, se toman las medidas de reflectancia a las 4 longitudes de onda características de los colores amarillo, verde y rojo: 560, 590, 630 y 640 nm. A partir de estos datos de reflectancia (R), se calcula el índice de color según la ecuación:

$$I_c = \frac{-2 * R_{560} + R_{590} + 2 * R_{630} + 2 * R_{640}}{3} \quad (4.6)$$

La Tabla 4.8 muestra la correspondencia entre los valores de este índice (I_c) y la clasificación subjetiva del color de aceitunas verdes aderezadas de la variedad Manzanilla, otorgada por un panel de expertos utilizando una escala de 5 niveles de calidad (Sánchez y col., 1985).

Tabla 4.8. Correspondencia entre la clasificación subjetiva con una escala de cinco niveles de calidad y el índice de color (I_c) de las aceitunas verdes aderezadas de la variedad Manzanilla, según [Sánchez y col. \(1985\)](#).

Escala de color en la muestra	Intervalo de I_c asignado para cada escala
Excelente	30,2 - 33,6
Bueno	26,8 - 30,2
Aceptable	23,7 - 26,8
Malo	21,0 - 23,7
Pésimo	<21,0

4.2.3. Determinación de la textura instrumental de las aceitunas

La determinación de esta característica se realiza mediante el equipo Instron Universal Testing, modelo 1001 (Canton, Ma, USA), al que se acopla una célula Kramer de compresión-cizallamiento, que se desplaza a una velocidad de 200 mm/min ([Arroyo-López y col., 2005](#)). La medida se expresa como la fuerza necesaria (Newtons) para “masticar” 100 g de aceitunas deshuesadas (N/100g). La textura de las aceitunas de cada tratamiento se estima como la media de 10 determinaciones.

4.2.4. Determinación de azúcares en salmuera

El contenido en azúcares reductores (glucosa, fructosa, sacarosa y manitol) presentes en las salmueras se determina por HPLC, según la metodología descrita por [Montaño y col. \(1993\)](#). El sistema cromatográfico es un equipo Waters, modelo 2690 Alliance dotado de un inyector automático. Para la detección se usa un refractómetro diferencial Water 410. Brevemente, se toma 0,5 mL de salmuera y 1,5 mL del patrón interno (sorbitol 0,1%, p/v) y se ponen en contacto con una mezcla de resinas catiónicas y aniónicas [1 g de IRA 120 (forma H^+ , red 16-45, Fluka, Suiza) y 1 g de IRA 96 (libre de bases, red 20-50, Fluka, Suiza)] para eliminar las sales que contienen las salmueras. Después de 1 h de contacto, 1 mL de la disolución se centrifuga a 8.000g durante 10 min. Este líquido, ya aclarado y desalado, se inyecta en una columna tipo Aminex HPX-87°C (BioRad Labs, Hercules, Ca. U.S.A.) para análisis de carbohidratos, mantenida a 87°C. Como eluyente se emplea agua desionizada a un flujo de 0,6 mL/min. La cuantificación de los cromatogramas generados se efectúa mediante la comparación de las correspondientes aéreas obtenidas con las de los patrones respectivos.

4.2.5. Determinación de ácidos en salmuera

Los ácidos orgánicos láctico y acético se determinan simultáneamente por HPLC. Las muestras se diluyen (1:1) con agua desionizada, se centrifugan a 11.600g durante 5 min y se inyecta una alícuota de 20 μ L en el cromatógrafo. Se utiliza un sistema cromatográfico similar al anteriormente descrito para el análisis de azúcares. En este caso, se emplea una columna Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 250 · 4.6 mm, Waters Inc.) y se eluye con agua acidificada (pH 2,3 ajustado con ácido fosfórico) como fase móvil, a un flujo de 1,2 mL/min (Montaño y col., 1993).

4.2.6. Determinación de minerales en pulpa

Para realizar las determinaciones de minerales se toman 100 g de aceitunas fermentadas y/o envasadas. El escurrido de los frutos se realiza depositando estos en un cedazo circular UNE de 2,5 mm de luz de malla cuadrada, inclinado con un ángulo comprendido entre 17 y 20° para facilitar el drenaje, sin sacudirlo o vibrarlo. Las aceitunas se dejan en el mismo durante 2 min (Ministerio de la Presidencia, 2001). Posteriormente, se procede a su deshuesado. Una vez escurridas y deshuesadas, los frutos se trituran y se guardan en botes de cristal. El conjunto se congela a -20° C hasta su posterior análisis.

Para obtener las cenizas, se utilizan cápsulas de cuarzo. Con tal fin, 5 g del triturado homogeneizado de las muestras anteriores se calientan en estufa a 100°C para eliminar el agua lentamente, con objeto de evitar salpicaduras. Luego se coloca la cápsula en el horno y se eleva gradualmente la temperatura hasta 525° C, que se mantiene durante toda la noche. Al día siguiente, se retira, se deja enfriar en un desecador y se pesa. A continuación, se añade agua desionizada para humedecer las cenizas, se evapora en estufa calentando lentamente y, una vez secas, se introducen en el horno y se vuelven a calcinar. Esta operación se repite hasta obtener cenizas blancas y con un peso constante. Todas estas operaciones se efectúan protegiendo las muestras de cualquier contaminación o pérdidas (Fernández Díez y col., 1985). A la cápsula con las cenizas de color blanco grisáceo se le añade 2 mL de HCl 6N, con el fin de disolverlas más rápidamente, y se coloca encima de una placa calefactora para calentar su

contenido ligeramente. A continuación se aspira el HCl de la cápsula hacia un matraz aforado de 25 mL. Luego se añade agua desionizada a la cápsula y se vuelve a aspirar el líquido hacia el matraz. Dicha operación se repite otras dos veces más y, por último, el contenido del matraz se lleva a 25 mL con agua desionizada. Para la aspiración se coloca el matraz de 25 mL en el interior de un recipiente en el que se hace el vacío, procurando que el tubo por el que se recoge la solución quede introducido en el matraz. Ese mismo tubo de vidrio, lleva, por el otro extremo, por el que se aspira, un papel de filtro para retener las impurezas residuales (Figura 4.7). Una vez recogida la solución, la misma se enrasa y se emplea para la determinación de los diferentes elementos.

La cuantificación de los minerales nutrientes se realiza mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (García et al, 2002). Los minerales analizados, en función de la finalidad de cada experiencia, han sido: Na, K, Ca, Mg y Zn. En el caso del Zn, las determinaciones se hacen directamente en la solución de 25 mL; en el caso del Mg se diluye 0,2/25 y para el Ca la dilución se lleva hasta que sus concentraciones entren dentro del rango de medida del aparato. A las soluciones destinadas al análisis de estos dos últimos elementos se añade una solución de lantano a una concentración de 2000 – 5000 µg/ml, para evitar interferencias derivadas de la utilización de la llama aire-acetileno. Asimismo, para evitar interferencias en las determinaciones de Na a las soluciones para el análisis de este se añade KCl a una concentración de 2000 µg/mL de K, con objeto de suprimir la ionización del Na. Finalmente, para prevenir las interferencias en las determinaciones de K se añade CaCl₂ a una concentración de 1000 µg/mL de Ca que suprime la ionización del K.

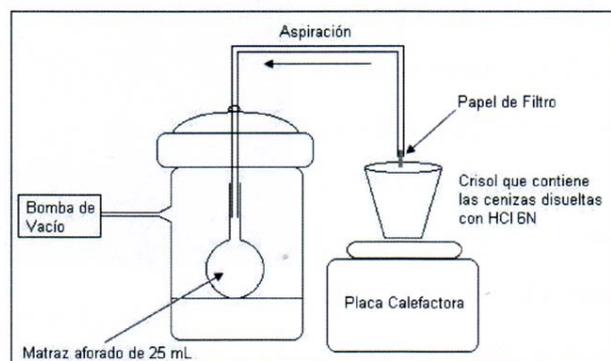


Figura 4.7. Esquema del sistema de aspiración a vacío situado en vitrina con campana extractora, que se utiliza para la solubilización de las cenizas y filtración de las soluciones resultantes.

Las soluciones estándares de los distintos minerales empleadas para el cálculo de las curvas de calibrado se obtienen de soluciones madres comerciales (Sigma), a las que se les añade HCl a una concentración similar a la de las muestras. El aparato empleado es un espectrómetro de absorción atómica GBC modelo 932 AA (Victoria, Australia) (Figura 4.8), equipado con tres lámparas de cátodo hueco multielementos (Cu, Cr, Co, Fe, Mn y Ni) (GBC, Victoria, Australia), (Ca, Mg, Cu y Zn) (Photrompty, Victoria, Australia) y (Na y K) (Photrompty, Victoria, Australia) (Figura 4.8). La llama utilizada es de aire-acetileno. La Tabla 4.9 indica las condiciones instrumentales utilizadas para la determinación de los elementos minerales antes mencionados.



Figura 4.8. Espectrómetro de absorción atómica GBC modelo 932 AA, utilizado para la determinación de minerales en pulpa.

Tabla 4.9. Condiciones instrumentales para las determinaciones de Na, K, Ca, Mg y Zn.

Condiciones	Elemento				
	Na	K	Mg	Ca	Zn
Corriente de la lámpara (mA)	5,0	18,0	3,0	10,0	5,0
Longitud de onda (nm)	330,2	766,5	285,2	422,7	213,9
Ancho de banda (nm)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tipo de llama	oxidante	oxidante	oxidante	oxidante	oxidante
Modo instrumental	A*	A	A	A	A
Rango óptimo de trabajo (µg/mL ó mg/L) de acuerdo con el manual del aparato	100 - 380	0,4 – 1,5	0,1 – 0,4	1,0 – 4,0	0,4 – 1,5

*A: absorbancia.

4.2.7. Análisis sensorial

Todas las pruebas sensoriales se han llevado a cabo en la sala normalizada de cata del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (Figura 4.9). Las pruebas se realizan con 9-11 catadores, habituales consumidores de aceitunas de mesa y con amplia experiencia (3-10 años) en la evaluación de las mismas. Además, antes de cada serie de experiencias se les ha entrenado en relación con la finalidad de la misma, la detección de diferencias específicas entre muestras, o las características de las muestras de referencia.



Figura 4.9. Sala normalizada de cata del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa.

El estudio del comportamiento del panel indica que el mismo da puntuaciones homogéneas en cuanto a la aplicación de los criterios de evaluación y que valoran las muestras de manera consistente. No se detectan en ninguno de los tratamientos de los diferentes ensayos fermentaciones anormales ni sabores extraños por encima de las proporciones establecidas para la categoría Extra. Por lo tanto, de acuerdo a la metodología de análisis sensorial descrita por IOOC (2010c), todos los tratamientos descritos en esta Tesis se consideran productos comercializables.

Para evaluar las características de las aceitunas se realiza un análisis descriptivo cuantitativo (ADC). Los descriptores seleccionados para esta evaluación son los recogidos en la norma sobre Análisis Sensorial de Aceitunas de Mesa (IOOC, 2010). Los mismos son: acidez, salado, amargo, dureza, fibrosidad y crujiente. La intensidad de la percepción de cada descriptor se refleja, una vez comprobada la ausencia de los defectos que menciona igualmente la mencionada Norma, realizando un trazo

correspondiente a su valor en una escala gráfica no estructurada de 10 cm. Los extremos de los niveles de la escala se detallan en la Tabla 4.10. A cada panelista se le presenta una muestra de 4 aceitunas (incluyendo replicados), en la que debe evaluar cada uno de los descriptores arriba indicados. Los valores obtenidos del análisis ADC pueden considerarse variables continuas. Para evitar el sesgo provocado por los evaluadores, los datos habitualmente se centran con respecto a los evaluadores. Esto es particularmente interesante cuando no se está interesado en el panelista sino en los productos y los descriptores, como ocurre en este trabajo (Hibbert, 2009).

Tabla 4.10. Valores extremos recogidos en las escalas no estructuradas de evaluación sensorial para cada descriptor de las aceitunas verdes estilo sevillano.

Atributo Sensorial	Límites de la escala	
	1	11
Ácido	Ausente	Muy ácida
Salado	Ausente	Muy salada
Amargo	Ausente	Muy amarga
Dureza	Blanda	Muy dura
Fibrosidad	Ausente	Muy fibrosa
Crujiente	Ausente	Muy crujiente

4.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

4.3.1. Medios de cultivo e instrumental utilizado para estudiar el crecimiento de los microorganismos.

Para el aislamiento y crecimiento selectivo de los diferentes tipos de microorganismos presentes en las fermentaciones/envasados de aceitunas de mesa se utilizan los siguientes medios de cultivo:

- VRBD agar (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El violeta de cristal y la bilis hacen que el medio sea específico para enterobacterias. Las placas se incuban a 30° C durante 24-48 h.
- MRS (Man, Rogosa, Sharpe) agar (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) suplementado con 0,02% de azida sódica (Sigma, St. Luis, Estados Unidos). La

especificidad propia que confiere el medio, junto con la presencia de azida sódica, permite exclusivamente el crecimiento de bacterias lácticas. Las placas se incuban a 30° C durante 72 h.

- YM agar (Difco, Becton and Dickinson Company, Spark, MD, Estados Unidos) suplementado con los antibióticos sulfato de gentamicina (0,005%) y oxitetraciclina (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Los antibióticos permiten exclusivamente el crecimiento de mohos y levaduras. Las placas se incuban a 30° C durante 48 h.

Las muestras de salmueras, o sus correspondientes diluciones decimales (en agua de peptona 0,1 % estéril), se siembran sobre los medios arriba mencionados utilizando un sembrador en espiral modelo dw Scientific (Don Whitley Scientific Limited, Reino Unido), mientras que para los recuentos se utiliza un contador automático modelo CounterMat v.3.1. (IUL Instruments, Barcelona, España) (Figura 4.10).



Figura 4.10. Sembrador automático en espiral (izquierda) y contador automático de placas (derecha) utilizados en la presente tesis doctoral.

Para monitorizar el crecimiento e inhibición de los microorganismos mediante medidas de la DO se ha empleado un espectrofotómetro automatizado modelo Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab. Ltd. Helsinki, Finlandia), el cual permite controlar el crecimiento de hasta 200 muestras repartidas en 2 placas multipocillos (Figura 4.11). Este espectrofotómetro automatizado utiliza un filtro de banda ancha (420 – 580 nm) especialmente diseñado por el fabricante para detectar aumentos de turbidez.



Figura 4.11. A la izquierda, espectrofotómetro automatizado modelo Bioscreen C. A la derecha, placas multipocillos empleadas en este estudio.

4.3.2. Aislamiento e identificación de microorganismos

Los aislamientos se seleccionan al azar sobre placas con un número de colonias no inferior a 30 ni superior a 300. A continuación se realizan, al menos, tres pases sucesivos por el procedimiento de siembra en estrías hasta asegurar la obtención de un cultivo puro antes de proceder a su posterior identificación.

4.3.2.1. Identificación de lactobacilos

Para la identificación de aislamientos pertenecientes al género *Lactobacillus*, se emplean los cebadores descritos por [Torriani y col. \(2001\)](#). La extracción de ADN total se realiza con cloroformo-álcool isoamílico (24:1) por el procedimiento descrito por [Ruiz-Barba y col. \(2005\)](#). Una colonia aislada se resuspende en 100 μL de agua desionizada y a continuación se añade 100 μL de cloroformo-álcool iso-amílico (24:1). Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 13.000g durante 5 min. Una alícuota de 5 μL de la fase superior, que contiene la suspensión de ADN, se introduce en la siguiente mezcla de reacción: 4 μL de una mezcla de los cuatro dNTP (50 μM de cada uno), 2,5 μL MgCl_2 (2,5 mM), 1,5 μL buffer reacción 10x (suministrado por el fabricante), 1 μL cebador paraF (0,5 μM), 1 μL cebador pentF (0,5 μM), 0,5 μL cebador planF (0,5 μM), 1 μL cebador pREV (0,5 μM), 8,2 μL agua desionizada y 0,3 μL Taq polimerasa (Rocher Molecular Biochemicals, Alemania). Los cebadores paraF, pentF, planF y pREV tienen las secuencias 5'-GTCACAGGCATTACGAAAAC-3', 5'-

CAGTGGCGCGGTTGATATC -3', 5'-CCGTTTATGCGGAACACCTA-3' y 5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3', respectivamente. La amplificación se lleva a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (M.J. Research, Estados Unidos) usando el siguiente programa: 1) desnaturalización a 94° C durante 1 min; 2) alineamiento a 55,5° C durante 2 min; 3) elongación a 72° C durante 2 min. Este ciclo se repite 40 veces y finaliza con una etapa de 72° C durante 10 min. El producto de la amplificación se visualiza en un gel de agarosa del 1,5% (p/V) en tampón TAE 1x tras una tinción de 20 min en bromuro de etidio.

4.3.2.2. Identificación de levaduras

Para ello se realiza un análisis de los perfiles de restricción generados por una batería de endonucleasas sobre los amplificados del gen ribosómico 5.8S y sus espacios intergénicos asociados ITS1- ITS2 (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Con tal fin, una colonia de levadura se recoge directamente con ayuda de una punta de pipeta estéril (Esteve-Zarzoso y col., 1999) y se introduce en 98 µL de una mezcla de reacción que contiene los siguientes componentes: 10 µL de buffer de reacción 10x (suministrada por el fabricante), 16 µL de una mezcla con los cuatro dNTP (50 µM de cada uno), 6 µL de MgCl₂, 5 µL del cebador ITS₁ (0,5 µM, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 5 µL del cebador ITS₄ (0,5 µM, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 56,8 µL de agua desionizada. La mezcla se calienta a 94°C durante 15 min para destruir las células y a continuación se añade 1,2 µL de la Taq polimerasa (EcoTaqI, CViral). Posteriormente, la amplificación se lleva a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (M.J. Research, Estados Unidos). El programa comienza con una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min y 40 ciclos con las siguientes etapas: 1) desnaturalización a 94° C durante 1 min, 2) alineamiento a 55,5° C durante 2 min y 3) elongación a 72° C durante 2 min. El programa termina con una etapa a 72° C de 10 min de duración. A continuación, la electroforesis se lleva a cabo en un gel de Agarosa (Seakem, Biowhittaker Molecular Applications, Estados Unidos) al 1,4% (p/V) en tampón TAE 1x y empleando un marcador molecular 1-kb+ (Life Technologies, Estados Unidos).

En la posterior restricción, el amplificado se digiere separadamente con las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (Roche Molecular Biochemicals, Alemania). La

reacción de restricción contiene 2,5 μL de buffer 10x (específico de la enzima y suministrado por el fabricante), 6,5 μL de agua desionizada, 1 μL de la enzima de restricción (5 unidades/ μL) y 15 μL del amplificado por PCR. Las restricciones se incuban a 37° C durante al menos 12 h. Los fragmentos obtenidos se analizan posteriormente en un gel de agarosa al 3% (p/V) en tampón TAE 1x y se tiñen durante 20 min en bromuro de etidio. Los perfiles de restricción y el amplificado obtenidos para cada levadura se comparan con los existentes en la base de datos www.yeast-id.com (Universidad de Valencia y CSIC, España).

4.4. ANÁLISIS Y AJUSTES ESTADÍSTICOS

4.4.1. Estudio del efecto combinado de las diversas sales minerales sobre los parámetros de crecimiento de *L. pentosus* y *S. cerevisiae*

Los datos de recuento en placa obtenidos en el apartado 4.1.1.1 se ajustan, mediante el programa informático Microfit 1.0 al modelo primario de [Baranyi y Roberts \(1994\)](#). Ello permite obtener los parámetros de crecimiento μ_{\max} , λ y N_{\max} para cada una de las experiencias contempladas en el diseño experimental.

Posteriormente, para describir el efecto combinado de las sales sobre los parámetros de crecimiento, se ha aplicado un modelo secundario de superficie de respuesta (SR), cuya expresión matemática viene representada por la siguiente fórmula, restringida solo al modelo de tres términos:

$$P = \sum_1^4 \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum_1^4 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_1^4 \beta_{ii} x_{ii}^2 + \varepsilon \quad (4.7)$$

Donde x_1, x_2, x_3 y x_4 son las variables ambientales estudiadas (NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂, respectivamente), P (respuesta) es el parámetro de crecimiento modelado o su transformación (μ_{\max} , λ , o N_{\max}), y β s son los coeficientes a estimar (para una discusión más amplia sobre la interpretación de los términos obtenidos en un polinomio de mezclas ver [Myers y Montgomery, 2002](#)). Este tipo de análisis permite obtener los efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre las variables mediante un análisis de varianza (ANOVA). El programa calcula distintos tipos de modelos (lineal, cuadrático y cúbico) y comprueba el que proporciona el mejor ajuste a los datos experimentales,

utilizando, en nuestro caso, la opción de eliminación “Backward” para conservar los coeficientes significativos. En este sentido, si el test F para el modelo es significativo ($p < 0,05$), hay evidencias de que el modelo podría explicar satisfactoriamente las variaciones en la respuesta. La validez del ajuste se evalúa también mediante la proporción de la varianza total explicada por el modelo (R^2), el test para la falta de ajuste y otros parámetros estadísticos asimismo suministrados en el análisis. En el modelo final obtenido, se retienen también los coeficientes requeridos para mantener el principio jerárquico, ya que esta característica es necesaria para transformar los modelos deducidos en ecuaciones en las que se puedan sustituir directamente las variables ambientales por los valores de las mismas expresados en las unidades utilizadas en el diseño (Myers y Montgomery, 2002).

El efecto de cada factor (tipo de sal) se evalúa, posteriormente, en mayor profundidad mediante el uso de gráficas de perturbación, que muestran el cambio de la variable respuesta cuando cada factor ambiental (codificado) se desplaza desde el punto de referencia elegido hasta su nivel máximo, con todos los otros factores mantenidos constantes en los valores de referencia (Oh y col., 1995). La respuesta del modelo se estima como:

$$\hat{Y} = f(x_1, x_2, x_3, x_4) \quad (4.8)$$

en la cual $x^*_1, x^*_2, x^*_3, y x^*_4$ se mantienen en los siguiente valores específicos (0%, 0%, 0%, 0%) o (5%, 0%, 0%, 0%), según los casos. De este modo, el efecto perturbador de x_1 (NaCl) se puede definir de la siguiente manera:

$$\hat{Y}(x_1) = f(x_1, x^*_2, x^*_3, x^*_4) \quad (4.9)$$

Los efectos perturbadores de $x_2, x_3, y x_4$ se definen de manera similar. Los gráficos se dibujan con el eje vertical representando $\hat{Y}(x_i)$, en valores físicos, y en el horizontal x_i (en valores codificados).

Para comprobar la exactitud de las predicciones realizadas por las diferentes ecuaciones de SR sobre los parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* y *L. pentosus*, se llevan a cabo una serie de nuevas experiencias en las que se comparan los valores realmente obtenidos con los predichos por los modelos, utilizando para ello los índices de exactitud (A) y sesgo (B) definidos por Baranyi y col. (1999). Un valor de $A=1$ indica una excelente correlación entre las predicciones y los valores observados. Cuanto

más se aleje A de este valor peores serán las predicciones; un valor de $B < 1$ debe interpretarse en el sentido de que el modelo predice valores menores que los realmente observados, mientras que si $B > 1$ quiere decir que los valores predichos son mayores que las observaciones y, por tanto, el modelo predice por exceso. Los tratamientos de validación para el caso del crecimiento de *L. pentosus* y *S. cerevisiae* contemplaron las siguientes combinaciones de sales, no incluidas originariamente en el diseño experimental: 1) 4% NaCl, 2% KCl, 2% CaCl₂, 1% MgCl₂; 2) 1% NaCl, 4% CaCl₂; 3) 1% KCl, 1% MgCl₂; 4) 5% NaCl, 1% KCl, 2% CaCl₂; 5) 1% NaCl, 1% CaCl₂, 1% MgCl₂.

4.4.2. Estudio del efecto de la composición de las mezclas de sales minerales sobre los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, descriptores sensoriales y contenido mineral de las fermentaciones y envasados de aceitunas

El efecto combinado de las diversas sales de cloruro añadidas inicialmente a la salmuera sobre: a) los parámetros de crecimiento/muerte o las curvas estandarizadas de las poblaciones de enterobacterias, levaduras y BAL; y b) los parámetros fisicoquímicos se estudia mediante la obtención de las correspondientes superficies de respuesta (SR). Esta regresión está representada por la siguiente ecuación, expresada en su forma canónica (o de Sheffé), incluyendo hasta el término cubico especial:

$$R = \sum_1^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum_1^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_1^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j < k} \sum_1^3 \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \varepsilon \quad (4.10)$$

Donde x_1 , x_2 , y x_3 representan NaCl, CaCl₂, y KCl, respectivamente, R son las respuestas (áreas estandarizadas, parámetros de crecimiento/muerte o fisicoquímicos, o sus valores transformados), y β s son los coeficientes a ser estimados. Como en el caso del apartado 4.4.1, la estimación de los mismos se realiza mediante ajuste por mínimos cuadrados y el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables respuesta. En cada paso se evalúa el ajuste del modelo aplicado y se observa si uno más complejo puede tener un mejor ajuste. Si el test-F para el modelo final es significativo ($P < 0,05$) existe evidencia de que este puede explicar una proporción más alta de las variaciones en la respuesta y, por tanto, se selecciona ([Myers y Montgomery](#),

2002). Los términos no significativos se han eliminado igualmente mediante la opción *Backward*. En el modelo final, se han retenido, además, los coeficientes necesarios para mantener al modelo jerárquico, ya que solo estos modelos son independientes de la escala y pueden ser transformados en otros en los que puedan aplicarse directamente las concentraciones en las unidades reales empleadas. El análisis estadístico se realiza utilizando el valor de cada replicado, con el fin de poder estimar el error puro y poder calcular, asimismo, la significación de la falta de ajuste. La idoneidad del ajuste se comprueba mediante diferentes pruebas diagnósticas, que incluyeron la presencia de valores atípicos, la distancia de Cook, la influencia, los gráficos de los valores residuales frente a los predichos, y la representación gráfica de los valores predichos frente a los experimentales. El procedimiento es bastante similar al ya descrito en el apartado 4.4.1, por lo que todo lo comentado anteriormente es igualmente aplicable en este caso.

Únicamente, se insistirá en el hecho de que los términos en el polinomio de mezcla canónico tienen una interpretación simple. Geométricamente, el parámetro β_i representa la respuesta esperada para la mezcla pura $x_i=1$, $x_j=0$, y es la altura de la superficie de mezcla en el vértice $x_i=1$. Normalmente, la parte de cada polinomio dada como:

$$\sum_1^q \beta_i x_i$$

en la (q = número de variables) se denomina la porción lineal de la mezcla.

La interacción de dos factores:

$$\sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j$$

representa la respuesta de exceso sobre la lineal y se denomina a menudo la sinergia (o antagonismo, dependiendo del signo) debido a la mezcla no lineal. Los términos cuadráticos y cúbicos especiales se explican de manera similar (Myers y Montgomery, 2002).

La manera más común en la que se puede resumir los resultados obtenidos para las diversas proporciones de sales minerales son las gráficas de líneas de contorno en las correspondientes representaciones triangulares características de estos diseños.

Cualquier mezcla de los tres componentes puede ser representada mediante un punto en el sistema de coordenadas triangulares. Solo los puntos dentro del triángulo, donde la suma de los componentes es igual a 1 (o la cantidad total fija en concentraciones reales), son mezclas válidas. Para leer las coordenadas de un punto, hay que trazar una línea desde cada vértice correspondiente hasta el lado de abajo del triángulo. En el vértice de cada factor en particular, existe una mezcla pura (solo contiene este componente), excepto en el caso de que alguno de los componentes lleve ya un nivel base común. Se puede añadir una cuarta dimensión al triángulo, perpendicular a las tres primeras, para representar el valor de la variable dependiente, que puede reflejarse, como suele ser lo más frecuente, en una gráfica de contorno donde se proyectan las líneas de superficie de altura constante en un triángulo 2D.

4.4.3. Análisis quimiométricos

Se aplica cuando existen varias variables por tratamiento (p.e. los diversos parámetros que pueden representar las curvas de crecimiento de enterobacterias, levaduras, o BAL o los diversos descriptores del análisis sensorial) y consisten habitualmente en herramientas multivariantes. Las técnicas utilizadas en este trabajo han sido el análisis de clusters jerárquico (ACJ) y el análisis de componentes principales (ACP) y la regresión mediante mínimos cuadrados parciales (PLS). El primero consiste en agrupar las variables o casos, según las distancias (normalmente euclídeas) a la que se encuentran.

El ACP es otra herramienta muy utilizada en quimiometría para la comprensión de datos, capturando las principales características de los conjuntos de datos multivariantes, para extraer la mayor información posible de ellos. Su objetivo es encontrar las tendencias tanto en las variables como en los tratamientos (casos). El ACP implica un procedimiento matemático que transforma el conjunto general de variables originales en un número inferior de variables virtuales que pueden agrupar a varias o incluso todas las originalmente manejadas. Idealmente, cada nueva variable (denominada componente principal o factor) representa la información de una serie de variables originales con las que se relaciona; entonces, a la CP suele asignársele una denominación que exprese la característica común a todas ellas (p.e. máxima población

si incluye las poblaciones máximas de enterobacterias, BAL o levaduras). Estos CPs pueden ser considerados como combinaciones lineales de las variables originales (Jackson, 1991). Normalmente en el ACP se aplica, además, una rotación de los ejes de manera que se maximicen las diferencias; en nuestro caso se ha utilizado la rotación denominada varimax. Para la selección del número de CPs, se sigue el criterio de Kaiser (Jolliffe, 1986) y solo se retienen los CPs con valores superiores a 1,00. Gráficas normales de estos análisis son las proyecciones de las variables originales y las puntuaciones de los casos sobre el plano formado por los dos primeros CPs. Estas gráficas suelen utilizarse para apreciar las relaciones entre las variables o casos.

El análisis mediante PLS permite describir una serie de variables (como por ejemplo las puntuaciones sensoriales) en función de una serie de parámetros del sistema (p.e. las características físico-químicas) y predecir las primeras en base a las segundas. Tiene la ventaja de que permite situar tanto a las variables (dependientes) como a los parámetros (independientes) y a los casos en una misma gráfica, por lo que muestra de manera muy simple e intuitiva las relaciones entre todos ellos

Antes de realizar el análisis quimiométrico, con objeto de evitar los sesgos debido a las diversas escalas de las variables, habitualmente se ha procedido al re-escalado de los datos (distribución normal con media 0 y desviación estándar 1) o al centrado de las puntuaciones según panelistas, puesto que en nuestro caso no se está interesado en el comportamiento de los panelistas sino en los efectos sobre los tratamientos (Kowalski y Bender, 1972). Ejemplos de dichas transformaciones se dan en el análisis de los datos procedentes de los estudios sensoriales descriptivos cuantitativos o en el caso de las mezclas de sales.

4.4.4. Modelos cinéticos aplicados

4.4.4.1. Modelos de crecimiento/decrecimiento de microorganismos

4.4.4.1.1. Crecimiento de microorganismos

Aparte del modelo de Baranyi y Roberts (1994) ya comentado, otro modelo ampliamente utilizado este trabajo ha sido el reparametrizado de Gompertz (Zwietering y col., 1990), que es especialmente apropiado para obtener los parámetros

correspondientes al crecimiento típico (curva sigmoidea) de microorganismos, considerando que la población se estabiliza al final del mismo. La ecuación toma la forma siguiente:

$$\frac{\ln N_t}{\ln N_0} = A e^{\left[-e^{\left\{ \frac{\mu_{\max} \times e}{A} \times (\lambda - t) + 1 \right\}} \right]} \quad (4.11)$$

en la que \ln es el logaritmo natural o neperiano, N_t es el valor de la población a tiempo t , N_0 es la población inicial, A es el crecimiento relativo máximo estimado, μ_{\max} es el crecimiento específico máximo, λ la duración de la fase de latencia y t el tiempo.

4.4.4.1.2. Crecimiento/decrecimiento de microorganismos

En este caso se emplea el modelo de Peleg (Peleg, 1996), que es particularmente útil cuando se requiere que el mismo se ajuste tanto a la fase de crecimiento como a la de posterior de muerte progresiva que sigue al momento de obtención de la máxima población. Consta de una ecuación logística (que considera la fase de crecimiento) a la que se le superpone el termino de Fermi (para la fase de decrecimiento). El modelo toma la forma siguiente:

$$N(t) = \frac{N_0 + \frac{N_s - N_0}{(1 + \exp[k_g(t_{cg} - t)])}}{1 + \exp[k_l(t - t_{cl})]} \quad (4.12)$$

donde $N(t)$ es el número de microorganismos a tiempo t , N_0 es el número inicial de microorganismos, N_s es el número máximo de microorganismos a que se puede llegar en el medio que se estudia, k_g es la tasa de crecimiento, t_{cg} es un tiempo característico que indica el periodo requerido para llegar a la mitad de de la población máxima alcanzable (es decir, $N(t_{cg})/N_s=1/2$), k_l es la tasa de muerte en la fase de decrecimiento, y t_{cl} es el tiempo al que se alcanza una supervivencia residual del 50%. Dado que, normalmente, N_0 se conoce, el número de parámetros a estimar en la ecuación se reduce a solo cinco. Para facilitar la representación gráfica de la misma en las coordenadas habituales de \log_{10} ufc/ml en función del tiempo, normalmente se toma \log_{10} a ambos lados de la ecuación. Asimismo, también se suele realizar la transformación $N_s = 10^{\log_{10} N_s}$ y $N_0 = 10^{\log_{10} N_0}$ previamente al ajuste. La ecuación es igualmente válida

para el caso de solo crecimiento, para lo que únicamente se requiere la supresión del segundo término que se refiere a la fase de decrecimiento.

4.4.4.2. Modelos cinéticos aplicados a la producción de ácido láctico o acidez total

Se han aplicado dos modelos diferentes, cuyas características se describen a continuación.

4.4.4.2.1. Modelo cinético de tercer orden para la formación de ácido

Dicho modelo toma la forma:

$$Acidez = S_{\infty} \left(1 - \frac{1}{\sqrt{1 + 2S_{\infty}^2 k_a t}} \right) \quad (4.13)$$

en el que S_{∞} es la máxima (asintótica) acidez estimada a t_{∞} , y k_a es la tasa de producción. El tiempo que se tarda en alcanzar la mitad de la acidez máxima se obtiene de la expresión:

$$t_{50} = \frac{3}{2S_{\infty}^2 k_a} \quad (4.14)$$

4.4.4.2.2. Modelo basado en la ecuación de Gompertz reparametrizada

En este caso se trata de una estimación empírica, que toma la forma (Zwietering y col., 1990):

$$Acidez = Ae \left[-e^{\left\{ \frac{(\mu \times e \times (\lambda - t))}{A+1} \right\}} \right] \quad (4.15)$$

en la que los pseudo parámetros que se obtienen son el tiempo que se tarda en comenzar la producción de ácido, λ (equivalente la fase de latencia); tasa de producción de ácido láctico, μ (relacionada con el crecimiento máximo específico); y la producción máxima o asintótica a la que tiende el ácido producido, A (equivalente al crecimiento máximo).

4.4.4.3. Modelos cinéticos aplicados a la evolución del color

4.4.4.3.1. Modelo de cinética de decrecimiento o descenso de pseudo segundo orden

Toma la forma (Taoukis y col., 1997):

$$P^* = P_0 + \frac{c}{1+ck_c t} \quad (4.16)$$

en la que P_0 es la constante o valor del parámetro a t_{∞} , c es una constante para cada ajuste y representa el cambio total estimado para el parámetro, k_c es la tasa de decrecimiento, y t es el tiempo.

El tiempo necesario para llegar al 50% del decrecimiento o descenso en un parámetro específico (t_{50}), por ejemplo, descenso en 50% de los valores de a^* o b^* se estima mediante (Taoukis y col., 1997):

$$t_{50\%} = \frac{1}{ck_c} \quad (4.17)$$

4.4.4.3.2. Modelo cinético de primer orden

El modelo contempla dos versiones, según se trate de parámetros que experimentan aumento o disminución en sus valores con el tiempo:

$$\text{Aumento, } P^* = P_0 + a(1 - e^{-k_c t}) \quad (4.18)$$

$$\text{Descenso, } P^* = P_0 + a.e^{-k_c t} \quad (4.19)$$

En ellos P_0 es una constante que representa intercepción o valor del parámetro a t_0 , a es una constante para cada parámetro que representa el máximo cambio estimado para el mismo, k_c es la tasa de cambio, y t tiempo (Taoukis y col., 1997).

El tiempo requerido para alcanzar el 50% del cambio esperado (incremento o descenso) (t_{50}) en un determinado parámetro se estima mediante la fórmula (Taoukis y col., 1997):

$$t_{50\%} = \frac{\ln 2}{k_c} \quad (4.20)$$

4.4.5. Programas informáticos

En el análisis estadístico de los datos de esta Tesis doctoral se han empleado los siguientes programas informáticos:

- Statistica versión 7.0 (StatSoft, INC, Tulsa, Okla, USA). Se ha usado para realizar los ajustes de regresión no lineales y gráficos correspondientes.
- OriginPro versión 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Se ha empleado para integrar las curvas de crecimiento DO/tiempo y obtener así las áreas correspondientes.
- Design-Expert versión 6.0 (StatEasy, INC, Minneapolis, USA). Se ha utilizado para generar y analizar los diseños de mezclas.
- Microfit 1.0 (Institute of Food Research, Norwich, UK). Se ha empleado para la obtención de los parámetros de crecimiento de los microorganismos mediante la ecuación de [Baranyi y Roberts \(1994\)](#), a partir de los datos de recuento en placa.
- SigmaPlot 11 for Windows. (Systat Software Inc. A subsidiary of Cranes Software International Ltd). Se ha utilizado para dibujar gráficas y obtener igualmente áreas bajo curvas o cinéticas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EFECTO DE LAS SALES MINERALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS EN MEDIO DE LABORATORIO

5.1.1. Efecto individual del NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂

5.1.1.1. Efecto sobre *S. cerevisiae*

Como se ha comentado en Materiales y Métodos, el estudio se realiza mediante el cálculo de las correspondientes af y la representación de estas frente al \log_{10} de la concentración de cada sal (Figura 5.1). Con posterioridad, se ajusta la ecuación de Gompertz modificada por Lambert y Pearson (2000) a estos datos, lo que permite obtener los NIC y MIC (Figura 5.2) de *S. cerevisiae* en función de las diferentes sales. El procedimiento ya ha sido utilizado por diversos autores para estimar el efecto inhibitorio de sustancias tales como conservantes, aceites esenciales, etc., sobre el crecimiento de microorganismos (Lambert y Pearson, 2000; Arroyo-López y col., 2009a).

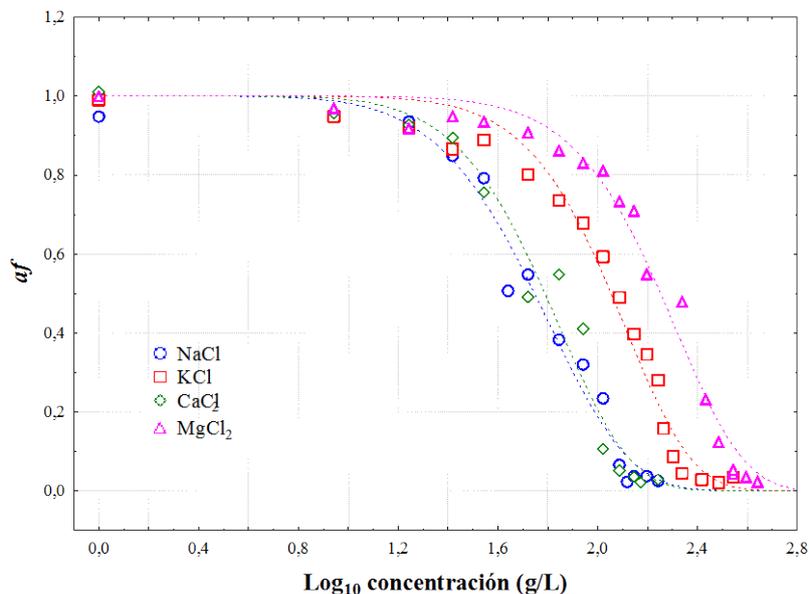


Figura 5.1. Representación de las af obtenidas para *S. cerevisiae* frente al \log_{10} de la concentración de cada sal.

Todas las curvas tienen un típico comportamiento sigmoideo de inhibición que se ajusta correctamente mediante técnicas de regresión no-lineal. Dichas curvas muestran claramente tres regiones: una primera, por debajo del NIC, en la que no se

observa un efecto inhibitor de las sales; la segunda, comprendida entre el NIC y el MIC, en la que, al aumentar las concentraciones de las sales, se produce un efecto inhibitor progresivo sobre la levadura; y una tercera, por encima del MIC, a partir de cuyo nivel no se observa desarrollo y, por tanto, se consigue una completa inhibición. Como se ha comentado anteriormente, en este caso, el NIC se relaciona con la sensibilidad de la levadura a la sal, mientras que el MIC se interpreta como la resistencia de dicho microorganismo a la misma (Lambert y Pearson, 2000).

La Tabla 5.1 muestra los valores de los NICs y MICs obtenidos para *S. cerevisiae* en función del tipo de sal empleada. El NIC varía entre 3,1%, obtenido para NaCl, y 10,5% en caso de MgCl₂, siguiendo el orden de susceptibilidad NaCl > CaCl₂ > KCl > MgCl₂, mientras que el MIC está comprendido entre el 12,2% (NaCl) y el 35,4% (MgCl₂), mostrando el siguiente orden de inhibición NaCl > CaCl₂ > KCl > MgCl₂.

Tabla 5.1. NIC y MIC (\pm desviación estándar) obtenidos para *S. cerevisiae*, en función de las diferentes sales.

	NIC (% , g/100 mL)	MIC (% , g/100 mL)
NaCl	3,1 \pm 0,2 ^{a†}	12,2 \pm 0,8 ^a
KCl	6,8 \pm 0,5 ^b	22,0 \pm 0,1 ^b
CaCl₂	3,6 \pm 0,4 ^a	12,4 \pm 0,1 ^a
MgCl₂	10,5 \pm 0,7 ^c	35,4 \pm 0,2 ^c

[†]Diferentes letras dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre los valores de las correspondientes sales (filas).

Según se puede deducir también de la Tabla 5.1 y la Figura 5.1, los NIC y MIC del CaCl₂ son estadísticamente iguales a los de NaCl, mostrando, por tanto, ambas sales efectos inhibitoros similares y de mayor intensidad. Por el contrario, los valores de NIC y MIC obtenidos para KCl son más elevados y significativamente diferentes a los de las sales anteriores, siendo necesaria aproximadamente una concentración de un 22% de KCl para evitar el crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio de laboratorio YM. El MgCl₂ es la sal con menor capacidad inhibitora sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* (significativa a $p \leq 0,05$), necesiándose, al menos, un 10,5% de la misma para comenzar a apreciarse un efecto inhibitor y requiriéndose alrededor de un 35% para impedir totalmente el crecimiento.

5.1.1.2. Efecto sobre *L. pentosus*

En general, *L. pentosus* muestra un comportamiento similar a *S. cerevisiae* frente a las sales estudiadas, tal y como se deduce de sus curvas de dosis-respuesta, aunque con diferencias cuantitativas específicas según el tipo de sal (Figura 5.2).

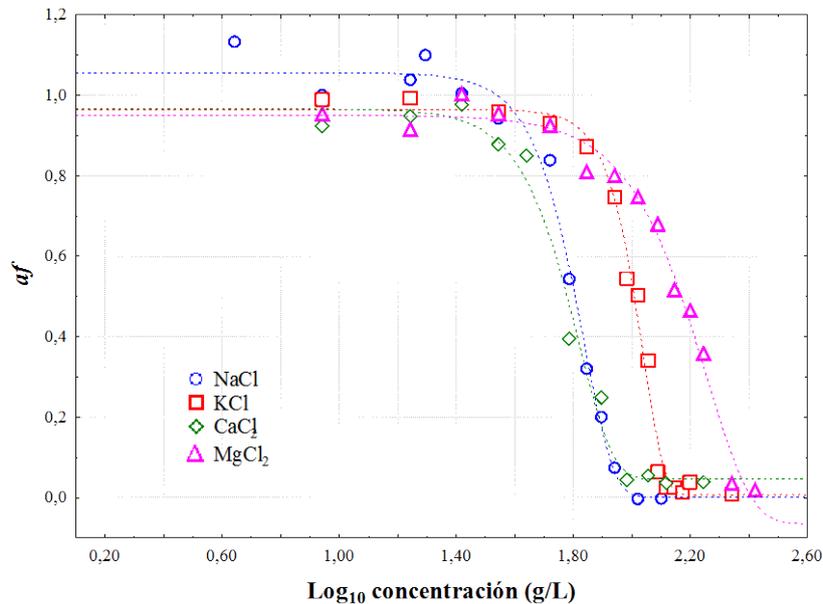


Figura 5.2. Representación de las *af* obtenidas para *L. pentosus* frente al \log_{10} de la concentración de cada sal.

Como puede deducirse de la Figura 5.2, pequeñas concentraciones de NaCl dan lugar a que el *af* tome valores por encima de 1, lo cual indica un pequeño estímulo del crecimiento con respecto a la ausencia total de sales. Este resultado está en consonancia con los datos publicados por López y col. (2006), que encontraron que valores en torno a 1,5% de NaCl producen un óptimo en el crecimiento de *L. pentosus* en medio de laboratorio MRS. En la Tabla 5.2 se muestran los valores de NICs y MICs obtenidos para *L. pentosus* según el tipo de sal empleada. De nuevo, CaCl₂ muestra unos valores de NIC y MIC estadísticamente iguales a los del NaCl. Asimismo, los datos obtenidos para KCl y MgCl₂ (especialmente) son significativamente mayores que los de NaCl y CaCl₂. Los NICs obtenidos están comprendidos en el intervalo 4,4 – 9,8% siguiendo el orden de mayor a menor susceptibilidad CaCl₂ > NaCl > KCl > MgCl₂. Sin embargo, los valores de los MICs oscilan entre 8,2 y 22,8%, siguiendo el orden de inhibición NaCl > CaCl₂ > KCl > MgCl₂.

Tabla 5.2. Valores NIC y MIC (\pm desviación estándar) obtenidos para *L. pentosus*, según las diferentes sales.

	NIC (% g/100mL)	MIC (% g/100mL)
NaCl	$5,2 \pm 0,2$ ^{a†}	$8,2 \pm 0,3$ ^a
KCl	$8,4 \pm 0,2$ ^b	$12,6 \pm 0,2$ ^b
CaCl ₂	$4,4 \pm 0,3$ ^a	$8,7 \pm 0,4$ ^a
MgCl ₂	$9,8 \pm 0,5$ ^b	$22,8 \pm 1,1$ ^{bc}

†Diferentes letras dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre los valores de las correspondientes sales (filas).

5.1.1.3. Rango de inhibición de las sales

Como se ha expuesto anteriormente, los comportamientos de *S. cerevisia* y *L. pentosus*, según las diversas sales ensayadas siguen la misma tendencia, aunque en la mayoría de los casos se obtienen NICs más elevados y MICs más bajos para *L. pentosus*. Ello indica que el rango de concentración de cada sal dentro del cual se producen los efectos inhibitorios (MIC-NIC) es más estrecho para *L. pentosus* que para *S. cerevisiae* (Figura 5.3).

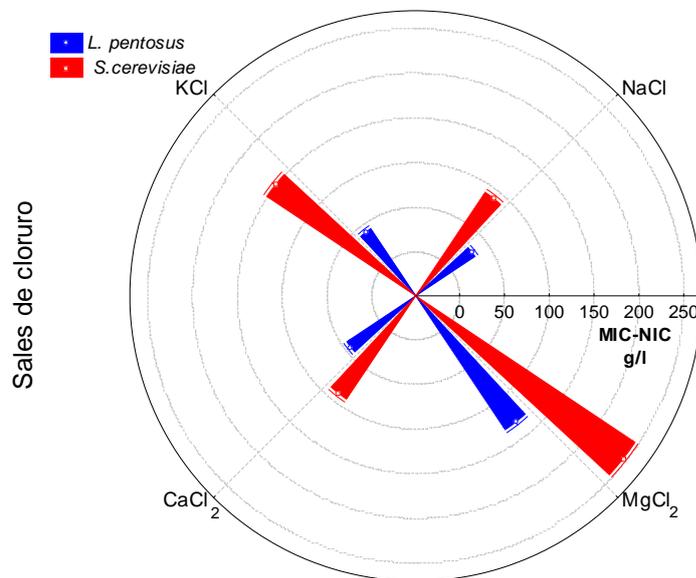


Figura 5.3. Gráfica, en coordenadas polares, mostrando la amplitud de los intervalos MIC-NIC (\pm límites de confianza) para *S. cerevisiae* (rojo) y *L. pentosus* (azul), según el tipo de sal.

Como puede deducirse claramente de la Figura 5.3, aparecen grandes diferencias en los rangos MIC-NIC obtenidos para *L. pentosus* y *S. cerevisiae*. Este intervalo es siempre inferior para *L. pentosus* comparado con *S. cerevisiae*. Para ambos microorganismos, los intervalos MIC-NIC para NaCl, KCl y CaCl₂ son relativamente similares, pero no así para MgCl₂, que es significativamente más amplio, lo que indica de nuevo que el efecto inhibitorio de esta sal es menos acusado. Como se deduce de las Tablas 5.1 y 5.2, *S. cerevisiae* es más sensible (menores NICs) a las diversas sales (excepto para MgCl₂) que *L. pentosus*, pero la levadura es más resistente (mayores MICs) y tiene, por tanto, intervalos MIC-NIC más amplios. Por el contrario, *L. pentosus* muestra los mayores NICs así como los menores MICs, por lo que sus intervalos de resistencia a las sales son más estrechos. Este comportamiento está de acuerdo con la experiencia general de que las levaduras son microorganismos muy resistentes frente a elevadas concentraciones de sal (Querol y Fleet, 2006).

Los datos sobre el efecto de las sales sobre *S. cerevisiae* y *L. pentosus* ayudan a comprender mejor el comportamiento observado en los diferentes microorganismos presentes en las fermentaciones de aceitunas de mesa. Como se ha expuesto, la acción inhibitoria del NaCl sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* comienza a detectarse aproximadamente a partir de un 3,1%, mientras que en *L. pentosus* el efecto es apreciable a niveles de alrededor del 5,2%. Por lo tanto, en muchas de las fermentaciones de aceitunas de mesa, que alcanzan en el equilibrio una concentración de NaCl en torno al 5% (Garrido Fernández y col., 1997), ambos microorganismos se verían poco afectados. Por el contrario, *S. cerevisiae* es más resistente y su inhibición requiere siempre unos niveles superiores a los de *L. pentosus*. Concentraciones del 8,5% de NaCl (suficientes para inhibir a este último) no controlarían completamente el crecimiento de la levadura, lo que solo se conseguiría con porcentajes superiores al 12,2% en el equilibrio. No es de extrañar, entonces, que en aquellos procesos en los que la concentración de NaCl supere el 8% en el equilibrio, las levaduras sean el grupo predominante, tal y como ha encontrado Panagou (2006) en aceitunas negras naturales con altos niveles de sal o Arroyo López (2007) en fermentaciones de aceitunas de mesa de la variedad Aloreña de Málaga.

5.1.2. Efecto combinado del NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂

Una vez evaluados los efectos individuales que las diferentes sales producen sobre el crecimiento global de *S. cerevisiae* y *L. pentosus*, se han estudiado detenidamente los que resultan de la combinación de dichas sales. La investigación se ha centrado, asimismo, en la cuantificación de las influencias sobre los parámetros de crecimiento (μ_{\max} , λ y N_{\max}) de ambos microorganismos. El objetivo último de este trabajo es valorar la posibilidad de sustituir total o parcialmente el NaCl utilizado durante las fermentaciones, conservación o envasado de aceitunas de mesa por otras sales que tengan unos efectos más favorables sobre la salud humana, pero de manera que, al mismo tiempo, se mantenga el adecuado control sobre los principales gérmenes involucrados en los respectivos procesos. Con la finalidad de adaptarse lo mejor posible a las prácticas habituales, el diseño experimental de mezclas D-óptimo de esta investigación se ha planificado de manera que la suma de todas las sales sea $\leq 9\%$. Este nivel es el que habitualmente se emplea en las salmueras iniciales de las fermentaciones de aceitunas de mesa de la variedad Aloreña de Málaga (Arroyo-López, 2007) y se acerca también bastante al que se utiliza en la elaboración de verdes estilo español o sevillano (Garrido Fernández y col., 1997).

5.1.2.1. Efecto sobre *S. cerevisiae*

La evolución del crecimiento de *S. cerevisiae* en los diferentes tratamientos del diseño experimental se sigue mediante recuento en placa. A partir de las curvas resultantes, se estiman los parámetros de crecimiento aplicando el modelo de Baranyi y Roberts (1994). Los valores obtenidos para dichos parámetros de crecimiento (respuestas) se han recogido en la Tabla 5.3. Posteriormente, estos datos se utilizan para encontrar el modelo (superficie de respuesta, SR) que mejor explique el efecto de las mezclas de sales sobre cada uno de los parámetros de crecimiento.

En el caso de μ_{\max} , el modelo sugerido tras el análisis de la suma secuencial de cuadrados y que proporciona un mejor ajuste es el que incluye los efectos lineales e interacciones entre las diferentes sales (variables ambientales). Dicho modelo es significativo ($p < 0,0001$) y presenta una falta de ajuste no significativa ($p = 0,335$), explicando una alta proporción de la varianza total ($R^2 = 0,881$). En la ecuación final se

han retenido también los términos necesarios para mantener el carácter jerárquico de la misma ya que, como se ha comentado anteriormente, ello es necesario para transformar las ecuaciones estimadas (en valores codificados) en las correspondientes funciones en las que las variables pueden ya sustituirse por sus valores físicos (porcentajes).

Tabla 5.3. Parámetros de crecimiento obtenidos para *S. cerevisiae*, obtenidos con el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994), según tratamientos.

Tratamiento	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	N_{\max} (log ₁₀ ufc/mL)
1	0,48 (0,02)	8,3 (0,8)	7,54 (0,04)
2	0,08 (0,01)	34,6 (8,4)	6,60 (0,10)
3	0,51 (0,02)	8,9 (0,5)	7,50 (0,02)
4*	0,29 (0,04)	11,1 (2,7)	7,33 (0,08)
5	0,55 (0,06)	7,5 (1,4)	7,47 (0,08)
6	0,56 (0,03)	6,6 (0,6)	7,55 (0,03)
7	0,53 (0,05)	8,5 (1,2)	7,18 (0,07)
8*	0,34 (0,04)	13,4 (1,9)	7,15 (0,06)
9	0,63 (0,03)	6,5 (0,4)	7,51 (0,03)
10	0,59 (0,05)	8,8 (0,4)	7,44 (0,08)
11	0,23 (0,09)	149,8 (7,9)	6,46 (0,12)
12	0,51 (0,03)	9,0 (0,6)	7,33 (0,04)
13*	0,48 (0,03)	16,4 (0,7)	7,06 (0,04)
14	0,47 (0,01)	5,9 (0,4)	7,52 (0,03)
15	0,55 (0,07)	10,5 (1,4)	7,17 (0,08)
16	0,23 (0,02)	73,6 (1,3)	6,94 (0,06)
17	0,19 (0,02)	17,6 (2,5)	6,66 (0,08)
18*	0,56 (0,02)	4,1 (0,4)	7,61 (0,02)
19*	0,59 (0,03)	4,9 (0,7)	7,59 (0,02)
20*	0,24 (0,02)	9,2 (1,2)	7,26 (0,09)
21	0,59 (0,04)	6,3 (0,7)	7,64 (0,04)
22	0,65 (0,07)	6,5 (0,8)	7,60 (0,05)
23	0,32 (0,03)	19,9 (1,0)	6,72 (0,04)
24*	0,53 (0,02)	5,8 (0,5)	7,57 (0,04)

* Tratamientos duplicados.

De este modo, la ecuación que relaciona μ_{\max} en función de los valores físicos de las sales es la siguiente:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} = & 0,570 - 0,056 * \text{NaCl} + 0,0008 * \text{KCl} - 0,036 * \text{CaCl}_2 - 0,004 * \text{MgCl}_2 + 0,001 * \text{NaCl} * \text{KCl} \\ & + 0,010 * \text{NaCl} * \text{MgCl}_2 - 0,007 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 + 0,012 * \text{CaCl}_2 * \text{MgCl}_2 \end{aligned} \quad (5.1)$$

Sin embargo, los efectos de las sales son difícilmente deducibles a partir de una expresión tan compleja como esta, por lo que para facilitar la interpretación,

generalmente, se acude a la representación de estas ecuaciones como SR (3D) o gráficas de líneas de contorno (2D), siendo estas últimas las más utilizadas. De esta manera, las gráficas de contorno obtenidas a partir de la ecuación anterior (Figura 5.4), resultan muy útiles para deducir los efectos de las sales sobre μ_{\max} y, muy especialmente, para aclarar las interacciones entre las variables. Como puede observarse en la Figura 5.4, un incremento en las cantidades de NaCl ó CaCl₂ provoca un descenso en μ_{\max} , pero la adición de ciertas proporciones de KCl o MgCl₂ aumentan el valor de dicho parámetro, especialmente cuando los porcentajes de NaCl o CaCl₂ son bajos, en cuyo caso μ_{\max} alcanza valores de 0,56 – 0,63 h⁻¹.

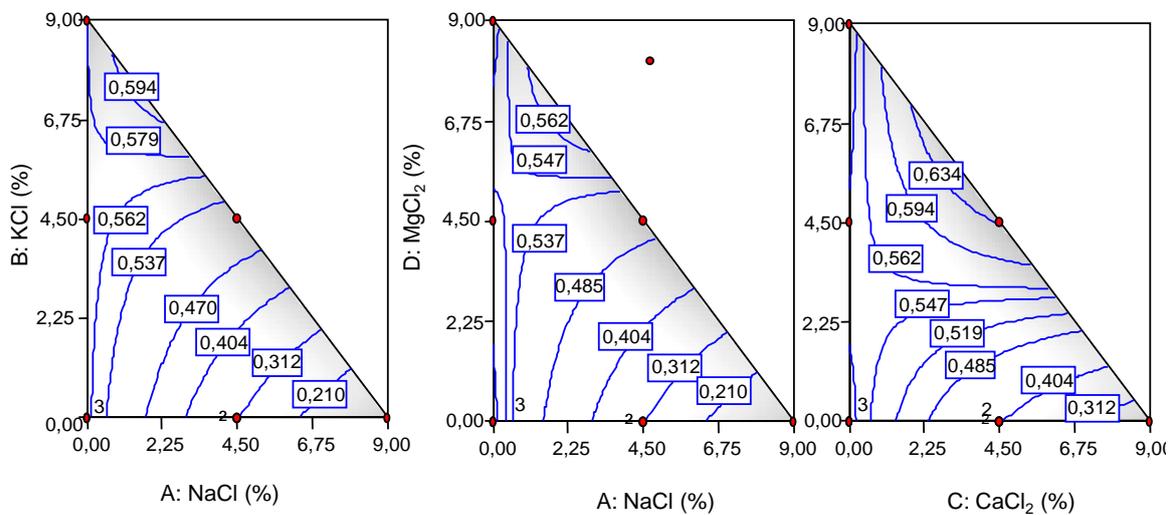


Figura 5.4. Líneas de contorno para μ_{\max} (h⁻¹) de *S. cerevisiae* en función de las mezclas binarias de las sales. Las sales no presentes en las gráficas se consideran ausentes (0% concentración).

Las gráficas de perturbación (superposición de las graficas de evolución de cada respuesta, manteniendo el resto constante y utilizando valores codificados para posibilitar la representación conjunta) también resultan muy útiles para evaluar el efecto de cada sal sobre μ_{\max} (Figura 5.5). Cuando una moderada proporción (5%) de NaCl (A) está presente en el medio (punto de referencia: 5%, 0, 0, 0), la adición de sucesivas cantidades de NaCl (A) y CaCl₂ (C) provoca un descenso en μ_{\max} , pero si las sales añadidas son MgCl₂ (D) o KCl (B), se produce un aumento en μ_{\max} (Figura 5.5), lo cual concuerda con los resultados mostrados anteriormente.

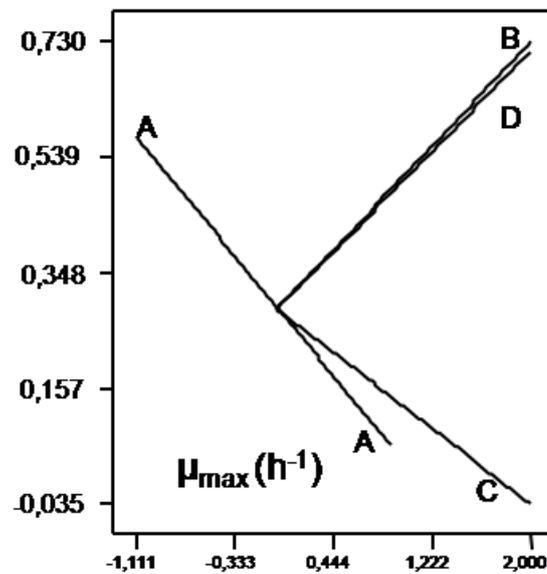


Figura 5.5. Gráfica de perturbación para μ_{\max} (h^{-1}) de *S. cerevisiae* en función de sucesivas concentraciones de NaCl (A), KCl (B), CaCl₂ (C), y MgCl₂ (D) (en valores codificados) para el punto de referencia (5, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

Como conclusión en relación con el efecto de las sales sobre este parámetro, puede afirmarse que el uso de KCl y MgCl₂, en adición al NaCl, puede favorecer el crecimiento de *S. cerevisiae* y, en consecuencia, la velocidad de fermentación o alteración (deterioro), dependiendo de la etapa de procesamiento en que se encuentre la elaboración. Sin embargo, esta levadura coexiste normalmente con las BAL y otros microorganismos y el comportamiento en fermentaciones reales debe extrapolarse con cuidado, puesto que los efectos de las salmueras correspondientes y la presencia de los frutos pueden dar lugar a comportamientos singulares.

Cuando se procede al estudio de la duración de la fase de latencia (λ), el análisis indica la necesidad de transformar este parámetro en $1/\sqrt{\lambda}$, para poder estabilizar la varianza (datos no mostrados). El modelo es significativo ($p < 0,0001$) y su falta de ajuste no significativo ($p = 0,9832$), además incluye, como en el caso anterior, los efectos lineales e interacciones entre las sales. La fase de latencia está principalmente influenciada por MgCl₂ y NaCl así como por las interacciones NaCl*CaCl₂, CaCl₂*MgCl₂ y KCl*CaCl₂, aunque las interacciones NaCl*KCl, NaCl*MgCl₂, y KCl*MgCl₂ sean también significativas.

La ecuación que expresa la duración de la fase de latencia (transformada) en función del contenido en sales (en valores físicos), tiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{\sqrt{\lambda}} = 0,449 - 0,031 * NaCl - 0,012 * KCl - 0,041 * CaCl_2 - 0,006 * MgCl_2 + 0,002 * NaCl * KCl + 0,006 * NaCl * CaCl_2 + 0,003 * NaCl * MgCl_2 - 0,004 * KCl * CaCl_2 + 0,002 * KCl * MgCl_2 + 0,008 * CaCl_2 * MgCl_2 \quad (5.2)$$

La interpretación de esta ecuación es complicada ya que la variable respuesta se encuentra transformada. Por esta razón, en la Figura 5.6 se muestran los gráficos de contorno en función de las diferentes mezclas binarias de las sales directamente para los valores físicos de λ . Como puede observarse la interacción NaCl*CaCl₂ es destacada y, para la misma concentración de NaCl, siempre existe un incremento en λ cuando los niveles de CaCl₂ aumentan. La adición de CaCl₂ a una solución que contiene previamente KCl siempre produce también un aumento en λ , pero la incorporación de MgCl₂ a soluciones con CaCl₂ provoca un descenso en este parámetro.

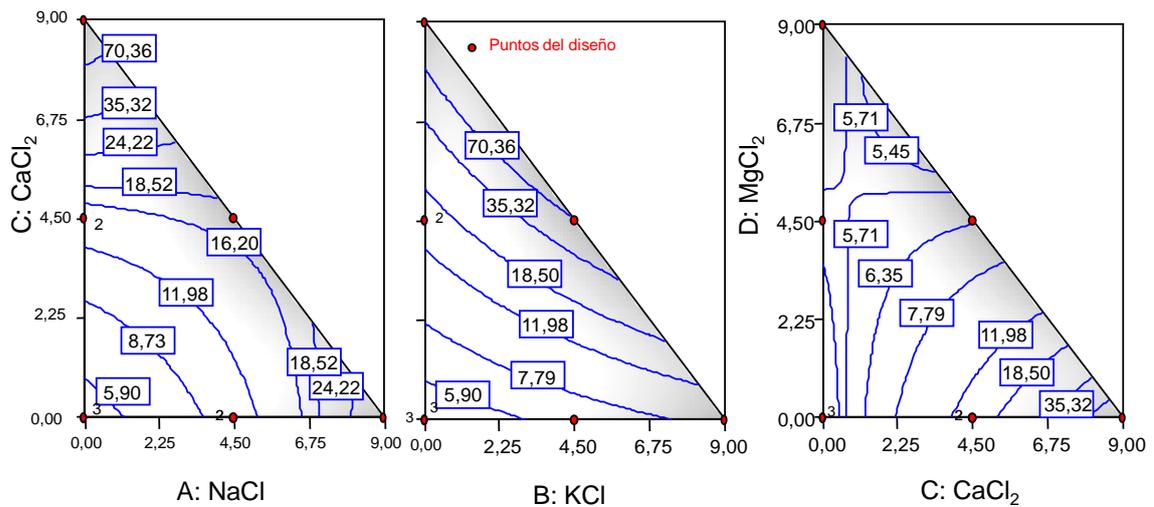


Figura 5.6. Líneas de contorno para λ (h) de *S. cerevisiae* en función de las mezclas binarias de sales. Las sales no presentes en las gráficas se consideran ausentes (0% concentración).

El efecto individual de las diversas sales se puede estudiar también en este caso mediante las gráficas de perturbación. Los efectos de las diferentes sales en presencia de una concentración inicial del 5% de NaCl (punto de referencia: 5%, 0, 0, 0) (Figura 5.7), pueden obtenerse del mismo modo que para μ_{max} . La adición de NaCl (A) y CaCl₂ (C) siempre incrementa λ , con una pendiente más pronunciada para el NaCl. El menor efecto observado para CaCl₂ (C) en presencia del 5% de NaCl (A) puede ser debido al contenido previo de NaCl (A) y a la restricción general (NaCl + CaCl₂ ≤ 9,0%), lo cual

limita la concentración adicional de CaCl_2 que puede ser añadida y, por consiguiente, su influencia. La adición de KCl (B) al medio no tiene un efecto significativo, ya que no hace variar prácticamente λ , mientras que el MgCl_2 (D) provoca un descenso en la duración de la fase de latencia.

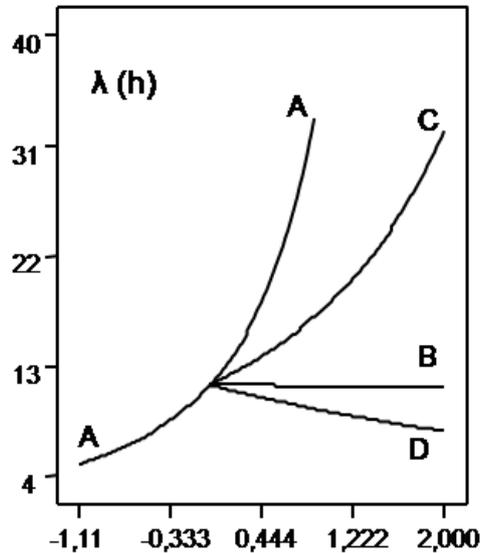


Figura 5.7. Gráfica de perturbación para λ (h) de *S. cerevisiae* en función de las concentraciones de NaCl (A), KCl (B), CaCl_2 (C), y MgCl_2 (D) (en valores codificados) para el punto de referencia (5, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

Por lo tanto, NaCl y CaCl_2 pueden ser, si fuera necesario, utilizadas de forma combinada o individual para prevenir un rápido desarrollo de *S. cerevisiae*, aumentando la duración de la fase de latencia. Esta práctica podría mejorar la estabilización de algunos vegetales fermentados tales como aceitunas o pepinillos.

El último parámetro de crecimiento analizado para *S. cerevisiae* es el máximo tamaño poblacional alcanzado, el cual oscila en todas las experiencias entre 6,46 y 7,64 \log_{10} ufc/mL. El modelo propuesto mediante la suma secuencial de cuadrados incluye, como en los casos anteriores, los efectos lineales e interacciones entre las variables. El modelo es estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y presenta una falta de ajuste no significativa ($p > 0,983$) y un R^2 de 0,932. Los efectos lineales de NaCl , KCl y CaCl_2 se introducen en aplicación del principio jerárquico, tras realizar el ajuste con la opción “backward” para la eliminación de coeficientes no significativos.

La ecuación que expresa N_{\max} en función de los valores físicos de las sales es la siguiente:

$$N_{\max} = 7,640 - 0,097 * NaCl - 0,040 * KCl - 0,126 * CaCl_2 - 0,016 * MgCl_2 + 0,016 * NaCl * MgCl_2 + 0,015 * KCl * MgCl_2 + 0,031 * CaCl_2 * MgCl_2 \quad (5.3)$$

El estudio gráfico de las tres interacciones significativas se puede realizar mediante la Figura 5.8, que representa las líneas de contorno. Se observa claramente que la adición de $MgCl_2$ a una solución que ya contiene alguna de las otras sales incrementa N_{\max} . Se pueden obtener también valores elevados de N_{\max} empleando bajas concentraciones de $NaCl$ (~2,0%), KCl (~2,25–4,60%), y $CaCl_2$ (~2,25%) y relativamente altas concentraciones de $MgCl_2$.

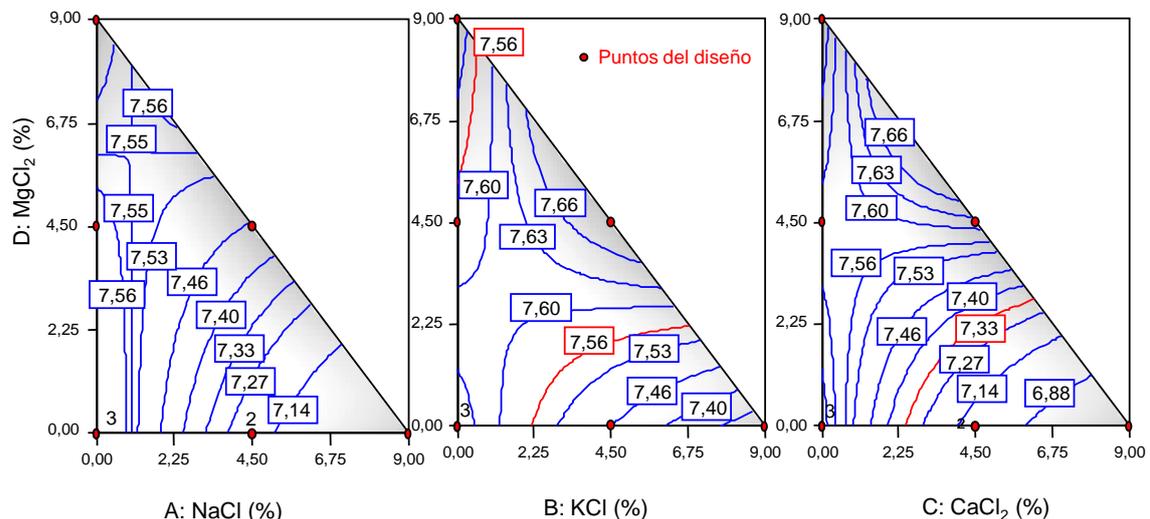


Figura 5.8. Líneas de contorno para N_{\max} (log₁₀ ufc/mL) de *S. cerevisiae* en función de las interacciones de las sales. Las sales no presentes en las gráficas se consideran ausentes (0% concentración).

N_{\max} se puede estudiar igualmente mediante gráficas de perturbación. En la Figura 5.9 se muestra el efecto de cada sal en presencia de una concentración previa del 5% de $NaCl$ (punto de referencia: 5% $NaCl$, 0, 0, 0). La población de *S. cerevisiae* se incrementa con la adición de $MgCl_2$ (D), mientras que la incorporación de cualquier otra sal al medio siempre provoca un descenso de la misma. El mayor efecto inhibitor se observa para el $CaCl_2$ (C), seguido por $NaCl$ (A), y KCl (B), que también inducen un descenso de N_{\max} , aunque menos marcado.

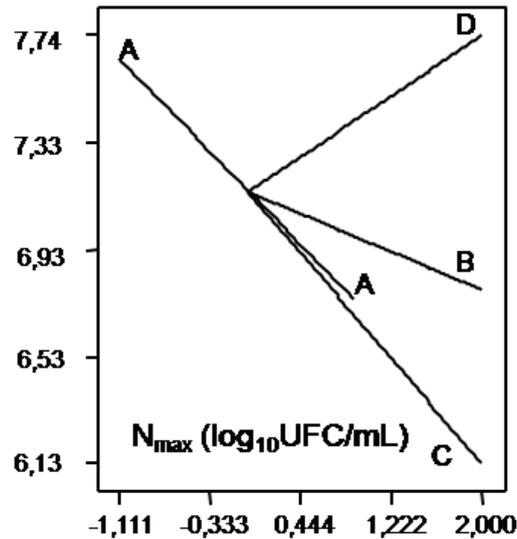


Figura 5.9. Gráfica de perturbación para N_{\max} de *S. cerevisiae* en función de las concentraciones de NaCl (A), KCl (B), CaCl₂ (C), y MgCl₂ (D) (en valores codificados) para el punto de referencia (5, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

Aunque las levaduras forman parte de la microbiota natural de las fermentaciones de aceitunas de mesa, el efecto de una gran población de *S. cerevisiae* sobre las características fisicoquímicas y organolépticas del producto no ha sido estudiado aun (Garrido Fernández y col., 1997). Una elevada concentración de esta levadura fermentativa podría dañar los frutos según comentan Arroyo López y col. (2008b).

Finalmente, la Tabla 5.4 muestra los índices de validación A y B obtenidos para μ_{\max} , λ y N_{\max} de *S. cerevisiae* a partir de los experimentos de validación realizados en unas condiciones ambientales diferentes a las incluidas originariamente en el diseño experimental (concentraciones de sales no previstas en el mismo). Los mejores resultados se obtienen para N_{\max} (A y B ~ 1), mientras que el factor de sesgo de μ_{\max} (B = 1,154; el modelo predice para este parámetro por exceso) es ligeramente superior a la unidad. Globalmente, los valores son aceptables, de acuerdo con la literatura al respecto (Baranyi y col., 1999). Por lo tanto, los modelos obtenidos se pueden utilizar, dentro de la región experimental, para realizar predicciones sobre los parámetros de crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de diferentes combinaciones de NaCl, KCl, CaCl₂, y MgCl₂.

Tabla 5.4. Factores de exactitud (*A*) y sesgo (*B*) (Baranyi y col., 1999) obtenidos para μ_{\max} , λ y N_{\max} de *S. cerevisiae* a partir de los experimentos de validación.

Índice	μ_m	λ	N_{\max}
<i>A</i>	1,030	1,054	1,000
<i>B</i>	1,154	0,934	0,900

5.1.2.2. Efecto sobre *L. pentosus*

El mismo tipo de diseño experimental utilizado para *S. cerevisiae* se aplica también a *L. pentosus*, pero esta vez en medio de crecimiento de laboratorio MRS líquido.

En ausencia de sales, μ_{\max} toma valores entre 0,60 y 0,70 h⁻¹, mientras que los máximos se obtienen en las experiencias 2 y 10 con 0,85 y 0,77 h⁻¹, respectivamente (Tabla 5.5). Dichas experiencias contienen un 4,5% de KCl, por lo que, aparentemente, bajos niveles de esta sal tienen un efecto estimulante sobre la velocidad de crecimiento de *L. pentosus*. Otros autores también han encontrado un resultado similar para bajas concentraciones de NaCl (~2%) (Delgado y col., 2005; López y col., 2006), aunque en este estudio no se observa esa actividad. En aquellas experiencias en las que no hay crecimiento (tratamientos 3, 13 y 19), en las cuales la concentración total de sal es del 9%, μ_{\max} y λ se consideraron como 0,00 h⁻¹ y 220 h, con el fin de poder obtener los modelos secundarios para estos parámetros.

El modelo sugerido para μ_{\max} por la suma secuencial de cuadrados incluye los términos lineales y cuadráticos de las variables ambientales (sales). El ANOVA muestra que dicho modelo es significativo ($p < 0,001$), tiene una falta de ajuste no significativa ($p < 0,212$) y explica una elevada proporción de la varianza total ($R^2 = 0,915$). Además de la intercepción, también se retienen todos los coeficientes lineales para las sales así como el término cuadrático para KCl. La ecuación matemática que representa μ_{\max} de *L. pentosus* en función de los valores físicos (porcentajes) de las sales es la siguiente:

$$\mu_{\max} = 0,712 - 0,090 * NaCl + 0,070 * KCl - 0,061 * CaCl_2 - 0,043 * MgCl_2 - 0,012 * KCl^2 \quad (5.4)$$

Tabla 5.5. Parámetros de crecimiento de *L. pentosus*, obtenidos con el modelo primario de Baranyi y Roberts (1994), según tratamientos.

Tratamiento	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	N_{\max} (log ₁₀ ufc/mL)
1	0,44 (0,05)	27,0 (1,2)	8,44 (0,09)
2*	0,85 (0,06)	16,5 (0,5)	8,63 (0,02)
3	0,00 (--)	220 (--)	2,50 (0,00)
4	0,41 (0,06)	21,7 (1,3)	8,36 (0,08)
5*	0,27 (0,02)	25,2 (1,3)	8,71 (0,07)
6	0,16 (0,03)	131,2 (3,8)	7,48 (0,10)
7	0,22 (0,01)	33,2 (1,1)	6,93 (0,04)
8	0,36 (0,02)	32,0 (0,7)	8,46 (0,05)
9*	0,62 (0,11)	14,7 (1,9)	8,48 (0,06)
10*	0,77 (0,16)	14,1 (1,4)	8,56 (0,02)
11	0,39 (0,03)	21,8 (1,1)	7,89 (0,06)
12	0,11 (0,04)	160,8 (12,0)	7,01 (0,33)
13	0,00 (--)	220 (--)	4,23 (0,00)
14*	0,49 (0,03)	13,5 (0,7)	8,34 (0,04)
15	0,31 (0,01)	18,9 (0,4)	8,16 (0,02)
16*	0,64 (0,02)	12,7 (0,2)	8,64 (0,01)
17	0,37 (0,06)	44,5 (1,5)	8,12 (0,08)
18	0,47 (0,31)	25,2 (2,8)	7,51 (0,09)
19	0,00 (--)	220 (--)	3,77 (0,00)
20*	0,67 (0,06)	4,6 (0,4)	8,77 (0,02)
21*	0,70 (0,04)	5,0 (0,2)	8,72 (0,01)
22*	0,22 (0,01)	17,2 (1,4)	8,24 (0,06)
23	0,62 (0,14)	12,4 (2,5)	8,64 (0,10)
24*	0,54 (0,07)	11,3 (1,6)	8,81 (0,10)
25	0,37 (0,06)	40,6 (1,8)	7,41 (0,05)
26*	0,61 (0,05)	9,6 (0,8)	8,63 (0,06)

Nota: Desviación estándar entre paréntesis.* Tratamientos duplicados.

Dicha ecuación puede ser utilizada para predecir la máxima velocidad de crecimiento de *L. pentosus* en función de diferentes combinaciones de las variables ambientales (sales). La interpretación del efecto cuadrático de KCl merece una especial atención, sobre todo en combinación con las sales de NaCl y MgCl₂ (Figura 5.10). Una concentración de KCl cercana a 2,75 – 3,00% da lugar a un claro incremento sobre μ_{\max} de *L. pentosus*, la cual decrece marcadamente cuando aumenta la concentración de NaCl o MgCl₂. Los valores de μ_{\max} en presencia de NaCl son siempre inferiores a los que se

dan cuando la sal es MgCl_2 . Tsapatsaris y Kotzekidou (2004) también encontraron que *L. plantarum* mostraba su máxima velocidad de crecimiento en zumo de aceitunas negras suplementado con KCl.

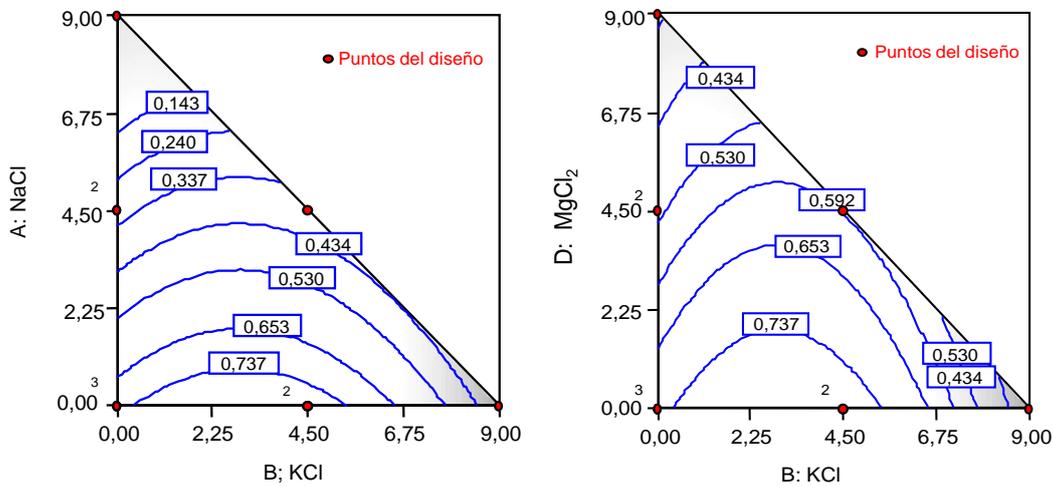


Figura 5.10. Líneas de contorno para μ_{\max} (h^{-1}) de *L. pentosus* en función de las diferentes mezclas binarias del KCl frente a NaCl y MgCl_2 . Las sales no presentes en las gráficas se consideran ausentes (0% concentración).

En cuanto a las gráficas de perturbación, cuando una moderada proporción de NaCl (5%) se encuentra ya en el medio, la adición de sucesivas concentraciones de esta sal (A) produce los mayores efectos inhibitorios sobre *L. pentosus*, alcanzándose los menores μ_{\max} , mientras que la adición de KCl (B) muestra un evidente efecto cuadrático (Figura 5.11). De nuevo, estos resultados indican que moderadas concentraciones de KCl pueden estimular el crecimiento de *L. pentosus* en medio MRS de laboratorio. Después de NaCl (A), la siguiente sal que presenta los mayores efectos inhibitorios es CaCl_2 (C) seguida de MgCl_2 (D).

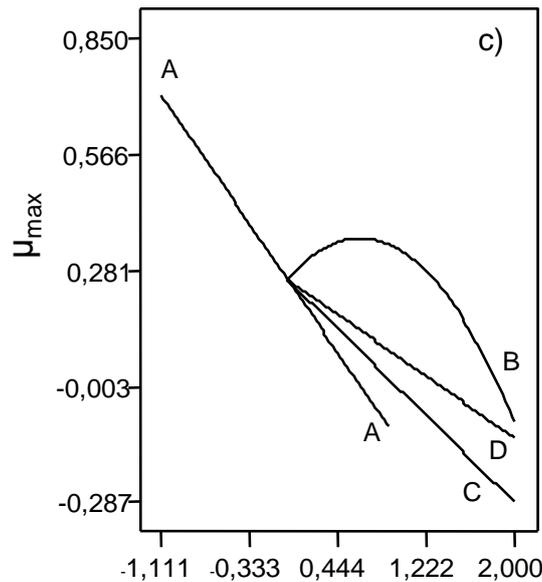


Figura 5.11. Gráfica de perturbación para μ_{\max} (h^{-1}) de *L. pentosus* en función de las concentraciones de NaCl (A), KCl (B), CaCl_2 (C), y MgCl_2 (D) a partir del punto de referencia (5%, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

La fase de latencia (λ) de *L. pentosus* varía entre las 4,58 y 4,95 h de las experiencias 20 y 21 (ausencia de sal) y las 220 h de las experiencias 3, 13 y 19 (9% de NaCl) (Tabla 5.5). En el análisis de esta respuesta es, asimismo, necesaria la transformación de la variable λ en $1/\sqrt{\lambda}$ para estabilizar la varianza. El modelo sugerido por el análisis de la suma secuencial de cuadrados de la variable transformada incluye los coeficientes para los efectos lineales e interacciones de las variables ambientales. El ANOVA muestra que dicho modelo es significativo ($p < 0,0001$), tiene una falta de ajuste no significativa ($p = 0,802$) y explica una alta proporción de la varianza total ($R^2 = 0,879$). El modelo retiene inicialmente los coeficientes lineales para NaCl y CaCl_2 así como la interacción $\text{KCl} * \text{MgCl}_2$. Posteriormente, se introducen los términos lineales correspondientes a KCl y MgCl_2 en aplicación del principio de jerarquía.

La ecuación para este parámetro en términos de valores físicos es la siguiente:

$$\frac{1}{\sqrt{\lambda}} = 0,399 - 0,039 * \text{NaCl} - 0,023 * \text{KCl} - 0,031 * \text{CaCl}_2 - 0,023 \text{MgCl}_2 + 0,005 * \text{KCl} * \text{MgCl}_2 \quad (5.5)$$

La interpretación de la ecuación para el parámetro transformado $1/\lambda$ es complicada; sin embargo, el efecto de las sales puede ser deducido directamente, como en casos anteriores, a partir de las líneas de contorno. La Figura 5.12 muestra el correspondiente a las combinaciones de KCl (B) y $MgCl_2$ (D). En ella se muestra claramente el efecto de la interacción significativa $KCl * MgCl_2$. El mínimo periodo de latencia (~ 6 h) se detecta en ausencia de cualquiera de las dos sales, pero λ aumenta lentamente alcanzando un máximo ($\sim 11,5$ h) en la línea que une iguales concentraciones de ambas sales (Figura 5.12). No obstante, cuando se incrementan las concentraciones de KCl (B) y $MgCl_2$ (D) de manera no equilibrada (niveles más elevados de una de ellas), existe un mayor incremento del periodo de latencia ($\sim 18,5$ h en los extremos), aunque sus valores son siempre marcadamente menores a los observados para la adición de NaCl (A) o $CaCl_2$ (C). De esta manera, si se aumentan las concentraciones de KCl (B) y $MgCl_2$ (D) en el medio, siempre se produce un aumento en λ , pero el efecto puede ser reducido si se mantiene un equilibrio entre los niveles de ambas sales.

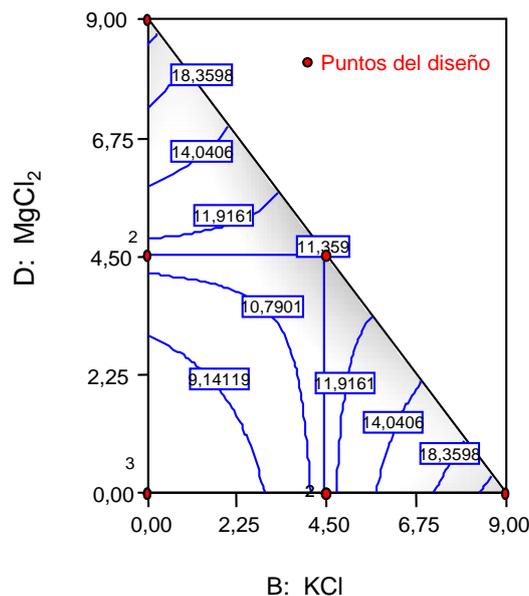


Figura 5.12. Líneas de contorno para λ (h) de *L. pentosus* en función de diferentes mezclas binarias de KCl y $MgCl_2$. Las sales no presentes en las gráficas se consideran ausentes (0% concentración).

La gráfica de perturbación para este parámetro sin transformar (Figura 5.13), muestra la contribución de las diversas sales a la duración del periodo de latencia de *L.*

pentosus (tomando esta vez la ausencia de sales (0, 0, 0, 0) como punto de referencia). La fase de latencia está principalmente influenciada por la presencia de NaCl (A), de manera que altas concentraciones de este compuesto (por encima del 5%) incrementan exponencialmente la duración de la misma (Figura 5.13). Balatsouras (1985) estudia la influencia que tiene la concentración de NaCl sobre el crecimiento de varias cepas de *Lactobacillus* aisladas de fermentaciones de aceitunas de mesa, encontrando que el número de cepas que crece va aumentando a medida que la proporción de NaCl disminuye del 9% al 6%. Rao y col. (2004) muestran, por otra parte, que altas concentraciones de NaCl disminuyen la velocidad de crecimiento y aumentan la duración de la fase de latencia de varias cepas de *Lactobacillus*. La presencia de altos niveles de CaCl_2 (C) también produce un marcado incremento de λ . Sin embargo, este parámetro se ve poco influenciado por la adición de KCl (B) o MgCl_2 (D). El incremento observado en este trabajo en la duración de la fase de latencia de *L. pentosus* por la adición de CaCl_2 podría resultar muy útil para estabilizar productos vegetales fermentados que sufren deterioro a causa de una acidificación de tipo láctico, como ocurre durante el periodo de comercialización de aceitunas de mesa de la variedad Aloreña de Málaga (Arroyo López y col., 2005).

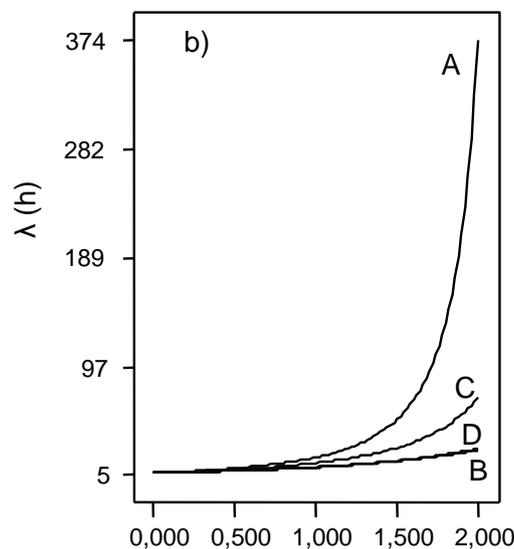


Figura 5.13. Gráfica de perturbación de la fase de latencia (h) de *L. pentosus* en función de sucesivas concentraciones de NaCl (A), KCl (B), CaCl_2 (C), y MgCl_2 (D) a partir del punto de referencia (0, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

Por último, se muestra el efecto que las sales ejercen sobre el tamaño máximo poblacional alcanzado por *L. pentosus* en medio de laboratorio. Este parámetro oscila entre 7,01 log₁₀ ufc/mL de la experiencia 12 (con la mayor concentración de MgCl₂, 9%) y 8,63 – 8,77 log₁₀ ufc/mL de las experiencias 20, 21 y 26 (en ausencia de cualquier sal, 0%). Las experiencias 3, 13 y 19 muestran siempre un descenso respecto al tamaño del inóculo inicial (que es 4,29 log₁₀ ufc/mL), lo cual indica que *L. pentosus* no puede crecer cuando el nivel de sal es del 9%. El modelo propuesto por la suma secuencial de cuadrados incluye solo términos lineales, mostrando el ANOVA que el modelo es significativo pero presenta una falta de ajuste significativa ($p=0,000$) y una varianza total explicada relativamente baja, $R^2 = 58,55\%$. Por tanto, los resultados de este ajuste deben interpretarse con precaución. Los coeficientes retenidos corresponden únicamente a los efectos lineales de NaCl y CaCl₂.

La ecuación de predicción, en términos de valores físicos, es la siguiente:

$$N_{\max} = 8,91 - 0,52 * NaCl - 0,24 * CaCl_2 \quad (5.6)$$

Dicha ecuación muestra que la adición de NaCl y CaCl₂ siempre provoca una reducción sobre N_{\max} de *L. pentosus*, siendo mayor el efecto debido a NaCl. En experiencias llevadas a cabo por [Mulè y col. \(2000\)](#) con aceitunas verdes colocadas directamente en salmuera, la sustitución parcial de NaCl con KCl y CaCl₂ no afecta a la población final de BAL, pero si a la población de levaduras que es más elevada cuando se añade solo KCl. [Viander y col. \(2003\)](#) informan de efectos similares a los encontrados en este trabajo en la población de BAL de chucrut (o col agria fermentada en salmuera).

Por otra parte las gráficas de perturbación muestran que cuando una cierta proporción de NaCl está presente en el medio (punto de referencia: 5%, 0, 0, 0), la nueva adición de NaCl (A) siempre provoca un mayor efecto inhibitorio sobre N_{\max} que el que se observa para CaCl₂ (C), como puede deducirse a partir del gráfico de perturbación (Figura 5.14). Estos resultados están en concordancia con los mayores coeficientes obtenidos en este trabajo para NaCl en *L. pentosus*. Sin embargo, [Naewbanij y col. \(1986\)](#) muestran que para la especie *L. plantarum* en fermentaciones de pepinillos las sales que favorecen menos el crecimiento son MgCl₂ y CaCl₂.

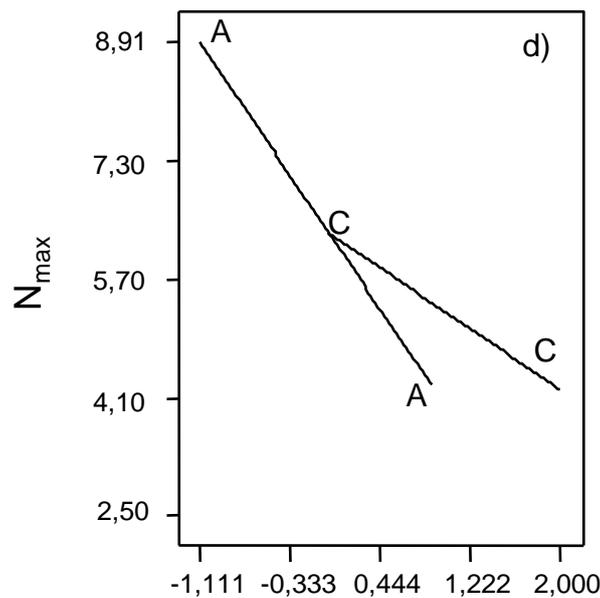


Figura 5.14. Gráfica de perturbación para N_{\max} (\log_{10} ufc/mL) de *L. pentosus* en función de sucesivas concentraciones de NaCl (A) y CaCl_2 (C) a partir del punto de referencia (5, 0, 0, 0). Los efectos están expresados como desviaciones desde el punto de referencia.

Para llevar a cabo las experiencias de validación, se eligen igualmente condiciones experimentales diferentes a las utilizadas en el diseño, aunque siempre dentro de la correspondiente región experimental. Los resultados muestran que los mejores índices se obtienen para los parámetros de crecimiento μ_{\max} y N_{\max} (Tabla 5.6). De este modo, A y B para μ_{\max} y N_{\max} son relativamente cercanos a 1. Sin embargo, uno de los valores obtenidos para λ es moderadamente elevado.

Diversos autores mencionan que las manipulaciones previas del cultivo antes de su inoculación, así como la propia adaptación del microorganismo a las condiciones ambientales, originan dificultades a la hora de deducir correctamente los modelos correspondientes a este parámetro (McMeekin y col., 1993; Swinnen y col., 2004). En general, los valores encontrados en las experiencias de validación pueden ser considerados razonables y los modelos obtenidos adecuados para realizar predicciones de los parámetros de crecimiento de *L. pentosus* en función de diversas combinaciones de las sales.

Tabla 5.6. Factores de exactitud (*A*) y sesgo (*B*) (Baranyi y col., 1999) obtenidos para μ_{\max} , λ y N_{\max} de *L. pentosus* a partir de los experimentos de validación.

Índice	μ_m	λ	N_{\max}
<i>A</i>	1,094	1,360	1,084
<i>B</i>	1,091	1,017	1,012

5.1.3. Efecto del ZnCl₂ sobre el crecimiento de levaduras

5.1.3.1. Susceptibilidad y resistencia de las levaduras frente a ZnCl₂

Para llevar a cabo este estudio se emplean de nuevo medidas de la DO y la metodología de las *af*. La Figura 5.15 muestra, como ejemplo, la curva de DO para *C. diddensiae* Y1 en función del tiempo, según las distintas concentraciones ensayadas de ZnCl₂ (de 0 a 250 mg/L). Como puede observarse, el área bajo la curva descende cuando se incrementa la concentración de ZnCl₂. De este modo, un aumento en la concentración de ZnCl₂ produce una reducción en el valor máximo de DO alcanzado y también en la tasa de crecimiento (deducida a partir de la pendiente de la curva). Este hecho es especialmente evidente en esta cepa para concentraciones de ZnCl₂ por encima de 180 mg/L. El resto de levaduras estudiadas siguen una tendencia similar.

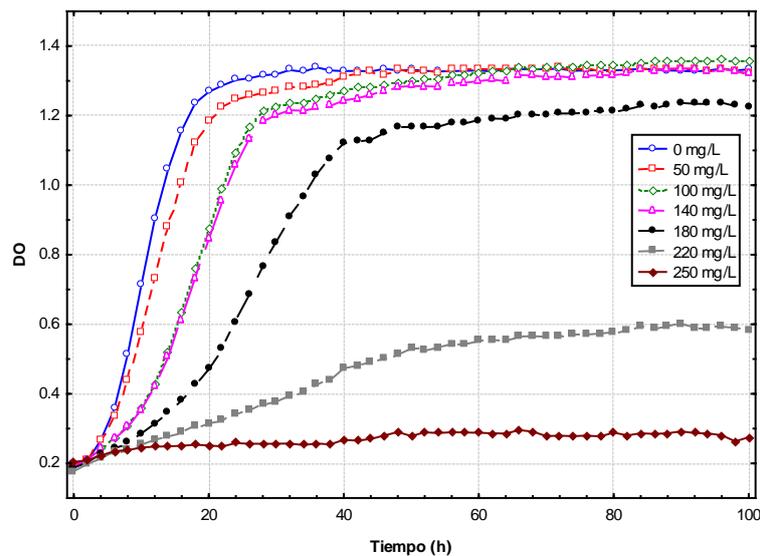


Figura 5.15. Representación gráfica de las medidas de DO en función del tiempo para *C. diddensiae* Y1, según una selección de concentraciones de ZnCl₂.

La Figura 5.16 muestra, como un segundo ejemplo de la metodología empleada, el ajuste de la curva del af de *S. cerevisiae* Y30 en función de la concentración de $ZnCl_2$. Como en el caso anterior, la gráfica de af frente a las concentraciones de $ZnCl_2$ presenta una forma sigmoidea. En consecuencia, la respuesta de la levadura frente al $ZnCl_2$ tiene una relación no lineal con la dosis y, como en el caso de las otras sales anteriormente estudiadas puede ser dividida en tres secciones: i) puntos correspondientes a concentraciones entre 0 y el valor NIC (concentración a la que comienza a observarse el efecto inhibitor y el af está cercano a 1); ii) concentraciones entre los valores NIC y MIC (dentro de los cuales tiene lugar una progresiva inhibición y las af descienden); y iii) por encima de los valores MIC (donde no se registra crecimiento en comparación con el control y las af se aproximan a 0). El ajuste a estos datos de la ecuación de Gompertz modificada es bueno no solo para esta levadura sino también para el resto de las incluidas en el presente estudio (un total de 66: 22 cepas por triplicado), con un R^2 entre 0,972 y 0,999.

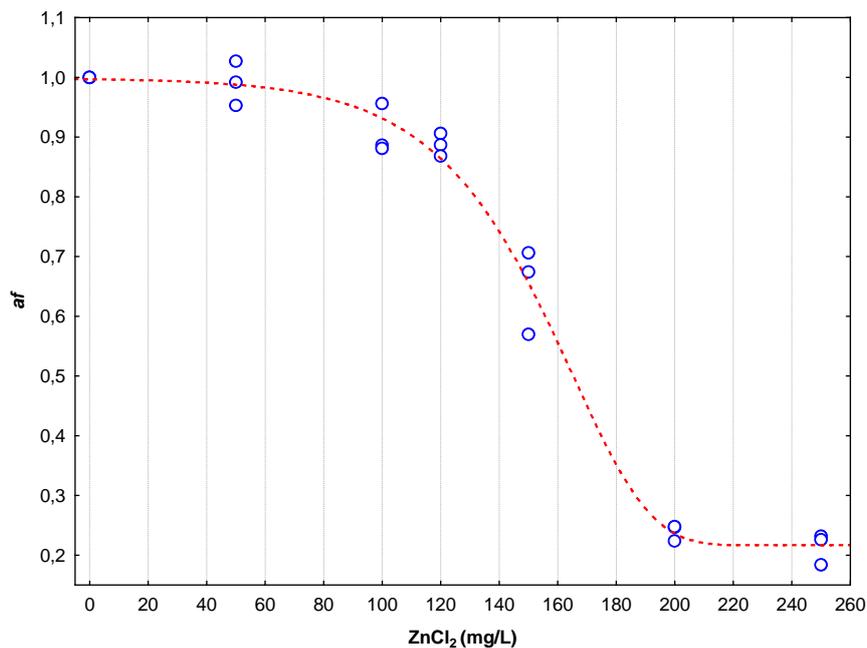


Figura 5.16. Representación de las áreas fraccionales (af) obtenidas para *S. cerevisiae* Y30 en función de la concentración de $ZnCl_2$ y ajuste, mediante regresión no lineal, de la ecuación de Gompertz modificada.

La Tabla 5.7 muestra los valores NIC y MIC obtenidos para todas las cepas estudiadas mediante esta metodología. Los datos son medias de los triplicados

realizados, ajustados independientemente. Los valores de NIC (relacionados con la susceptibilidad de las levaduras a la sal de Zn) se encuentran entre 22 mg/L (*D. etchellsii* Y24) y 178 mg/L (*C. diddensiae* Y1), mientras que los valores MIC (relacionados con la resistencia de las levaduras a dicho compuesto) oscilan entre 84 mg/L (*W. anomalus* Y11 y *C. diddensiae* Y26) y 238 mg/L (*C. diddensiae* Y1). Aplicando a estos datos el test de Scheffé para comparaciones “post-hoc” múltiples, se obtienen 9 grupos homogéneos diferentes para ambos parámetros (NIC y MIC) (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Valores medios de NIC y MIC, y rango de resistencia, para las 22 cepas de levaduras estudiadas. Entre paréntesis se muestra el error estándar de cada estimación.

Cepa levadura	NIC (mg/L)	MIC (mg/L)	Rango resistencia (mg/L) (MIC-NIC)
Y10	113 (6) ^{g,h}	157 (5) ^{e,f}	44 (6) ^{a,b,c,d,e}
Y2	129 (4) ^h	221 (8) ^{h,i}	92 (7) ^{e,f,g,h}
Y11	44 (3) ^{a,b,c}	84 (1) ^a	40 (2) ^{a,b,c,d,e}
Y12	121 (2) ^{g,h}	154 (2) ^{e,f}	33 (2) ^{a,b,c,d}
Y24	22 (16) ^a	98 (11) ^{a,b}	76 (15) ^{d,e,f,g,h}
Y25	80 (17) ^{c,d,e,f,g}	100 (17) ^{a,b}	20 (0) ^{a,b,c}
Y3	50 (2) ^{a,b,c,d,e}	117 (2) ^{b,c}	67 (2) ^{b,c,d,e,f,g,h}
Y6	90 (0) ^{d,e,f,g,h}	200 (0) ^{g,h}	110 (0) ^{f,g,h}
Y26	69 (10) ^{b,c,d,e,f}	84 (1) ^a	15 (7) ^{a,b}
Y1	178 (5) ⁱ	238 (12) ⁱ	60 (10) ^{a,b,c,d,e,f,g}
Y15	31 (3) ^{a,b}	151 (4) ^e	120 (2) ^h
Y27	96 (6) ^{e,f,g,h}	154 (1) ^{e,f}	58 (4) ^{a,b,c,d,e,f}
Y28	126 (4) ^h	148 (1) ^{d,e}	22 (3) ^{a,b,c}
Y31	80 (10) ^{c,d,e,f,g}	110 (0) ^{a,b}	30 (6) ^{a,b,c,d}
Y29	56 (1) ^{a,b,c,d,e}	103 (2) ^{a,b}	47 (1) ^{a,b,c,d,e}
Y17	36 (25) ^{a,b,c}	150 (0) ^{d,e}	114 (14) ^{g,h}
Y13	107 (6) ^{f,g,h}	160 (1) ^{e,f}	53 (3) ^{a,b,c,d,e}
Y4	95 (0) ^{e,f,g,h}	102 (0) ^{a,b}	7 (0) ^a
Y18	95 (2) ^{e,f,g,h}	120 (2) ^{b,c,d}	25 (1) ^{a,b,c,d}
Y30	113 (6) ^{g,h}	184 (6) ^{f,g}	71 (6) ^{c,d,e,f,g,h}
Y32	120 (0) ^{g,h}	157 (5) ^{e,f}	37 (3) ^{a,b,c,d}
Y36	121 (9) ^{g,h}	142 (5) ^{c,d,e}	21 (4) ^{a,b,c}

Nota: Los valores de las columnas seguidos por diferentes letras o grupos de ellas son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$), de acuerdo al test de Scheffe para comparaciones post-hoc.

La Figura 5.17 muestra el rango de concentración del compuesto dentro del cual se observa el efecto inhibitorio para las diferentes levaduras. *C. diddensiae* Y1 y *W. anomalus* Y2 tienen los valores NIC y MIC más altos, por lo que ambas cepas son las más resistentes a altas concentraciones de $ZnCl_2$. Por el contrario, las cepas *D. etchellsii* Y24, *W. anomalus* Y11 y *C. diddensiae* Y26 son muy sensibles a esta sal. En cualquier caso, concentraciones tan bajas como 250 mg/L de $ZnCl_2$ evitan el crecimiento de todas las levaduras analizadas en medio de laboratorio YM. En algunos casos específicos, el rango de inhibición del $ZnCl_2$ es muy estrecho. Por ejemplo, los valores NIC y MIC para *S. cerevisiae* Y4 y *C. diddensiae* Y26 están separados por solo 7 y 16 mg/L, respectivamente. Sin embargo, los rangos de inhibición para las cepas *P. galeiformis* Y15 y *C. sorbosivorans* Y17 son más amplios, 120 y 113 mg/L, respectivamente (Tabla 5.7 y Figura 5.17).

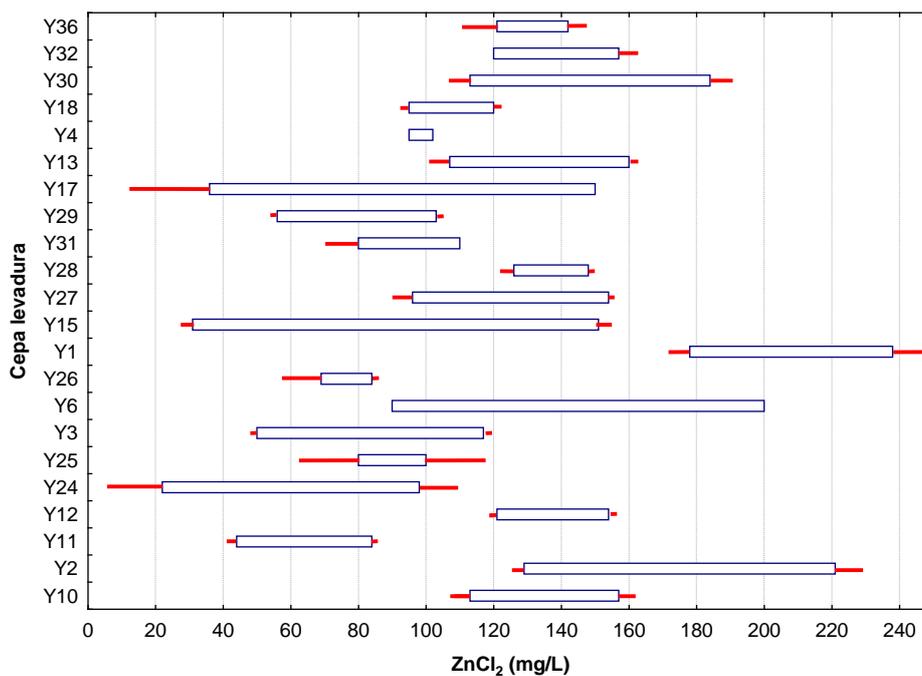


Figura 5.17. Rango (MIC- NIC) de inhibición de $ZnCl_2$ para las 22 cepas estudiadas. El error estándar se indica mediante líneas continuas rojas.

No se encuentra una tendencia consistente con respecto a los valores NIC y MIC, y ambos parámetros muestran una gran dispersión dentro de la misma especie. Así, el rango de los niveles de NIC para las cepas de *S. cerevisiae* oscilan entre 95 y 107 mg/L, los de las cepas de *W. anomalus* entre 44 y 129 mg/L, y los de las cepas de *P. galeiformis* entre 31 y 126 mg/L. En el caso de MIC, los valores para este parámetro

fluctúan entre 102 y 184 mg/L, entre 84 y 221 mg/L, y de 148 a 154 mg/L para *S. cerevisiae*, *W. anomalus* y *P. galeiformis*, respectivamente. Por tanto, aparentemente, la susceptibilidad y la resistencia al $ZnCl_2$ están relacionadas más con la cepa que con la especie.

5.1.3.2. Respuesta de las levaduras por encima del valor MIC

Se ha investigado también el efecto que niveles de $ZnCl_2$ por encima de los MIC correspondientes produce sobre cada levadura. Para ello, se han elegido tres concentraciones de $ZnCl_2$ superiores al MIC (250, 500 y 1000 mg/L) con objeto de determinar si este compuesto solo evita el crecimiento de las levaduras o, por el contrario, hace descender el número inicial de células viables y, por consiguiente, provoca la muerte de las mismas. La Figura 5.18 muestra la respuesta de *C. diddensiae* Y1 frente a los tres niveles de $ZnCl_2$. El número de células viables de la cepa Y1 desciende de manera clara y dicha inhibición se puede ajustar mediante la ecuación de Weibull. El efecto es mayor a medida que aumenta la concentración de $ZnCl_2$ en el medio. Del mismo modo, el tiempo para la primera reducción decimal de esta levadura (que representa una disminución del 90% del inóculo inicial), es 19,08, 13,95 y 15,53 h para 250, 500 y 1000 mg/L de $ZnCl_2$, respectivamente. Para otras levaduras, el descenso es, incluso, más acusado.

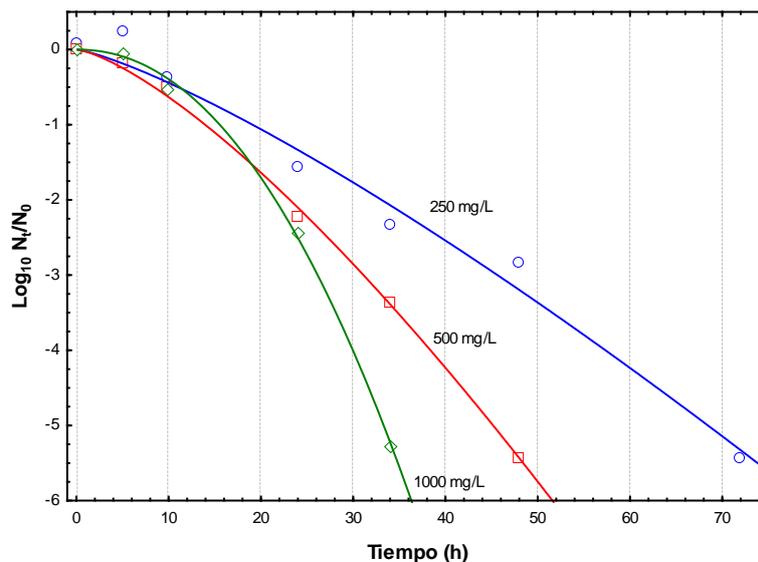


Figura 5.18. Ajuste del modelo de Weibull mediante regresión no lineal para el estudio de la inhibición de *C. diddensiae* Y1 en presencia de 250, 500 y 1000 mg/L de $ZnCl_2$.

La Tabla 5.8 muestra los parámetros de Weibull obtenidos para todas las cepas estudiadas. Los valores son medias de experiencias duplicadas, analizadas independientemente. Se ha obtenido siempre un buen ajuste, con R^2 que oscila entre 0,943 y 0,999. Para las cepas *P. membranifaciens* Y31 y *C. boidinii* Y13, se obtiene una reducción significativa para D_β entre 250 y 500 mg/L de $ZnCl_2$. La tabla también muestra que en, algunos casos (cepas *W. anomalus* Y10 y Y11, *I. occidentalis* Y3, *I. orientalis* Y6, y *P. galeiformis* Y15 y Y27), la evolución a la concentración inferior estudiada (250 mg/L) no se aprecia una reducción de la población inicial ($\sim 10^6$ células/ml). Sin embargo, en el nivel más elevado (1000 mg/L), siempre se observa una clara disminución para todas las levaduras.

Tabla 5.8. Estudio de supervivencia de las levaduras a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/L de $ZnCl_2$. Parámetros obtenidos para el modelo Weibull. Error estándar entre paréntesis.

Cepa levadura	250 mg/L		500 mg/L		1000 mg/L	
	D_β (h)	β	D_β (h)	β	D_β (h)	B
Y10	CD*	-	13 (3) a	0,7 (0,06)	10 (3) a	0,8 (0,2)
Y2	32 (11) a	0,54 (0,17)	23 (3) a	1,0 (0,09)	22 (5) a	0,9 (0,1)
Y11	CD	-	23 (11) a	0,3 (0,10)	14 (1) a	1,3 (0,1)
Y12	22 (2) a	1,78 (0,19)	20 (2) a	1,5 (0,16)	21 (1) a	1,7 (0,1)
Y24	80 (5) a	1,79 (0,13)	51 (10) a	1,6 (0,30)	66 (2) a	2,1 (0,1)
Y25	49 (3) a	1,35 (0,06)	31 (2) b	1,0 (0,04)	26 (2) b	0,9 (0,0)
Y3	CD	-	20 (2) a	0,8 (0,03)	11 (1) b	0,6 (0,0)
Y6	CD	-	27 (2) a	2,8 (0,42)	13 (2) b	1,2 (0,1)
Y26	18 (2) a	0,81 (0,04)	9 (1) b	0,8 (0,05)	7 (2) b	0,9 (0,1)
Y1	19 (2) a	1,26 (0,13)	14 (1) a	1,4 (0,04)	16 (1) a	2,1 (0,1)
Y15	CD	-	CD	-	39 (2) a	0,6 (0,2)
Y27	CD	-	56 (5) a	1,7 (0,17)	18 (2) b	0,8 (0,0)
Y28	13 (2) a	1,19 (0,12)	7 (4) a	0,8 (0,32)	10 (1) a	1,7 (0,1)
Y31	92 (4) a	2,27 (0,13)	20 (2) b	0,8 (0,06)	18 (1) b	1,2 (0,0)
Y29	6 (1) a	0,66 (0,07)	6 (1) a	0,6 (0,04)	4,0 (1) a	0,6 (0,0)
Y17	9 (3) a	0,78 (0,12)	8 (1) a	0,7 (0,06)	7 (2) a	0,7 (0,1)
Y13	57 (6) a	1,18 (0,11)	18 (2) b	1,7 (0,18)	18 (2) b	1,5 (0,2)
Y4	13 (2) a	1,05 (0,09)	10 (1) a	1,2 (0,09)	6 (1) a	1,5 (0,0)
Y18	14 (1) a	1,05 (0,05)	11 (2) a	1,2 (0,1)	13 (2) a	1,7 (0,3)
Y30	20 (1) a	1,95 (0,10)	21 (1) a	2,1 (0,1)	14 (1) b	1,4 (0,1)
Y32	10 (1) a	1,24 (0,06)	10 (1) a	1,2 (0,0)	9 (1) a	1,1 (0,1)
Y36	8 (1) a	0,78 (0,02)	8 (1) a	0,9 (0,0)	5 (1) a	0,8 (0,1)

*CD (crecimiento detenido). Los valores de la fila seguidos por diferentes letras son significativamente diferentes a $p \leq 0,05$, de acuerdo al test post-hoc de comparación de Scheffe.

La Figura 5.19 presenta los resultados del ANOVA del parámetro D_{β} para todas las levaduras en función de los diferentes niveles de $ZnCl_2$ (sin la inclusión de los casos en los que solo se evita el crecimiento, pero se mantiene la población). A 250 mg/L de $ZnCl_2$, las dos levaduras más resistentes (valores D_{β} más elevados) son *P. membranifaciens* Y31 (92 h) y *D. etchellsii* Y24 (80 h); a 500 mg/L, las que presentaron menor inhibición son *P. galeiformis* Y27 (55,9 h) y *D. etchellsii* Y24 (51,3 h); y, finalmente, a 1000 mg/L, fueron *D. etchellsii* Y24 (66,3 h) y *P. galeiformis* Y15 (38,6 h). Estas diferencias son significativas con respecto a los valores obtenidos para el resto de las levaduras a los tres niveles de $ZnCl_2$. Por el contrario, la mayor inhibición a 250 mg/L se detecta para *C. tropicalis* Y29 (6,3 h) y *T. delbrueckii* Y36 (8,3 h); a 500 mg/L dicho efecto es más intenso en *C. tropicalis* Y29 (6,0 h) y *P. galeiformis* Y28 (7,2 h); y, de nuevo, para 1000 mg/L, *C. tropicalis* Y29 (3,8 h) y *T. delbrueckii* Y36 (4,9 h) son las menos resistentes. En general, cuando se incrementa la concentración de $ZnCl_2$ en el medio, la inhibición es mayor para todas las levaduras, aunque en muchos casos esta tendencia no de lugar a diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5.8 y Figura 5.19).

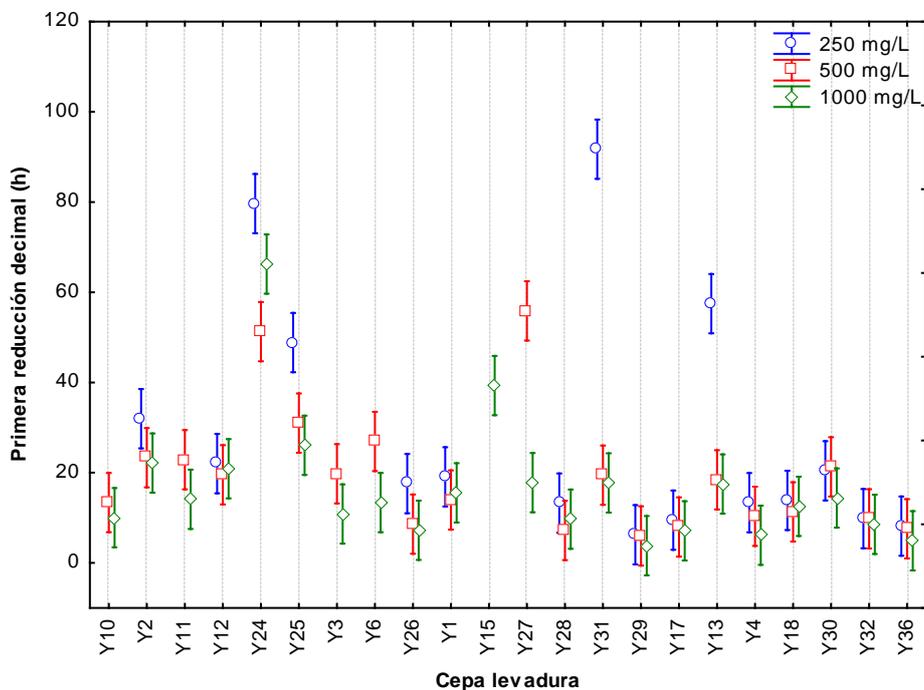


Figura 5.19. Valores medios y límites de confianza, deducidos del ANOVA para el parámetro D_{β} (tiempo para la primera reducción decimal), según concentración de $ZnCl_2$ (250, 500 y 1000 mg/L) y de la cepa de levadura.

Con respecto al parámetro asociado a la forma de la curva de inhibición (β), no es posible encontrar una tendencia clara entre las levaduras para los diferentes niveles de ZnCl_2 . Para 250 mg/L de ZnCl_2 , sus valores oscilan entre 0,5 (curva cóncava hacia arriba) en el caso de *W. anomalous* Y2 y 2,27 (curva cóncava hacia abajo) para *P. membranifaciens* Y31; en cambio para 500 mg/L, su rango es de 0,3 (*W. anomalous* Y11) a 2,8 (*I. orientalis* Y6); y, finalmente, para 1000 mg/L, fluctúan entre 0,6 (*I. occidentalis* Y3) y 2,1 (*C. diddensiae* Y1) (Tabla 5.8).

El cálculo del área bajo la curva DO/tiempo ha sido considerado como un buen indicador del crecimiento global de las levaduras debido a su relación con los parámetros biológicos de crecimiento. De este modo, este parámetro tiene una relación inversa con la fase de latencia, y una relación lineal con el máximo tamaño poblacional y la tasa máxima de crecimiento específico de las levaduras, como indican recientemente [Arroyo-López y col. \(2009b\)](#).

Algunos trabajos han estudiado la resistencia de las levaduras frente a concentraciones progresivas de Zn. Sin embargo, muchos de ellos se centran en la respuesta genética de *S. cerevisiae* a un exceso de este mineral, sin aportar datos de otras especies. Del mismo modo, se ha identificado que los genes relacionados con la formación, mantenimiento y biogénesis de las vacuolas, chaperonas y respuesta general al estrés, están involucrados en la resistencia de *S. cerevisiae* al Zn ([Pagani y col., 2007](#); [Bleackley y col., 2011](#)). Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para controlar sus niveles intracelulares de Zn. Se ha identificado que las levaduras pueden realizar la homeostasis del Zn mediante cuatro vías: i) control de la absorción de Zn; ii) almacenar Zn en las vacuolas; iii) unión intracelular del Zn a metalotioneínas; y iv) excreción del Zn fuera de las células ([Walker, 2004](#)). Esto representa una respuesta general en la que un grupo diverso de genes están involucrados en la determinación de la resistencia fenotípica a un exceso de este mineral.

De acuerdo con los datos obtenidos, la respuesta de las levaduras al aumento de las concentraciones de ZnCl_2 es variable, incluso entre cepas de la misma especie. [Walker \(2004\)](#) ya menciona que diversas cepas de levaduras podían tener diferentes requerimientos de nutrientes minerales, y que el grado de toxicidad depende del metal en cuestión, su concentración, biodisponibilidad y de la cepa. En estos ensayos, una concentración de 250 mg/L de ZnCl_2 garantiza la inhibición del crecimiento de todas las

levaduras y concentraciones por encima de 500 mg/L (excepto para *P. galeiformis* Y15) provocan una clara reducción del inóculo inicial. Estos niveles de ZnCl₂ podrían emplearse en el envasado de aceitunas de mesa u otros vegetales fermentados en los casos en que la conservación del producto y su estabilidad dependa de la inhibición de la microflora fúngica.

La cepa *C. diddensiae* Y1 muestra el valor NIC más alto (178 mg/L) de todas las estudiadas y cesa su crecimiento más tarde que las demás levaduras (MIC a 238 mg/L de ZnCl₂). Pero, no obstante, la misma no tiene un valor D_β alto en ninguna de las concentraciones de ZnCl₂ ensayadas para la inhibición (250, 500 o 1000 mg/L). Esto indica que cuando se supera el valor MIC, la muerte de este microorganismo en presencia de cantidades progresivas de la sal es muy rápida. Por el contrario, *D. etchellsii* Y24 tuvo un comportamiento opuesto ya que dicha levadura reduce su crecimiento a niveles muy bajos de ZnCl₂ (en torno a 22 mg/L, valor de su NIC) y lo detiene completamente también a concentraciones relativamente reducidas (MIC de 98 mg/L). Sin embargo, es una de las cepas más resistentes a todas las concentraciones de inhibición estudiadas (250, 500 o 1000 mg/L de ZnCl₂), con valores D_β altos (Tabla 5.8). Por lo tanto, de todo ello se deduce la existencia de dos comportamientos diferentes en cuanto a la resistencia al ZnCl₂, y ambas cepas pueden considerarse como los microorganismos más representativos de dichos modelos.

Muchas de las levaduras ensayadas en este trabajo de inhibición con sales de Zn son también comunes a otras fermentaciones de vegetales o se encuentran en una gran variedad de zumos, produciendo alteraciones en muchas ocasiones. Por ello, se ha procedido a patentar (tanto a escala nacional como internacional) la posible conservación de todos estos productos mediante el empleo de sales de Zn (P201030491). El procedimiento tiene, asimismo, la ventaja de producir un producto final fortificado en este elemento, que puede presentar efectos beneficiosos para la prevención de la diarrea en niños y garantizar la ingesta mínima diaria recomendada en los mayores.

5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE CLORURO SÓDICO POR OTRAS SALES MINERALES EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS

5.2.1. Fermentación de aceitunas de mesa estilo sevillano de la variedad Gordal

5.2.1.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.2.1.1.1. pH y acidez libre

La diferente composición en sales minerales de las salmueras influye en el pH durante los primeros días de fermentación (Figura 5.20). En un primer grupo de tratamientos (1 y 9 (10:0:0), 2 (5:1:0), 4 (7:3:0), 8 y 14 (4:0:0)), caracterizados por contener NaCl y KCl en diferentes proporciones, los valores de pH oscilan entre 8 y 9 unidades. Por el contrario, en el segundo grupo (3 y 11 (4:3:3), 5 (8:1:1), 6 y 15 (6:2:2), 7 (5:4:1), 10 y 12 (4:0:6), y 13 (7:0:3)), que tienen en común la presencia de CaCl₂ del 1% al 6%, varía entre 6,5 y 7,5, que es más favorable para el crecimiento inicial de las BAL. El pH más bajo obtenido en el segundo grupo de tratamientos puede haber sido causado por una disminución en la difusión del álcali a las salmueras, debido a la interacción del Ca con polímeros (pectinas, ligninas, etc.) presentes en la pulpa de los frutos (Roy y col., 1994; Jiménez y col., 1997). Por lo tanto, la presencia de CaCl₂ puede ser conveniente para proporcionar un pH inicial más bajo, que, a su vez, puede disminuir el riesgo inicial de crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes al inicio de la fermentación.

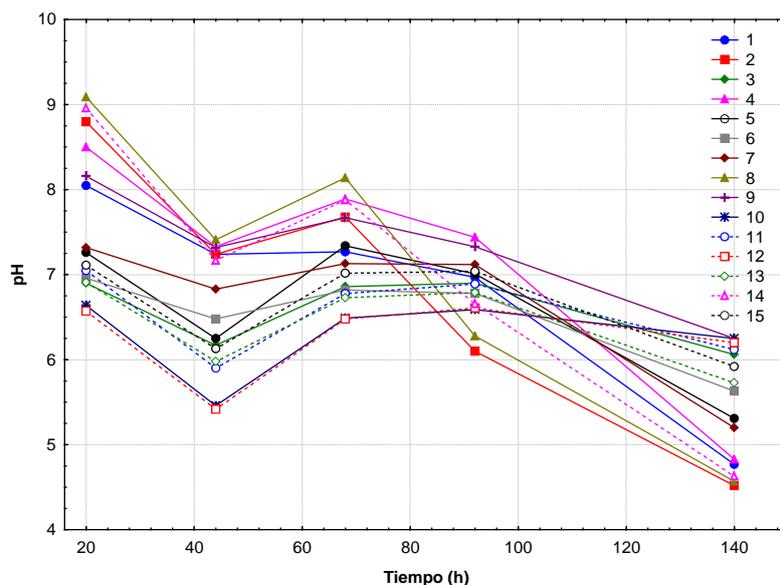


Figura 5.20. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en el pH durante los primeros días, según tratamientos.

A pesar de las diferencias en el pH entre los diferentes tratamientos al comienzo del proceso, los cambios a lo largo de la fermentación son bastante similares (Figura 5.21a). Sin embargo, los valores finales sí que se relacionan con las concentraciones iniciales de las sales en las salmueras. El modelo propuesto es lineal ($p=0,0001$; falta de ajuste, $p=0,4378$) y la ecuación en valores físicos tiene la siguiente expresión:

$$\text{pH final} = +0,362*\text{NaCl} + 0,360*\text{KCl} + 0,316*\text{CaCl}_2 \quad (5.7)$$

El orden de influencia de las sales para aumentar el pH final es $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CaCl}_2$, es decir, una mayor presencia de CaCl_2 provoca valores de pH finales más bajos en las salmueras. La grafica de contornos (Figura 5.21b) muestra líneas casi paralelas al eje que conecta los vértices NaCl (10%) y KCl , pero hay un claro descenso del pH cuando se pasa de esa línea hacia el vértice CaCl_2 . Esta caída adicional en el pH debido a la presencia de CaCl_2 representa un menor riesgo de alteración y una mayor seguridad para los consumidores (Garrido Fernández y col., 1997).

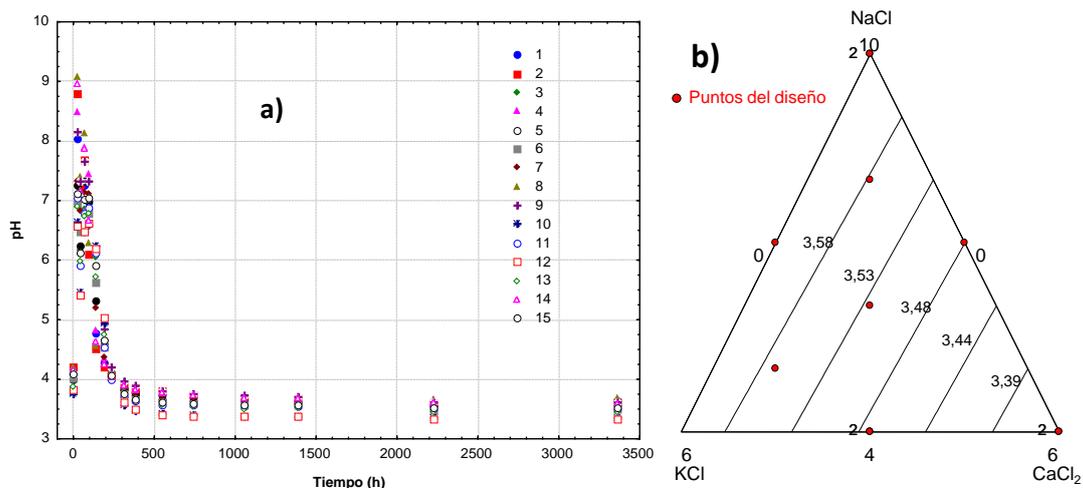


Figura 5.21. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Cambios en el pH, según tratamientos. b) Líneas de contorno para el pH final en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La producción de acidez libre durante la fermentación se ajusta a una curva sigmoidea compuesta por un periodo de pseudo-latencia (sin producción) seguida por un aumento más o menos intenso hasta estabilizarse en valores relativamente elevados. La máxima producción de acidez libre es el objetivo final de la fermentación de

aceitunas de mesa estilo sevillano para de este modo garantizar la seguridad y estabilidad microbiológica del producto (Garrido Fernández y col., 1997). Para evaluar los cambios globales de la acidez libre en función de las diferentes sales, se utilizan los parámetros obtenidos en el ajuste con la ecuación de Gompertz reparametrizada (Tabla 5.9, Figura 5.22a). El período de pseudo-latencia en la producción de acidez libre se puede relacionar con la composición inicial de las salmueras. El modelo obtenido es lineal ($p=0,008$; falta de ajuste, $p=0,648$) y la ecuación en términos de valores físicos tiene la siguiente expresión:

$$\text{Fase pseudo-latencia (h)} = +8,19*\text{NaCl} + 5,80*\text{KCl} + 15,10*\text{CaCl}_2 \quad (5.8)$$

Tabla 5.9. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Pseudo-parámetros obtenidos en el ajuste de la ecuación de Gompertz reparametrizada a la producción de acidez libre, según los tratamientos.

Tratamiento	Fase latencia (h)	Tasa producción (g/L*h)	Máxima acidez (g/L)
1	79 (13)	0,102 (0,017)	15,4 (0,4)
2	62 (11)	0,117 (0,019)	16,1 (0,4)
3	105 (8)	0,062 (0,004)	15,5 (0,2)
4	72 (14)	0,078 (0,012)	14,9 (0,4)
5	70 (11)	0,038 (0,002)	15,6 (0,3)
6	83 (13)	0,040 (0,003)	13,8 (0,3)
7	92 (15)	0,089 (0,017)	13,7 (0,7)
8	44 (14)	0,057 (0,006)	14,8 (0,4)
9	100 (13)	0,058 (0,007)	13,4 (0,3)
10	137 (5)	0,055 (0,003)	13,6 (0,1)
11	81 (15)	0,055 (0,007)	14,6 (0,4)
12	118 (12)	0,042 (0,003)	13,9 (0,2)
13	97 (8)	0,044 (0,002)	14,4 (0,2)
14	65 (9)	0,086 (0,009)	15,4 (0,3)
15	94 (9)	0,043 (0,003)	14,3 (0,2)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

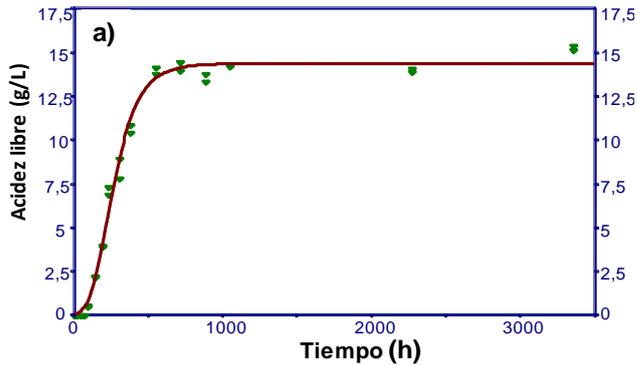


Figura 5.22

acidez libre co

b) Líneas de c

libre en func

Las lí

triángulo (líne

de NaCl tiene

a medida que la concentración se desplaza desde el vértice KCl hacia el del CaCl₂. Es decir, la fase de pseudo-latencia aumenta con el contenido de CaCl₂ y disminuye con el KCl. Sin embargo, las tasas de producción y acidez máxima no se relacionan con las concentraciones iniciales de sales, aunque merece la pena resaltar algunos aspectos interesantes. Así, las tasas de producción más altas, 0,117 (g/L*h) y 0,102 (g/L*h), se encuentran en los tratamientos 2 (5:1:0) y 1 (10:0:0), respectivamente, sin CaCl₂ en la salmuera inicial. Por el contrario, las tasas más bajas, 0,038, 0,040, 0,042, 0,044 y 0,043 (g/L*h), se observan en los tratamientos 5 (8:1:1), 6 (6:2:2), 12 (4:0:6), 13 (7:0:3) y 15 (6:2:2), respectivamente, que incluyen CaCl₂ en sus salmueras. Con respecto a la máxima acidez libre obtenida (Tabla 5.9), todos los tratamientos alcanzan unos valores apropiados.

5.2.1.1.2. Cambios en el contenido de azúcares y ácidos en las salmueras

En cuanto al contenido en azúcares, se procede a mostrar los cambios individuales de los principales azúcares reductores presentes en esta variedad de

aceituna de mesa. El estudio incluye conjuntamente tanto la difusión desde la pulpa a la salmuera como la utilización de los mismos por parte de los microorganismos.

La sacarosa se detecta en bajas proporciones pero con diferencias entre los diversos tratamientos. La Figura 5.23a incluye los cambios solo de los tratamientos 1, 2, 9, 10 y 11, a modo de ejemplo, para mostrar los dos tipos diferentes de comportamientos detectados. El primer grupo incluye todos los tratamientos sin CaCl_2 en sus salmueras. En este grupo, el tratamiento 1 muestra el nivel más elevado de sacarosa durante la mayor parte de la fermentación, con cambios bruscos y un rápido descenso después de 188 h. Otros tratamientos que siguen asimismo una evolución parecida son 2, 4, 8, 9 y 14. En el segundo grupo (tratamientos con diversas proporciones de CaCl_2), las concentraciones iniciales de sacarosa aumentan lentamente y alcanzan su máximo (alrededor de 0,2-0,4 g/L) después de largos periodos de tiempo (>236 h). Sin embargo, al final de la fermentación, las concentraciones iniciales de sacarosa son bajas y similares, independientemente de los niveles iniciales de sales. A escala industrial este azúcar prácticamente desaparece de las salmueras al final de la fermentación (Montaño y col., 2003). La sacarosa puede ser utilizada en lugar de glucosa para complementar las salmueras, evitando la producción de ácido acético por parte de las BAL (Chorianopoulos y col., 2005).

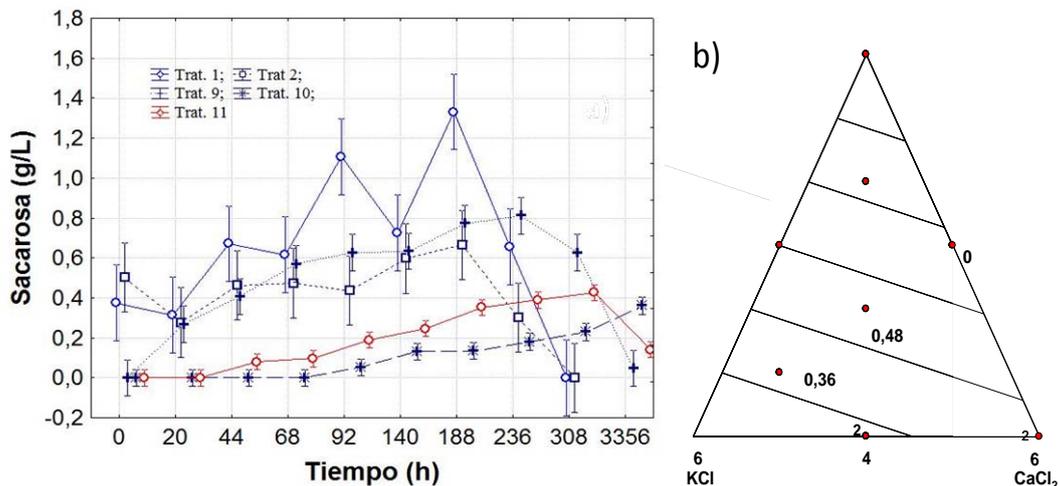


Figura 5.23. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Cambios en la concentración de sacarosa en función del tiempo, según los tratamientos que representan los diversos comportamientos observados; las barras verticales indican un intervalo de confianza para $p=0,95$. b) Líneas de contorno de la máxima concentración de sacarosa (g/L) obtenida en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Utilizando la máxima concentración de sacarosa encontrada en salmuera como respuesta, el modelo propuesto por la suma secuencial de cuadrados es lineal ($p=0,197$; falta de ajuste, $p=4409$) y toma la siguiente expresión:

$$\text{Sacarosa máxima (g/L)} = 0,09 * NaCl - 0,02 * KCl + 8,41 * CaCl_2 \quad (5.9)$$

La interpretación de la ecuación a través de las líneas de contorno (Figura 5.23b) muestra que la sacarosa en las salmueras (siempre a niveles bajos) disminuye notablemente cuando se pasa del vértice NaCl hacia la base del triángulo. Las líneas de contorno están inclinadas hacia el vértice CaCl₂, lo que indica que el efecto de la sustitución de NaCl por CaCl₂ es más fuerte que el del intercambio de NaCl por KCl. El análisis del área bajo la curva de sacarosa (que refleja los cambios generales en el tiempo) lleva a conclusiones idénticas (datos no mostrados).

La glucosa es el azúcar más abundante en las aceitunas (Garrido Fernández y col., 1997). Sus cambios con el tiempo son similares a los descritos para la sacarosa, pero con efectos más relevantes, debido a su mayor concentración en los frutos (Figura 5.24a). Los niveles de glucosa en las salmueras de los tratamientos sin CaCl₂ (1, 2, 4, 8, 9 y 14) se incrementan rápidamente y alcanzan su máximo (8,10 g/L) a las 48 h después de la puesta en salmuera, mientras que en aquellos con CaCl₂ aumentan más progresivamente y requieren de 90 a 180 h para llegar a un máximo, que, además, es más bajo (~4 g/L) que en aquellos en los que el CaCl₂ está ausente (Figura 5.24a). Después del máximo, siempre hay una reducción progresiva en el contenido de glucosa ya, que en este período, la tasa de consumo es mayor (debido a la fermentación) que la de difusión. Para este azúcar, sólo el área bajo la curva de glucosa frente al tiempo puede ajustarse mediante un modelo cúbico ($p=0,0028$; falta de ajuste, $p=0,1876$). La ecuación matemática que expresa la relación de dicho área con las sales es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Área glucosa} = & 170,80 * NaCl - 139,30 * KCl + 55,80 * CaCl_2 + 35,15 * NaCl * KCl - 9,70 * \\ & NaCl * CaCl_2 + 267,35 * KCl * CaCl_2 - 66,49 * NaCl * KCl * CaCl_2 \end{aligned} \quad (5.10)$$

La gráfica de líneas de contorno (Figura 5.24b) muestra que la mínima área puede encontrarse en una región entre 60 g/L de NaCl (centro del diseño) y la base del triángulo. Posiblemente, cuando la concentración se desplaza hacia el vértice CaCl₂, el proceso predominante podría ser la difusión lenta, mientras que si se acerca al vértice

KCl, el proceso dominante parece ser el consumo porque no hay evidencia de que el K retrase la difusión. La glucosa es normalmente el azúcar seleccionado para complementar las salmueras en el caso de fermentaciones detenidas cuando dicho efecto se debe sólo a la escasez de carbohidratos asimilables (Chorianopoulos y col., 2005; Panagou y Katsaboxakis, 2006).

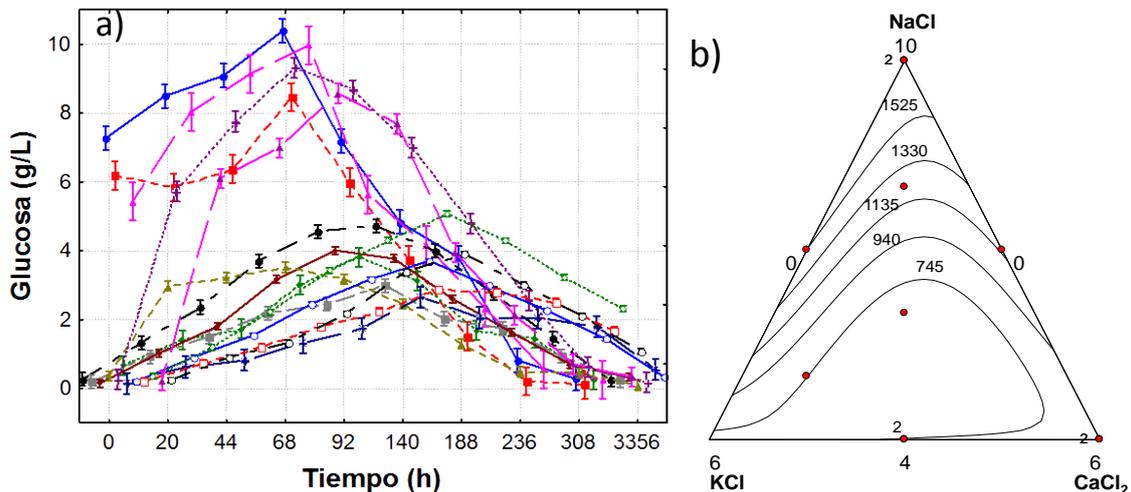


Figura 5.24. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Cambios en la concentración de glucosa en función del tiempo, según los tratamientos; los símbolos de la gráfica son: \bullet , Trat. 1; \blacksquare , Trat. 2; \blacktriangle , Trat. 3; \blacklozenge , Trat. 4; \blackstar , Trat. 5; \blacktriangledown , Trat. 6; \blacktriangleright , Trat. 7; \blacktriangleleft , Trat. 8; \blacktriangleright , Trat. 9; \blacktriangledown , Trat. 10; \blacktriangleleft , Trat. 11; \blacktriangleright , Trat. 12; \blacktriangleleft , Trat. 13; \blacktriangleright , Trat. 14; \blacklozenge , Trat. 15. Las barras verticales indican intervalos de confianza para $p=0,95$. b) Líneas de contorno del área bajo la curva de la concentración de glucosa en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Los cambios de fructosa en salmuera son similares a los descritos para la sacarosa y glucosa. Los tratamientos sin CaCl_2 (1, 2, 4, 8, 9 y 14) muestran un aumento más rápido de la fructosa, pero en aquellos que tienen CaCl_2 , las concentraciones iniciales aumentan progresivamente y alcanzan su máximo por debajo de 2,5 g/L (con marcadas diferencias entre los tratamientos) (Figura 5.25a). Los cambios pueden ser modelados correctamente utilizando como respuesta el área bajo la curva de la concentración de fructosa en función del tiempo. El análisis estadístico propone un modelo cúbico especial ($p=0,0073$; falta de ajuste, $p=0,2819$), que tiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Área fructosa} = & 70,72 * \text{NaCl} + 352,99 * \text{KCl} - 21,34 * \text{CaCl}_2 - 71,70 * \text{NaCl} * \text{KCl} + 8,04 * \\ & \text{NaCl} * \text{CaCl}_2 - 80,47 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 + 17,40 * \text{NaCl} * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 \end{aligned} \quad (5.11)$$

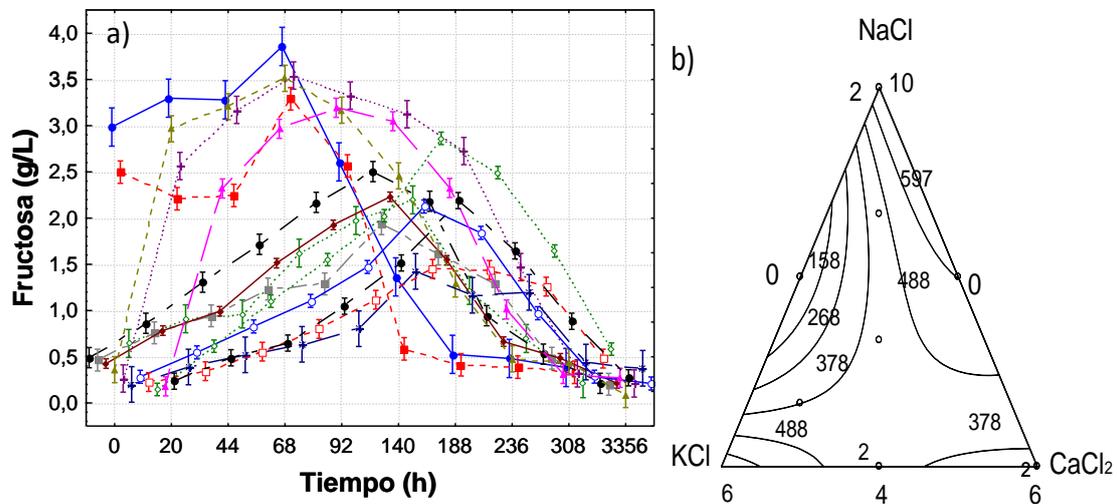


Figura 5.25. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Cambios en la concentración de fructosa en función del tiempo, según tratamientos. Los símbolos de la gráfica son: \bullet , Trat. 1; \blacksquare , Trat. 2; \blacktriangle , Trat. 3; \blacklozenge , Trat. 5; \blacklozenge , Trat. 6; \blacklozenge , Trat. 7; \blacklozenge , Trat. 8; \blacklozenge , Trat. 9; \blacklozenge , Trat. 10; \blacklozenge , Trat. 11; \blacklozenge , Trat. 12; \blacklozenge , Trat. 13; \blacklozenge , Trat. 14; \blacklozenge , Trat. 15; las barras verticales indican intervalos de confianza para $p=0,95$. b) Líneas de contorno del área obtenida bajo la curva de la concentración de fructosa en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La gráfica de líneas de contorno (Figura 5.25b) muestra que la región con el área más baja es bastante similar a la obtenida para la glucosa, con la única excepción de que, en este caso, también hay un mínimo en el centro de la línea que conecta los vértices de NaCl y KCl, posiblemente debido a un rápido consumo de este sustrato en estas condiciones específicas. Las similitudes entre los contornos de los modelos para el área bajo la glucosa y la fructosa, indican un comportamiento similar de los dos azúcares durante el proceso de fermentación. Sin embargo, el uso de la sacarosa puede estar más directamente relacionado con la concentración de K en salmuera y, posiblemente, con el crecimiento de las BAL (Panagou y Katsaboxakis, 2006). Fleming y McFeeters (2001) encuentran que la fructosa se agota totalmente durante la fermentación de pepinillos, pero no así la glucosa.

El manitol es un azúcar relativamente abundante en las aceitunas (Garrido Fernández y col., 1997). Los cambios iniciales en este azúcar en la fermentación de

Gordal (Figura 5.26) revelan de nuevo la presencia de dos grandes grupos de tratamientos (con CaCl_2 y sin CaCl_2). Sin embargo, la tendencia es muy diferente porque en la mayoría de los tratamientos su consumo está limitado y no se observa una disminución apreciable (Figura 5.26).

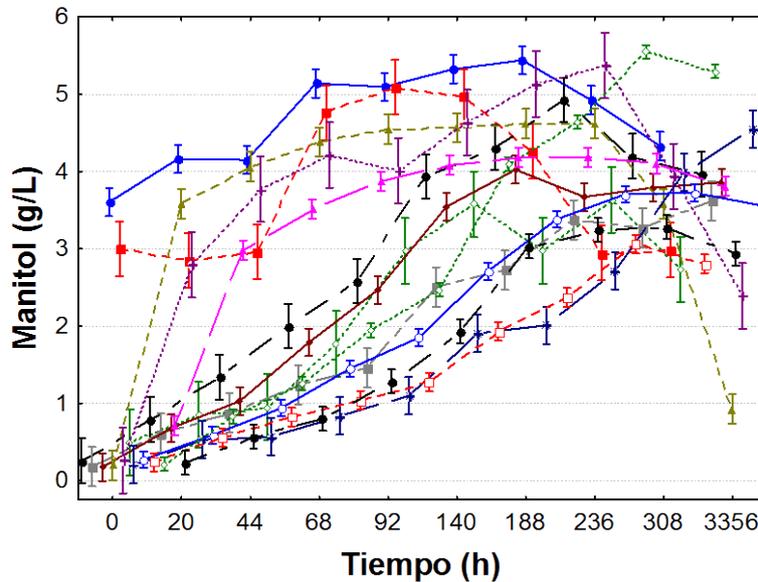


Figura 5.26. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en la concentración de manitol en función del tiempo, según los tratamientos; los símbolos de la gráfica son: $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 1; $\text{---}\blacksquare\text{---}$, Trat. 2; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$, Trat. 3; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 5; $\text{---}\blacksquare\text{---}$, Trat. 6; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 7; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$, Trat. 8; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 9; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 10; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 11; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 12; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 13; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 14; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, Trat. 15. Las barras verticales indican intervalos de confianza para $p=0,95$.

Como resultado, las concentraciones al final del proceso están bastante cerca de su máximo. El modelo propuesto para la concentración máxima de manitol en salmuera es cúbico ($p=0,0006$; falta de ajuste, $p=0,6722$) y la ecuación tiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Manitol máximo (g/L)} = & 0,60*\text{NaCl} + 1,48*\text{KCl} - 0,17*\text{CaCl}_2 - 0,19*\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,12 \\ & * \text{NaCl} * \text{CaCl}_2 + 0,15 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 - 0,08 * \text{NaCl} * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 \end{aligned} \quad (5.12)$$

La representación de las líneas de contorno para este parámetro (Figura 5.27a) muestran que, aparentemente, la sustitución de NaCl por KCl no tiene influencia sobre la concentración máxima; ambos causan el mismo efecto en la difusión. Sin embargo, cuando el NaCl se sustituye por CaCl_2 , la concentración máxima de manitol disminuye,

lo que indica una interferencia en la difusión del mismo debido a la presencia de CaCl_2 (como ocurre con el resto de azúcares).

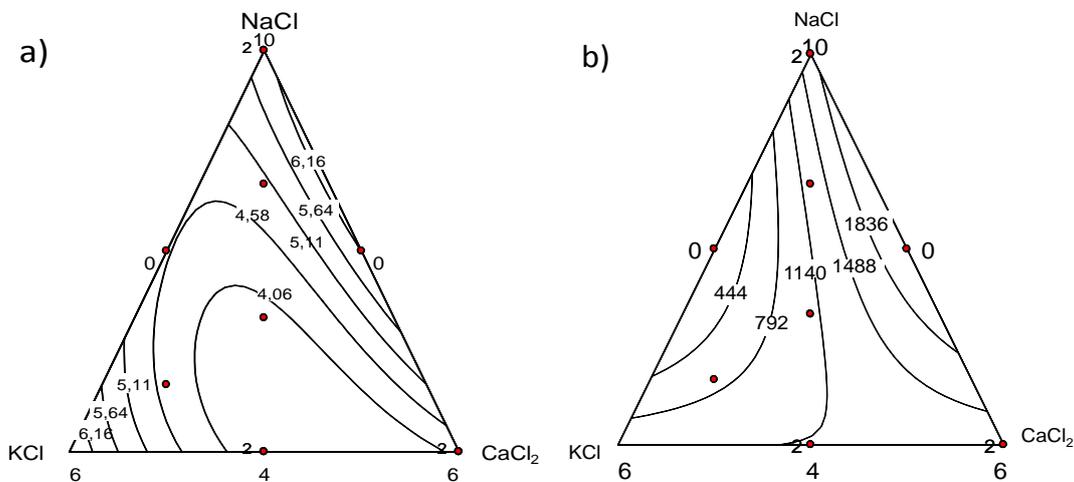


Figura 5.27. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Líneas de contorno de la máxima concentración de manitol en salmuera en función de las concentraciones iniciales de sales. b) Líneas de contorno del área bajo la curva manitol frente a tiempo en salmuera en función de las concentraciones iniciales sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Un comportamiento diferente para este azúcar se refleja cuando el parámetro estudiado es el área bajo la curva de manitol en función del tiempo (Figura 5.27b). El modelo propuesto es cuadrático ($p=0,0114$; falta de ajuste, $p=0,9399$), y su ecuación matemática es la siguiente:

$$\text{Área manitol} = 173,5 \cdot \text{NaCl} + 636,4 \cdot \text{KCl} - 211,3 \cdot \text{CaCl}_2 - 143,2 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{KCl} + 75,2 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.13)$$

Los mayores valores se encuentran en la línea que une los vértices de NaCl y CaCl_2 , donde su consumo es el más bajo. La presencia de CaCl_2 no sólo provoca un máximo debido a la interferencia en la difusión, sino que no facilita su consumo. Por el contrario, el área mínima (máxima utilización durante la fermentación) se observa en el lado opuesto para una mezcla de aproximadamente 70 g/L NaCl + 30 g/L KCl . [Montaño y col. \(2003\)](#) también observan residuos de manitol en fermentaciones de aceitunas de mesa industriales.

El contenido en ácidos orgánicos de las salmueras es otro parámetro fisicoquímico ampliamente estudiado durante la fermentación de aceitunas. Inmediatamente después de la puesta en salmuera de los frutos se detectan bajas concentraciones de

ácido acético, posiblemente producidas durante el tratamiento con álcali de los mismos (Garrido Fernández y col., 1997). Sin embargo, en esta experiencia los niveles de dicho ácido no se modifican durante el proceso y, por lo tanto, el mismo no se produce durante la fermentación. Su contenido medio oscila entre 1,27 ($\pm 0,39$) g/L y 2,08 ($\pm 0,46$) g/L. Estas concentraciones son del mismo orden que las que se encuentran en la variedad griega Conservolea procesada al estilo sevillano (Chorianopoulos y col., 2005). No obstante, en la aceitunas negras naturales fermentadas, la presencia de ácido acético se atribuye a un cambio de metabolismo homo a heterofermentativo por parte de las BAL (Panagou y col., 2008). En un estudio realizado a escala industrial, se ha detectado proporciones significativamente mayores de ácido acético junto con ácido propiónico, estando relacionado este último con un posible desarrollo de especies de bacterias propiónicas (Montaño y col., 2003).

Los cambios globales en ácido láctico en función del tiempo muestran la presencia del mismo solo después de la inoculación de las salmuera con *L. pentosus*, a causa de su producción durante la fermentación, llegando a alcanzar valores comprendidos entre 13 y 16 g/L (Figura 5.28a).

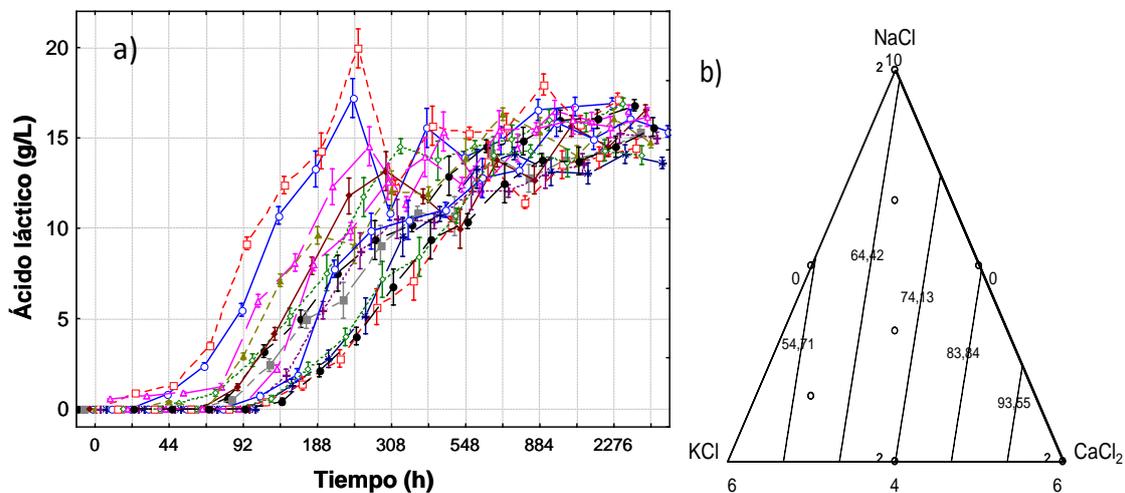


Figura 5.28. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Cambios en la concentración de ácido láctico en función del tiempo, según los tratamientos; los símbolos de la gráfica son: \square , Trat. 1; \square , Trat. 2; \square , Trat. 3; \square , Trat. 4; \square , Trat. 5; \square , Trat. 6; \square , Trat. 7; \square , Trat. 8; \square , Trat. 9; \square , Trat. 10; \square , Trat. 11; \square , Trat. 12; \square , Trat. 13; \square , Trat. 14; \square Run 15; las barras verticales indican intervalos de confianza para $p=0,95$. b) Líneas de contorno de la fase de pseudo-latencia en la producción de ácido láctico en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Así, en general, todos los tratamientos consiguen unos valores de ácido láctico adecuados, sin poder relacionarse el contenido final del mismo con las concentraciones iniciales de sales en las salmueras. Recientemente, se ha llevado a cabo la fermentación de aceituna de la variedad Conservolea, utilizando diferentes niveles iniciales de NaCl, KCl y CaCl₂ y se han obtenido procesos lácticos vigorosos que han alcanzado valores de pH bajos. En este caso, los factores más críticos para la aceptación de las mismas fueron las características sensoriales de los frutos fermentados (Panagou y col., 2011).

Para estudiar la evolución de la producción de láctico durante la fermentación se ajustan los valores obtenidos en función del tiempo a la ecuación de Gompertz reparametrizada. Los parámetros estimados se utilizan entonces como respuestas al diseño experimental. El retraso estimado en la producción de ácido (pseudo-latencia) en función de la concentración de sales, se ajusta mediante un modelo lineal ($p=0,0015$; falta de ajuste, $p=0,8125$) y la ecuación es la siguiente:

$$\text{Pseudo-latencia láctico (h)} = 6,34 \cdot \text{NaCl} + 3,27 \cdot \text{KCl} + 12,98 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.14)$$

Las líneas de contorno para este parámetro (Figura 5.28b) son casi perpendiculares y no se modifican cuando se pasa del vértice NaCl hacia la base, siempre que la proporción de KCl o CaCl₂ se mantenga constante. Sin embargo, la fase de pseudo-latencia estimada disminuye a medida que la concentración de la mezcla se desplaza hacia la izquierda (vértice KCl) o aumenta a medida que se mueve hacia la derecha (vértice CaCl₂). En resumen, el inicio en la producción de ácido láctico es más rápido a medida que el contenido de KCl aumenta mientras que las concentraciones progresivamente elevadas de CaCl₂ retrasan su formación.

Las tasas de producción estimadas no tienen relación con la concentración de sal inicial, aunque hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 5.10). De acuerdo con la Figura 5.28a, la mayor tasa de producción (Tabla 5.10) se encuentra en el tratamiento 2 seguido por el 1, cuyas salmueras no contienen CaCl₂. Además, también se encuentran altas tasas en los tratamientos 14 y 7, que se caracterizan por la ausencia, o bajo contenido, de CaCl₂. Las tasas más bajas se detectan en los tratamientos 5, 6, 15 y 12, todos ellos con unos niveles de CaCl₂ moderados o altos. En la Tabla 5.10 se muestra la información completa sobre los grupos homogéneos. La máxima producción de ácido láctico estimada y el área bajo la curva de

ácido láctico en función del tiempo no se relacionan con la concentración inicial de las sales. En la literatura se encuentra que la acidez total y la tasa de producción se incrementan cuando las salmueras se complementan con sacarosa, glucosa o ambos azúcares (Chorianopoulos y col., 2005; Panagou y Katsaboxakis, 2006).

Tabla 5.10. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Pseudo-parámetros (fase de latencia, tasa de producción y máxima producción) obtenidos a partir del ajuste del modelo de Gompertz reparametrizado a los cambios de ácido láctico en función del tiempo. Error estándar entre paréntesis.

Tratamiento	Latencia (h)	Tasa específica de producción (g/L*h)	Acidez máxima (g/L)
1	15,4 (0,5)	0,105 (0,019)	58 (13)
2	16,9 (0,5)	0,126 (0,252)	46 (12)
3	15,6 (0,3)	0,064 (0,006)	82 (11)
4	15,0 (0,4)	0,079 (0,012)	52 (13)
5	15,7 (0,4)	0,042 (0,004)	55 (13)
6	13,9 (0,3)	0,043 (0,004)	66 (14)
7	13,7 (0,5)	0,085 (0,016)	67 (15)
8	14,9 (0,4)	0,594 (0,007)	30 (13)
9	13,4 (0,4)	0,059 (0,008)	78 (15)
10	13,6 (0,3)	0,057 (0,006)	113 (11)
11	14,9 (0,4)	0,057 (0,007)	61 (15)
12	13,8 (0,3)	0,046 (0,005)	98 (15)
13	14,4 (0,3)	0,049 (0,004)	81 (10)
14	15,5 (0,4)	0,086 (0,011)	46 (10)
15	14,4 (0,3)	0,045 (0,004)	75 (11)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

Además, se lleva a cabo un análisis multivariante del contenido en azúcares y ácidos orgánicos, utilizando como variables las concentraciones máximas de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol, así como las de ácido acético y láctico obtenidas en las salmueras. El análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 5.29) muestra la presencia de dos grupos bien diferenciados. El primero, a la izquierda, se caracteriza por incluir todos los tratamientos con CaCl_2 mientras que el segundo, a la derecha, se compone de

tratamientos sin CaCl_2 . Por lo tanto, la presencia de CaCl_2 es el factor más decisivo para el agrupamiento de los datos. Los tratamientos con KCl , por el contrario, se distribuyen entre ambos grupos, apoyando la hipótesis de que la sustitución de NaCl por KCl no causa alteraciones substanciales en el contenido en azúcares y ácidos orgánicos durante la fermentación.

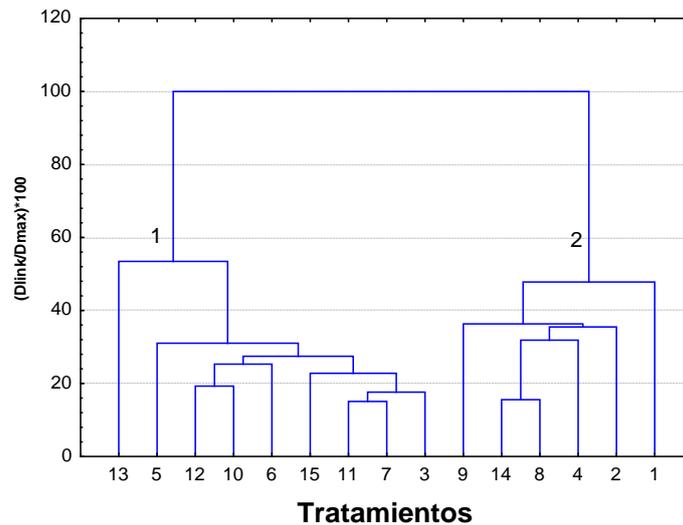


Figura 5.29. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Resultados del análisis de agrupamiento jerárquico, usando las concentraciones máximas de sacarosa, glucosa, fructosa, manitol, ácido acético y láctico en las salmueras como variables.

El análisis de CP indica que el número total de variables se puede agrupar en dos componentes (CP1 y CP2) que explican el 80,5% de la variabilidad (el primer componente explica el 58,1% y el segundo 22,4%). La relación entre los componentes principales y las variables originales se puede deducir de la proyección de las variables en el plano formado por los dos primeros CPs (Figura 5.30a). Las variables máximo contenido en sacarosa, glucosa, fructosa y manitol están relacionadas fuertemente con el CP1 (sus cosenos o proyecciones sobre él son altas), pudiendo ser re-nombrado como "azúcares" y utilizado en substitution de los cuatro azúcares individuales. Sin embargo, las concentraciones máximas de acético y láctico tienen proyecciones más altas (valores de cosenos más elevados) sobre el CP2, por lo que este está asociado a los "ácidos".

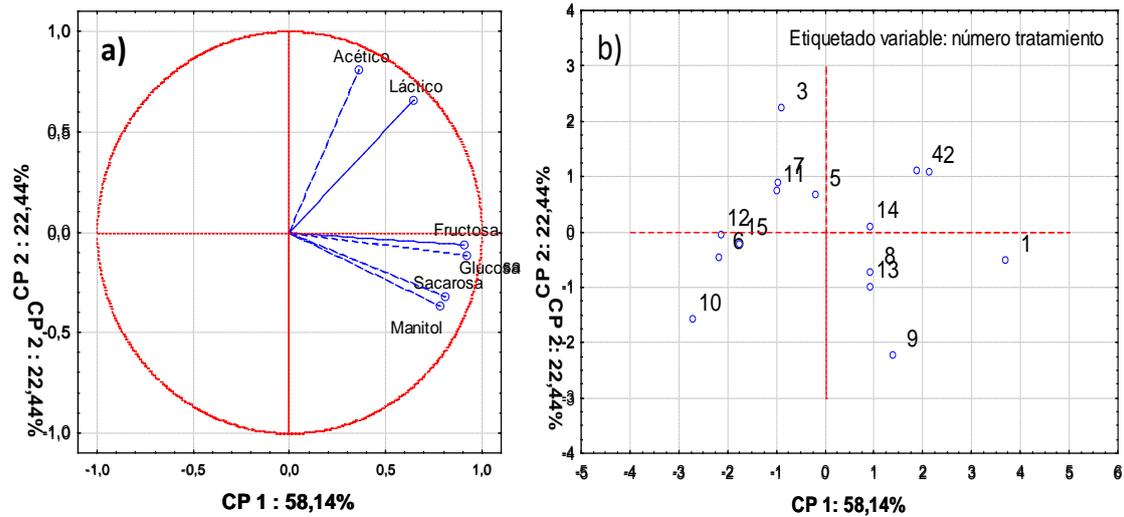


Figura 5.30. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Proyección de las variables (“azúcares” y “ácidos”) en el plano formado por los dos primeros Factores. b) Proyección de los casos en el plano formado por las dos primeras CPs.

Cuando las coordenadas de los tratamientos en los nuevos ejes se representan en el plano formado por los dos primeros CPs, la gráfica permite la caracterización de los mismos (Figura 5.30b). El tratamiento 1 y su duplicado 9, situado en el cuadrante inferior derecho, se asocian a una concentración de azúcar por encima de la media y una acidez por debajo de ella. El tratamiento 3 se distingue por una producción de acidez alta y una concentración baja de azúcares en salmuera. Por el contrario, los tratamientos 10 y 12 comparten una concentración de azúcares baja. Los tratamientos 2, 3, 4, 5, 7, 11 y 14, que contienen KCl en diversas proporciones, se encuentran dentro de los valores positivos del CP 2 (acidez), lo que indica un posible efecto estimulante del K en la producción de ácido láctico, ya que no se produjo ácido acético en ninguno de los tratamientos, como también se ha indicado en un trabajo anterior (Arroyo López y col., 2007). Por el contrario, la mayoría de los tratamientos relacionados con los valores negativos del CP2 no tienen K en sus salmueras, en especial aquellos con valores de acidez muy baja (tratamientos 9 y 10).

5.2.1.1.3. Contenido de minerales en pulpa

Al final del proceso fermentativo, a los frutos se les determinan las concentraciones de los minerales implicados en el diseño (Moreno Baquero, 2011). Los contenidos relativos de los mismos, según tratamientos, se recogen en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Contenidos (relativos al proceso tradicional) de Na, K y Ca en pulpa, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido relat. Na	Contenido relat. K	Contenido relat. Ca
1	1,03	1,23	0,95
2	0,66	3,34	0,87
3	0,51	8,95	7,82
4	0,80	8,50	7,88
5	0,94	3,79	3,81
6	0,69	6,58	6,27
7	0,54	8,90	3,97
8	0,46	0,79	0,92
9	0,97	0,78	1,05
10	0,45	1,09	14,76
11	0,47	8,35	7,92
12	0,50	1,21	14,10
13	0,72	0,98	7,13
14	0,48	0,83	1,05
15	0,73	6,62	6,05
Media trad.*	1573 (37)	84 (19)	62 (3)

Nota: * Media (mg/100g pulpa) del proceso tradicional, desviación estándar entre paréntesis.

Esta información se han utilizado en el presente trabajo como respuesta para estimar las ecuaciones que expresen los contenidos relativos de los minerales en función de las concentraciones iniciales de las mezclas de sales.

En el caso del Na, la suma secuencial de cuadrados del análisis del diseño de mezclas propone un modelo lineal ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,1789$) y la ecuación (transformada) que refleja las relaciones es:

$$\text{Contenido relativo Na en pulpa} = +0,103 * \text{NaCl} + 0,019 * \text{KCl} + 0,010 * \text{CaCl}_2 \quad (5.15)$$

Dicha ecuación matemática puede ser utilizada para estimar la disminución relativa del contenido relativo de Na en pulpa en función de los porcentajes de la mezcla inicial de sales, aunque es más intuitivo estudiarlo a través de las las gráficas de contorno (Figura 31a). En esta gráfica, el vértice correspondiente a NaCl, representa el proceso tradicional, que utiliza solo NaCl durante la fermentación mientras que los otros vértices representan las mezclas de sales. Así, los valores en el vértice KCl representa el cambio de los contenidos en minerales cuando la concentración en la salmuera inicial es 6% de KCl (máximo contenido para esta sal) y 4% de NaCl (mínima proporción utilizada en el diseño). La interpretación en el vertice CaCl_2 es similar. Los contenidos en el vértice NaCl corresponden, por tanto, a los niveles indicados en la Tabla 5.11 para el proceso tradicional muestran, pues, las cantidades de dichos elementos ingeridos habitualmente en el consumo de aceituna Gordal verde estilo sevillano en presencia de solo 10% NaCl. Como es esperable, a medida que las concentraciones de NaCl en las mezclas disminuye, la propoción de Na en pulpa lo hace de manera paralela. Cada línea de contorno representa el conjunto de mezclas que da lugar a una misma reducción de Na en pulpa. Las líneas de contorno son casi paralelas a la base, lo que indica que, en la práctica hay poca diferencia en la sustitución del NaCl por cualquiera de las otras sales minerales. En el caso más extremo de sustituir el 60% del NaCl inicial en la salmuera por KCl o CaCl_2 (base de la gráfica triangular con una proporción de NaCl de solo el 4%) es posible obtener una reducción en la ingesta de Na que se acerca al 50%. Un efecto similar se ha observado en el contenido de Na en el mesocarpo de pepinillos encurtidos (Buescher y col., 1986).

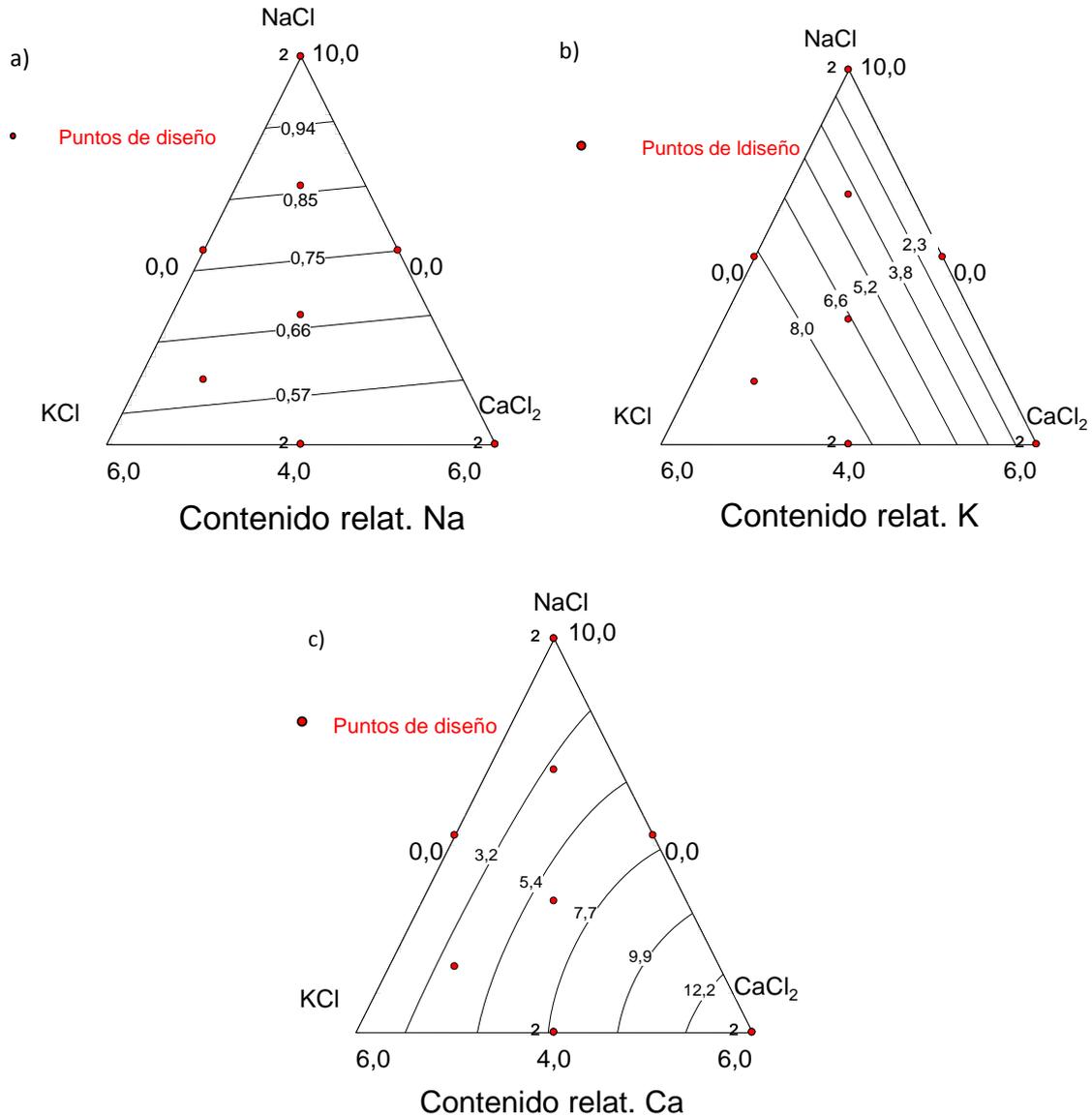


Figura 5.31. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) en pulpa de a) Na, b) K y c) Ca, en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Para el K, el modelo sugerido por la suma secuencial de cuadrados es de segundo grado ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,2778$). La ecuación matemática tiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo K en pulpa} = & +0,091 \cdot \text{NaCl} - 0,180 \cdot \text{KCl} + 0,126 \cdot \text{CaCl}_2 \\ & + 0,383 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{KCl} + 0,415 \cdot \text{KCl} \cdot \text{CaCl}_2 \end{aligned} \quad (5.16)$$

De acuerdo con la gráfica de contorno (Figura 5.31b), el contenido de K aumenta progresivamente en pulpa a medida que la concentración de la salmuera inicial se desplaza desde la línea que une los vértices NaCl y CaCl₂ hacia el vértice KCl. Las líneas de contorno son prácticamente paralelas a la base NaCl-CaCl₂, lo que indica que, de hecho, aparte de esa acción debida a la presencia simultánea de ambas sales, no existe una interferencia o sinergia destacada entre ambas sales, aunque, en teoría, la influencia de los términos de interacción lo indique y hayan quedado retenidos en el modelo. Sin embargo [Papoff y col. \(1997\)](#) si observan que el KCl es menos absorbido que el NaCl en las aceitunas y sugieren el uso de niveles mayores de KCl que de NaCl para obtener la misma concentración en la pulpa. Por otra parte, [Mulé y col. \(2000\)](#) observan un marcado incremento en el contenido de K en la pulpa al sustituir NaCl por KCl, tal como se desprende, igualmente, de la Figura 5.31b (se desciende a lo largo de la base NaCl-KCl). El aumento de K en pulpa por la utilización de mezclas de sales con KCl puede ser realmente muy destacado, llegando a multiplicar incluso hasta por 8 el contenido de K en las nuevas preparaciones. Ello, además, indica que no es necesario incrementar de una manera muy drástica la proporción de KCl en la salmuera inicial para conseguir resultados muy favorables desde el punto de vista nutricional.

En el caso del Ca, la suma secuencial de cuadrados sugiere un modelo cúbico ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,1945$) en el que, en aplicación del principio jerárquico, se retienen las interacciones de KCl con NaCl y CaCl₂. La ecuación transformada es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo Ca en pulpa} = & +0,104 * \text{NaCl} + 0,371 * \text{KCl} + 2,571 * \text{CaCl}_2 \\ & - 0,041 * \text{NaCl} * \text{KCl} - 0,060 * \text{NaCl} * \text{CaCl}_2 - 0,546 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 + 0,132 * \text{NaCl} * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 \end{aligned} \quad (5.17)$$

Como muestra la ecuación, la relación es compleja y da lugar a curvas radiales a partir del vértice del CaCl₂ (Figura 5.31c). El contenido de Ca aumenta a medida que la concentración de la salmuera inicial se desplaza desde la línea que une los vértices KCl y NaCl hacia el vértice CaCl₂ (Figura 5.31c). Las líneas de contorno son casi círculos concéntricos, lo que indica un efecto similar del Na y K sobre el contenido en Ca, cuando se mantienen las mismas proporciones, aunque consideradas conjuntamente lleguen a tener una cierta interacción para determinadas concentraciones. En realidad la SR, es una loma aplanada para concentraciones de las mezclas cercanas a la base

opuesta al vértice CaCl_2 , que se va transformando en una loma cuya cresta o parte más elevada para concentraciones aproximadamente similares de ambas sales. Existen numerosos trabajos en pepinillos (Walter y col., 1996; Buescher y col., 1986) en los que, asimismo, se describe que la absorción de Ca se ve afectada por el NaCl a concentraciones supra-osmóticas y que el Ca desplaza a otros cationes. El aumento del contenido en Ca de aceitunas en salmuera ha sido comentado igualmente por Mulé y col, (2000). La utilización de CaCl_2 en la salmuera de fermentación permite aumentar el contenido en Ca en la pulpa de la aceituna Gordal verde de manera muy clara, pudiéndose llegar hasta productos con contenidos 12 veces superiores al tradicional. Al igual que ocurría en el caso del K los resultados indican que existe también un margen muy amplio para la posible utilización de esta sal en las salmueras de fermentación.

5.2.1.1.4. Análisis sensorial

No se detectan fermentaciones anormales en ninguno de los tratamientos, aunque sí la presencia de ciertas sensaciones negativas. El sabor a tierra es el defecto más frecuente, 44% en el tratamiento 5, 17% en el tratamiento 9, y 6% en el tratamiento 15. Otros defectos son sabor a jabón (6% en tratamientos 5, 9 y 13) y humedad (6% en tratamiento 5). Sin embargo, siguiendo la normativa del IOOC (2010) sobre Metodología de Análisis Sensorial de Aceitunas de Mesa, las aceitunas de todos los tratamientos resultaron productos comerciales de calidad “Extra”. Las valoraciones de los panelistas se muestran en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Puntuaciones medias de los descriptores evaluados por el panel al final de la fermentación, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Dureza	Fibrosidad	Crujiente
1	6,2 (1,8)	6,8 (1,9)	3,3 (1,4)	5,4 (1,9)	4,2 (2,1)	4,5 (1,7)
2	7,0 (2,1)	6,9 (2,0)	3,2 (1,9)	2,0 (0,8)	2,1 (0,9)	1,4 (0,6)
3	6,9 (2,0)	6,7 (1,8)	5,4 (1,9)	7,1 (1,4)	6,0 (1,8)	6,1 (2,1)
4	6,5 (1,8)	7,3 (1,9)	3,9 (2,0)	5,7 (1,2)	4,9 (1,7)	4,2 (1,6)
5	6,3 (2,1)	7,1 (1,3)	3,8 (2,1)	7,2 (1,2)	6,4 (1,7)	6,2 (1,5)
6	5,7 (2,2)	6,8 (2,0)	4,0 (1,8)	6,9 (1,1)	5,3 (2,0)	5,4 (1,9)
7	6,4 (1,7)	6,6 (1,4)	4,3 (1,9)	7,4 (1,3)	6,1 (2,4)	6,9 (2,6)
8	5,9 (2,2)	5,1 (2,0)	4,4 (2,6)	1,7 (0,9)	2,2 (1,3)	1,4 (0,6)
9	6,4 (1,9)	6,6 (1,9)	4,4 (1,9)	3,4 (1,3)	4,0 (1,5)	2,6 (1,1)
10	5,1 (2,1)	4,7 (1,7)	7,9 (1,7)	8,4 (1,7)	6,1 (1,7)	6,2 (2,1)
11	6,1 (1,7)	6,6 (1,6)	4,6 (2,1)	7,7 (1,4)	6,4 (2,0)	7,0 (2,0)
12	5,7 (2,0)	5,7 (1,5)	7,7 (2,0)	8,4 (1,6)	6,7 (2,6)	7,0 (2,4)
13	5,7 (2,0)	6,7 (1,8)	4,5 (1,9)	7,2 (1,8)	5,8 (1,7)	6,1 (2,0)
14	5,3 (2,6)	4,5 (1,4)	3,1 (1,5)	2,5 (1,0)	2,7 (1,2)	2,1 (1,1)
15	5,9 (2,1)	7,2 (1,7)	4,4 (2,5)	7,1 (1,1)	6,6 (1,8)	6,9 (1,8)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

Del análisis, mediante CP, de las puntuaciones obtenidas del panel de catadores se desprende que el mismo tiene un comportamiento adecuado y muestra una buena capacidad general de valoración de los panelistas y la obtención de datos consistentes (datos no mostrados). Por tanto, los resultados se utilizan, una vez centrados y estandarizados (en el caso de los contenidos en metales) como respuesta para encontrar posibles relaciones de los mismos con las concentraciones iniciales de las diversas sales. Para el descriptor ácido se sugiere un modelo lineal ($p=0,0202$; falta de ajuste, $p=0,5793$), cuya fórmula es la siguiente:

$$\text{Ácido (centrado)} = +0,013 * \text{NaCl} + 0,128 * \text{KCl} - 0,124 * \text{CaCl}_2 \quad (5.18)$$

La gráfica de contorno (Figura 5.32) muestra que el NaCl, en el rango del 10% (vértice NaCl) hasta 4% (base del triángulo), es casi neutral con respecto a las puntuaciones para el sabor ácido, siempre que la tasa KCl/CaCl₂ sea constante. Los valores están cercanos a la media para una tasa 1:1 (KCl:CaCl₂); sin embargo, son más altos a medida que la composición inicial de las salmueras se desplaza hacia la izquierda

y aumenta la proporción de KCl. Aceitunas verdes fermentadas en KCl tienen valores más altos para el descriptor ácido que las fermentadas en NaCl o en una mezcla de ambas sales (Marsilio y col., 2002). La neutralización del exceso de sosa con CO₂ también aumenta el sabor ácido con respecto al control en aceitunas verdes (Marsilio y col., 2008).

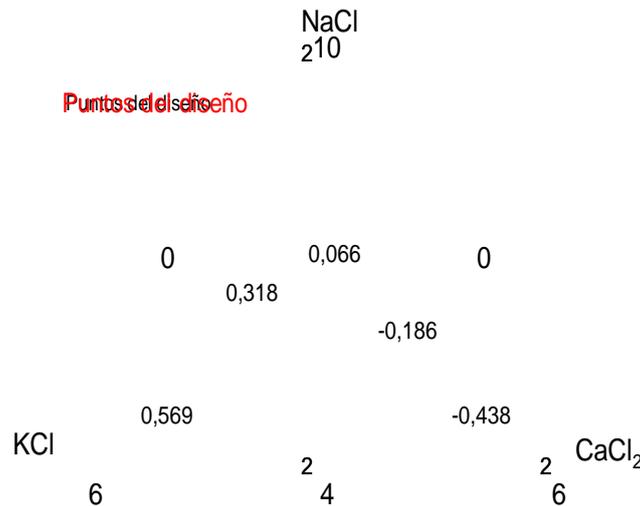


Figura 5.32. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Líneas de contorno de las puntuaciones centradas para el sabor ácido en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El modelo propuesto para el descriptor salado es lineal ($p=0,0037$; falta de ajuste, $p=0,3425$), y tiene la siguiente expresión:

$$\text{Salado (centrado)} = +0,062 * \text{NaCl} + 0,173 * \text{KCl} - 0,193 * \text{CaCl}_2 \quad (5.19)$$

Las líneas de contorno (Figura 5.33) son similares a las del sabor ácido. Para tasas constantes de KCl:CaCl₂, los cambios desde la concentración inicial del 10% hasta 4% de NaCl no tienen efecto sobre este descriptor. La presencia de CaCl₂ provoca un descenso en el sabor salado, mientras que la presencia progresiva de KCl lo aumenta. Tratamientos con CO₂ incrementaron también significativamente la puntuación para el sabor salado de aceitunas tipo verdes obtenidas a partir de variedades italianas (Marsilio y col., 2008).

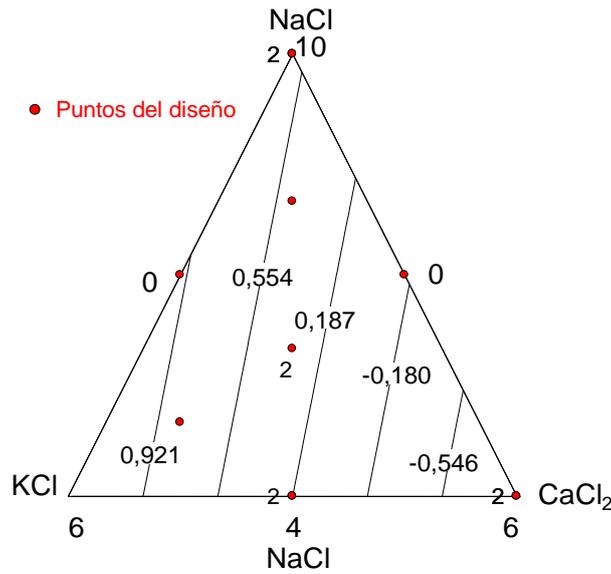


Figura 5.33. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en las valoraciones centradas del sabor salado en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Para el descriptor amargo, se propone un modelo cuadrático ($p=0,0001$; falta de ajuste, $p=0,9706$), cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{Amargo (centrado)} = -0,076 \cdot \text{NaCl} - 0,022 \cdot \text{KCl} + 1,184 \cdot \text{CaCl}_2 - 0,151 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{CaCl}_2 - 0,103 \cdot \text{KCl} \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.20)$$

Las líneas de contorno (Figura 5.34) no son paralelas a la línea que conecta los vértices NaCl-KCl sino que se inclinan a la derecha. Por lo tanto, la sustitución de NaCl con CaCl₂ tiene un mayor efecto en la sensación de amargo que cuando se sustituye por KCl. En el vértice CaCl₂ se observa la valoración estimada más alta para este descriptor, lo que indica la notable contribución del Ca al mismo. Este comportamiento contrasta con los resultados encontrados en la literatura, que atribuyen normalmente el sabor amargo al K (Marsilio y col., 2002). En cualquier caso, las mezclas situadas en la izquierda de la gráfica pueden ser buenas candidatas para elaborar aceitunas verdes sin un evidente efecto del Ca sobre el sabor amargo.

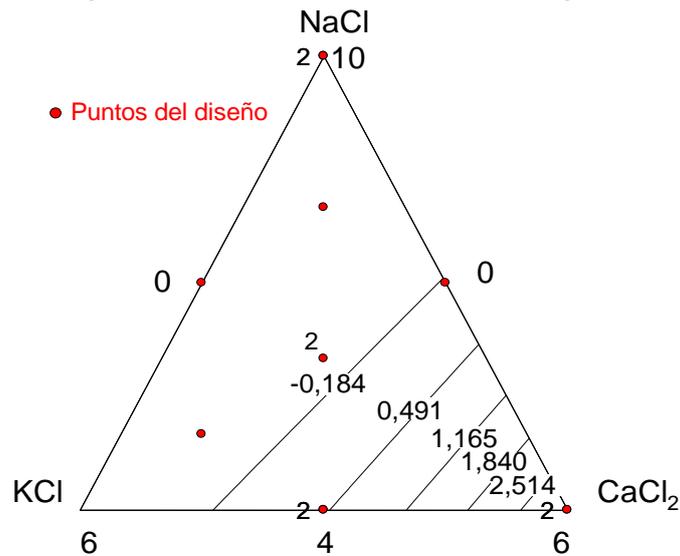


Figura 5.34. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en las valoraciones centradas del sabor amargo en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

En el caso de los descriptores dureza, fibrosidad y crujiente, todos ellos tienen un comportamiento similar en función de las sales. Por ello, y a modo de ejemplo, solo se presenta detalladamente el ajuste para la dureza. El modelo propuesto es lineal ($p=0,0017$; falta de ajuste, $p=0,4485$) y su ecuación matemática es la siguiente:

$$\text{Dureza (centrada)} = -0,093 \cdot \text{NaCl} + 0,266 \cdot \text{KCl} + 0,503 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.21)$$

El CaCl_2 tiene la mayor contribución a la dureza, lo que concuerda con la utilización del Ca para potenciar la consistencia en las aceitunas de mesa (Garrido Fernández y col., 1997) y otros vegetales fermentados (Fleming y col., 1993). Los valores en la gráfica de contorno (Figura 5.35) aumentan desde el vértice NaCl hacia la base (4% NaCl) cuando NaCl es sustituido por KCl y CaCl_2 . Sin embargo, muestran una inclinación con respecto a la base porque, para la misma proporción de KCl y CaCl_2 , el aumento es más rápido cuando se reemplaza con CaCl_2 . Los valores medios de dureza se obtienen para 8% NaCl + 1% KCl + 1% CaCl_2 (primer punto del diseño en la línea que conecta el vértice NaCl con el centro de la base). Si la proporción de la mezcla se mueve hacia el vértice NaCl hay una tendencia descendente en la dureza mientras que aumenta si se incrementa el contenido de KCl y CaCl_2 . La mejora de la dureza en aceitunas mediante la adición de Ca la estudian Jiménez y col. (1997), que

sugieren dos mecanismos diferentes de estabilización de la pared celular: uno mediante formación de complejos de coordinación (solo con Ca) y el otro mediante uniones puramente electrostáticas (Ca, Na y posiblemente K). El Ca también provoca una mejora en la dureza de aceitunas negras naturales (Kanavouras y col., 2005).

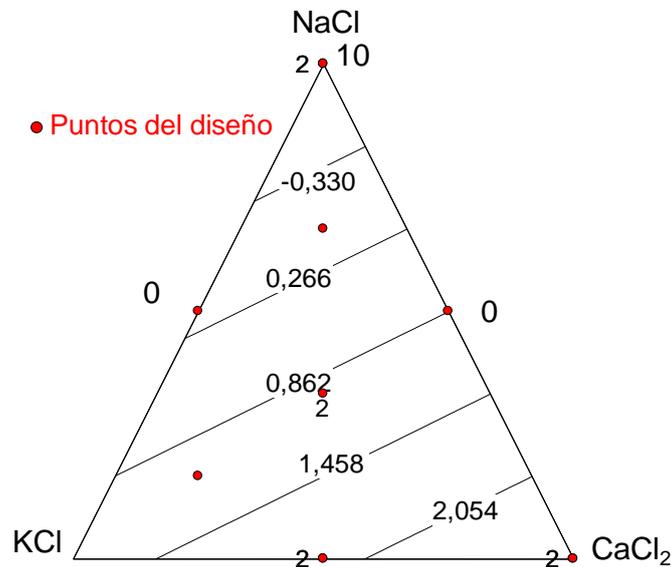


Figura 5.35. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Líneas de contorno de los valores centrados de dureza en función de la concentración iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La tendencia para la fibrosidad es similar a la observada para la dureza, pero con unas líneas de nivel menos inclinadas, lo que indica un efecto bastante similar del K y Ca sobre este descriptor. Sin embargo, la concentración de NaCl para una fibrosidad media es parecida a la de la dureza (aproximadamente el 8% de NaCl, 1% KCl y 1% CaCl₂). Cuando las proporciones de la mezcla se desplazan a valores por debajo de este punto, la sustitución progresiva del NaCl con KCl y CaCl₂ incrementa las valoraciones de fibrosidad, que alcanza su nivel máximo con un 4% de NaCl (base del triángulo).

En el caso del descriptor crujiente, las líneas de contorno prácticamente son paralelas a la base del triángulo, lo que indica unas contribuciones similares del KCl y CaCl₂. Sin embargo, Marsilio y col. (2002) no encuentran diferencias relativas a este descriptor al sustituir NaCl por KCl.

5.2.1.1.5. Análisis multivariante del contenido en minerales y descriptores sensoriales

Como puede verse en la Tabla 5.13, las puntuaciones asignadas a salado están relacionadas con las de ácido (coeficiente de correlación, 0,69), y el contenido en Na (0,63), y K (0,58). Por lo tanto, el sabor salado no solo se percibe en presencia de Na sino también cuando este se sustituye por K. El sabor amargo se relaciona con la dureza (0,59), fibrosidad (0,53) y principalmente al contenido en Ca (0,91). Finalmente la dureza está relacionada con la fibrosidad (0,97), crujiente (0,95), y la presencia de Ca (0,78). La fibrosidad (0,70) y crujiente (0,67) también está relacionados con el Ca. Los datos de estas relaciones sugieren la conveniencia de aplicar un análisis multivariante.

Tabla 5.13. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Correlación entre los descriptores sensoriales (valores centrados) y los contenidos de Na, K y Ca (mg/100g) en pulpa. Los valores R^2 significativos ($p \leq 0,05$) para las comparaciones se indican con *.

	Ácido	Salado	Amargo	Dureza	Fibrosidad	Crujiente	Na	K	Ca
Ácido	1,00								
Salado	0,69*	1,00							
Amargo	-0,43	-0,42	1,00						
Dureza	-0,25	0,22	0,59*	1,00					
Fibrosidad	-0,17	0,30	0,53*	0,97*	1,00				
Crujiente	-0,29	0,25	0,45	0,95*	0,95	1,00			
Na	0,35	0,63*	-0,47	-0,09	-0,03	-0,04	1,00		
K	0,45	0,58*	-0,14	0,39	0,44	0,36	-0,13	1,00	
Ca	-0,50	-0,28	0,91*	0,78*	0,70*	0,67*	-0,48	0,01	1,00

Mediante el análisis de CP, usando los tratamientos como variables, se detectan 3 CPs que engloban el 90,91% de la varianza total. La Tabla 5.13 muestra la relación entre los CP y las variables estudiadas. De la proyección de las variables originales sobre el plano formado por los dos CPs. (Figura 5.36a) puede deducirse que el CP 1 está relacionado negativamente con el sabor amargo, dureza, fibrosidad, crujiente, y contenido en Ca. Por lo tanto, podría ser renombrado como “propiedades relacionadas con el Ca”. El CP 2 está vinculado negativamente a las variables contenido en K, ácido

y salado (Figura 5.37a) y podría renombrarse como “propiedades relacionadas con el K”. El CP 3 tiene también una relación negativa con el Na (Tabla 5.14).

Tabla 5.14. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Relaciones, basadas en correlaciones, entre las variables sensoriales y contenido en minerales con los 3 primeros CPs.

Variables	CP 1	CP 2	CP 3
Ácido	0,463	-0,670*	0,313
Salado	0,097	-0,964*	-0,091
Amargo	-0,792*	0,388	0,036
Dureza	-0,932*	-0,324	-0,092
Fibrosidad	-0,891*	-0,413	-0,098
Crujiente	-0,875*	-0,357	0,171
Na	0,365	-0,553	-0,725*
K	-0,223	-0,709*	0,611
Ca	-0,928*	0,245	0,032

*Relación relevante. CP, componente principal.

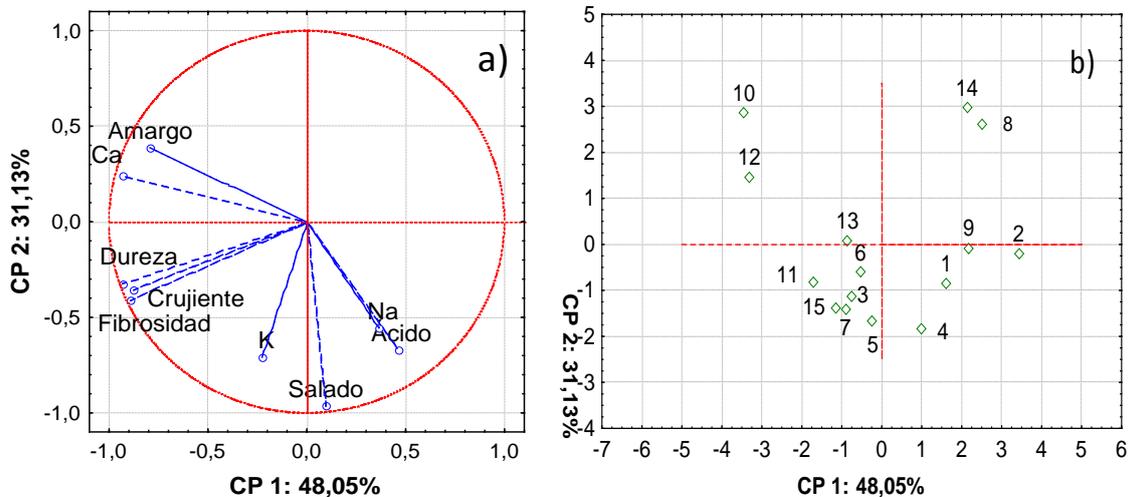


Figura 5.36. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. a) Proyección de las variables (descriptores sensoriales y contenidos en minerales) en el plano formado por los dos primeros CPs. b) Proyección de los casos en el plano formado por los dos primeros CPs.

La Figura 5.36a muestra que el contenido en K no está relacionado con el contenido en Ca o el sabor amargo porque forman un ángulo de $\sim 90^\circ$ (coseno $90^\circ=0$). Sin embargo, la dureza, fibrosidad y crujiente están relacionados de manera intensa

entre ellos. La proyección de los casos en el plano formado por los dos primeros CPs posiciona los diferentes tratamientos (Figure 5.36b). Debido a las correlaciones negativas entre los CPs y las variables, los tratamientos 10 y 12 se caracterizan por tener unos valores por encima de la media de dureza, fibrosidad, crujiente y amargo, así como por una elevada proporción de Ca. Sin embargo, tienen valores bajos de K en pulpa, y unas puntuaciones bajas para los descriptores ácido y salado. Los tratamientos 8 y 14 se caracterizan por valores bajos en las mismas variables y en salado y ácido así como por reducidos contenidos en K. Los tratamientos 9 y 1 tienen valores moderado-bajos de Ca en la pulpa y en los descriptores dureza, fibrosidad y crujiente.

5.2.1.2. Efectos sobre los microorganismos

El período de aparición de la población de enterobacterias (Tabla 5.15), en general, se retrasa en los tratamientos que contienen CaCl_2 tales como los números 4 (8:1:1), 5 (6:2:2), 6 (5:4:1), 10 (4:0:6) y 12 (6:2:2) y, particularmente en el 11 (7:0:3), en el que estos microorganismos se encuentran sólo de manera esporádica (tres muestras) y a niveles poblacionales muy bajos. Las poblaciones más altas ($\sim 6 \log_{10}$ ufc/mL) se encuentran en el tratamiento 7 (10:0:0) y en su duplicado ($\sim 5 \log_{10}$ ufc/mL), el número 1. Por el contrario, las poblaciones más bajas se observan en los tratamientos número 11 (7:0:3), 3 (4:3:3), 6 (5:4:1) y 12 (6:2:2), todos ellos con CaCl_2 . Este comportamiento es coherente con los resultados que se exponen más adelante en la fermentación de aceitunas partidas de la variedad Aloreña de Málaga y demuestra que la presencia de Ca puede ser útil para el control de las poblaciones de enterobacterias.

Tabla 5.15. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambio en las poblaciones de enterobacterias (\log_{10} ufc/mL) durante el proceso, según tratamientos.

Tiempo (h)	Tratamientos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
44	Nd	Nd	2,95	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	5,26	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2,20
68	Nd	2,00	2,20	3,76	Nd	Nd	Nd	Nd	5,97	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
92	1,60	2,00	2,30	3,95	Nd	Nd	Nd	4,09	6,09	2,68	3,22	Nd	Nd	4,43	Nd
140	1,78	3,98	3,48	3,62	Nd	Nd	2,26	2,90	5,43	3,16	4,69	Nd	2,98	3,06	4,10
188	3,48	4,58	4,65	3,58	2,96	3,59	Nd	4,59	4,97	4,06	4,74	1,90	Nd	3,43	Nd
236	4,58	3,20	Nd	3,85	3,64	3,86	Nd	2,97	3,90	Nd	2,08	2,38	Nd	3,79	3,68
308	4,92	4,06	2,15	5,23	4,70	4,17	2,93	4,59	4,79	2,00	3,20	2,15	Nd	4,13	3,78
380	5,19	3,37	3,30	5,78	4,99	4,68	4,59	5,18	4,73	4,21	4,45	4,39	Nd	3,72	3,71
548	4,36	Nd	2,75	4,00	3,54	4,87	3,86	3,08	4,86	3,94	3,86	3,10	Nd	4,68	3,26
740	3,37	3,16	2,94	3,57	2,75	3,78	3,85	4,55	4,44	4,00	3,84	2,87	2,60	3,11	3,16
1052	Nd	2,93	3,35	2,87	2,83	Nd	1,90	2,97	3,19	Nd	2,91	2,76	Nd	1,60	2,08
1388	Nd	2,30	Nd	Nd	3,24	1,90	Nd								
2228	2,79	Nd	2,73	Nd	2,34	2,64	Nd	Nd	Nd	2,83	Nd	Nd	2,48	1,90	2,15
3356	3,11	2,38	2,64	Nd	3,62	3,26	1,60	Nd	3,50	2,34	1,78	2,00	Nd	Nd	2,15

Notas: El error estándar ($< 0,5 \log_{10}$ ufc/mL) se ha omitido para facilitar la legibilidad. Nd, no detectado (por debajo del límite de detección).

No se han podido modelizar los cambios en la población de enterobacterias mediante ningún modelo primario. De los demás parámetros relacionados con su crecimiento, sólo la máxima población de enterobacterias (MPE) está relacionada con las concentraciones iniciales de NaCl, KCl y CaCl₂. El modelo propuesto es cuadrático ($p=0,0021$; falta de ajuste, $p=0,5542$) y la ecuación en valores físicos es la siguiente:

$$\text{MPE (log}_{10}\text{ ufc/mL)} = +0,579 \cdot \text{NaCl} + 0,494 \cdot \text{KCl} + 1,167 \cdot \text{CaCl}_2 - 0,211 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.22)$$

La representación gráfica de la ecuación muestra que la población alcanza su máximo cuando solo el NaCl está presente en las salmueras o también cuando se añade KCl o cualquier combinación binaria de este con las otras sales (Figura 5.37). Esto concuerda con los efectos similares obtenidos para el NaCl y KCl sobre *Listeria monocytogenes* (Bozaris y col., 2007) y otras especies de bacterias patógenas (Bidlas y

Lambert, 2008). Por el contrario, cuando la concentración de CaCl_2 es mayor, hay una disminución progresiva de la máxima población de enterobacterias. Las curvas de contorno muestran un valle centrado en la mezcla binaria de NaCl y CaCl_2 (aproximadamente 7% NaCl y 3% CaCl_2 , respectivamente (Figura 5.37)). Por lo tanto, la utilización de salmueras que contienen CaCl_2 retrasa la aparición de enterobacterias, por lo que puede disminuir marcadamente el riesgo de la alteración denominada alambrado, que se atribuye a estos microorganismos (Garrido Fernández y col., 1997).

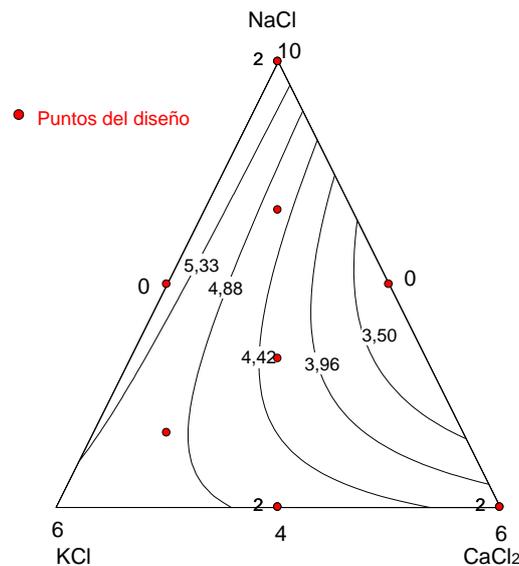


Figura 5.37. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Líneas de contorno en las que se representa la máxima población de enterobacterias (\log_{10} ufc/mL) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La Tabla 5.16 muestra los recuentos obtenidos para las poblaciones de levaduras a lo largo de la fermentación. Como puede observarse, el tiempo más largo de retraso en el crecimiento de estos microorganismos (380 h) se observa en el tratamiento 11 (7:0:3), pero también hay otros con períodos largos hasta la aparición de las mismas (140 h) tales como el 4 (8:1:1), 6 (5:4:1), 7 (10:0:0), 8 (4:0:6) y 10 (4:0:6), la mayoría de ellos con CaCl_2 en sus salmueras. Las poblaciones más elevadas de levaduras ($\sim 6,7 \log_{10}$ ufc/mL) se encuentran en los tratamientos 2 (4:3:3) y 3 (7:3:0), mientras que el mínimo al final del periodo de fermentación se encuentra en el 12 (6:2:2) (Tabla 5.16). Estas respuestas se enmarcan no sólo dentro del complejo mecanismo de la interacción de las levaduras con otros microorganismos, sino también en relación con sus necesidades

nutricionales, en las cuales la naturaleza cíclica del transporte de iones surge como el principal factor que regula el crecimiento en combinación con las interacciones entre elementos monovalentes y divalentes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en este caso) (Jones y Gadd, 1990).

Tabla 5.16. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en las poblaciones de levaduras (\log_{10} ufc/mL) a lo largo del proceso, según tratamientos.

Tiempo (h)	Tratamientos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
44	Nd	Nd	2,98	2,51	2,08	Nd									
68	Nd	1,90	2,51	Nd											
92	3,16	2,34	2,62	Nd											
140	1,90	4,13	4,28	1,60	Nd	2,48	Nd	Nd	Nd	Nd	3,68	Nd	Nd	2,08	2,73
188	3,63	4,92	5,14	3,46	3,11	3,54	2,15	4,54	4,34	1,90	5,09	3,08	2,26	3,59	4,16
236	4,58	5,09	4,64	3,89	3,40	3,90	Nd	4,93	4,30	Nd	4,58	Nd	Nd	3,84	3,64
308	4,83	4,56	4,06	5,16	4,62	4,30	3,09	4,83	4,83	2,00	3,87	2,66	Nd	4,26	3,98
380	5,03	3,33	3,74	5,33	4,64	4,90	4,90	4,68	4,75	4,30	4,83	4,58	2,38	3,67	3,61
548	6,00	5,71	4,60	6,66	3,92	5,02	3,59	3,33	4,99	4,72	4,41	5,84	3,67	4,51	4,28
740	5,97	5,02	5,40	5,03	4,87	5,13	6,41	4,91	6,91	5,39	6,91	4,64	5,21	4,85	3,77
1052	4,10	4,00	6,73	3,75	5,06	4,53	4,72	3,23	5,62	5,02	4,89	3,53	4,58	4,33	3,19
1388	5,18	3,60	5,22	2,99	4,20	4,76	3,60	3,22	5,32	5,28	4,45	4,64	5,15	4,08	2,78
2228	3,97	4,30	3,18	3,18	3,85	3,18	3,42	2,98	3,82	2,97	3,00	4,06	3,82	3,03	2,91
3356	4,88	3,32	2,93	5,07	3,81	4,83	4,19	2,72	5,87	5,25	2,92	3,60	2,92	2,56	2,87

Notas: El error estándar ($< 0,5 \log_{10}$ ufc/mL) se han omitido para facilitar la legibilidad. Nd, no detectado.

Los datos de crecimiento y muerte de las poblaciones de levaduras no se han podido ajustar a ningún modelo primario. Por ello, los parámetros elegidos para el estudio global de la evaluación de las levaduras mediante análisis multivariante (ver más adelante) han sido: el área obtenida bajo la curva de los recuentos en función del tiempo, el período transcurrido hasta la aparición de las levaduras (YSP), la población máxima de levaduras (MaxYp), y la población mínima de levaduras al final del periodo de fermentación (MinYp).

Inicialmente, no se detectan BAL en las salmueras de ninguno de los tratamientos durante las primeras 20 h de fermentación (Tabla 5.17), pero la adición del cultivo iniciador aumenta considerablemente su población hasta $\sim 6 \log_{10}$ ufc/mL. Después de la inoculación, algunos tratamientos sufren un descenso del inóculo, salvo

en los casos 2 (4:3:3), 5 (6:2:2), 8 (4:0:6), 9 (7:0:3), 10 (4:0:6), y 11 (7:0:3), que se caracterizan por la presencia de CaCl₂ en diferentes proporciones. La ausencia de un descenso en la población inicial del inoculo en los tratamientos 7, 8 y 9 puede ser atribuido al pH inicial más bajo que presentan las experiencias con CaCl₂. En general, después de un período de latencia más o menos extenso, *L. pentosus* crece en todos los tratamientos, observándose diferencias significativas entre los diferentes momentos de muestreo. Sin embargo, se considera que un estudio mediante análisis multivariante de los cambios totales en las BAL, mediante la obtención del área bajo la curva en función del tiempo, la población máxima de BAL obtenida (MaxLABp) y la población mínima de BAL al final de la fermentación (MinLABp) podría ser muy informativo sobre la evolución global de estos microorganismos.

Tabla 5.17. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Cambios en las poblaciones de BALs (log₁₀ ufc/mL) en función del tiempo a lo largo del proceso, según tratamientos.

Tiempo (h)	Tratamientos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
44	5,87	5,88	5,82	5,77	5,78	5,85	5,74	5,66	5,66	5,85	5,81	5,83	5,79	5,18	5,80
68	5,63	5,67	6,43	5,52	5,77	6,45	6,39	5,19	5,40	5,87	6,55	6,14	6,23	5,08	5,18
92	6,54	7,14	6,81	5,43	6,63	6,92	6,88	7,06	5,08	6,65	6,85	6,71	6,87	7,11	6,81
140	7,31	7,58	7,06	7,63	7,08	6,97	7,08	7,86	7,85	6,83	6,92	6,64	7,09	7,80	7,09
188	7,64	7,99	7,05	7,65	7,09	7,11	7,23	8,00	7,36	7,04	7,11	7,20	7,06	7,81	7,11
236	7,76	7,84	6,90	7,79	7,03	6,94	7,30	8,11	7,69	6,58	6,87	6,50	6,87	7,91	7,02
308	7,42	7,68	7,13	7,68	7,20	7,28	7,10	8,21	7,66	6,75	7,13	6,87	6,94	7,69	6,93
380	7,46	7,84	7,11	8,13	6,82	6,88	7,56	7,12	7,38	6,16	7,11	6,66	7,31	8,56	7,30
548	7,18	7,42	6,83	7,65	6,66	6,52	6,18	7,39	7,19	6,07	6,85	5,26	6,49	7,32	6,55
740	7,78	7,98	7,13	7,57	6,92	6,85	6,05	7,83	7,80	3,33	5,88	4,72	5,97	6,95	5,75
1052	5,99	5,88	6,31	5,91	5,91	5,62	5,81	6,21	6,51	3,30	5,14	3,30	5,56	6,12	5,61
1388	5,85	5,36	6,49	5,81	5,66	5,16	5,37	5,98	6,41	2,30	5,19	5,29	5,33	5,92	5,11
2228	4,65	4,78	6,00	4,03	5,29	5,05	4,85	5,98	5,72	3,44	5,10	5,07	5,16	6,13	4,27
3356	4,86	3,32	5,09	3,76	5,42	5,56	5,23	6,26	5,53	3,26	5,33	4,46	5,17	5,21	4,15

Notas: Los errores estándar (< 0,5 log₁₀ ufc/mL) se han omitido para facilitar la legibilidad. Nd, no detectado.

5.2.1.2.1. Análisis multivariante de los parámetros relacionados con el crecimiento de los microorganismos

Como se ha comentado anteriormente, las siete variables de crecimiento analizadas (período de aparición de las levaduras (YSP), población de levaduras máxima (MaxYp), población mínima de levaduras (MinYp), área bajo la curva de levaduras, población máxima de BAL (MaxLABp), población mínima de BAL (MinLABp), y el área bajo la curva de BAL, se sometieron a un análisis multivariante. Los resultados muestran que todas las variables pueden agruparse en sólo tres CP que engloban el 80.43% de la varianza total. La proyección de las variables en el plano de los dos primeros CP (Figura 5.38a) muestra que MaxYp, MinYp, y el área bajo las curvas de población de las levaduras en función del tiempo están estrechamente relacionados entre ellos y positivamente con el CP1, mientras que los mismos parámetros de BAL están negativamente relacionados con el CP2. Por el contrario, YSP se relaciona negativamente con el CP1 y con el resto de las variables de las levaduras, pero no con las de las BAL. Por lo tanto, el CP1 puede substituir a las variables poblaciones máximas, mínimas, y área bajo la curva de la población de levaduras y ser re-nombrado como "factor de crecimiento de la levadura" (YGF). De manera similar, el CP2 puede substituir a las mismas variables para las BAL y se denomina "factor de crecimiento de BAL" (FCB).

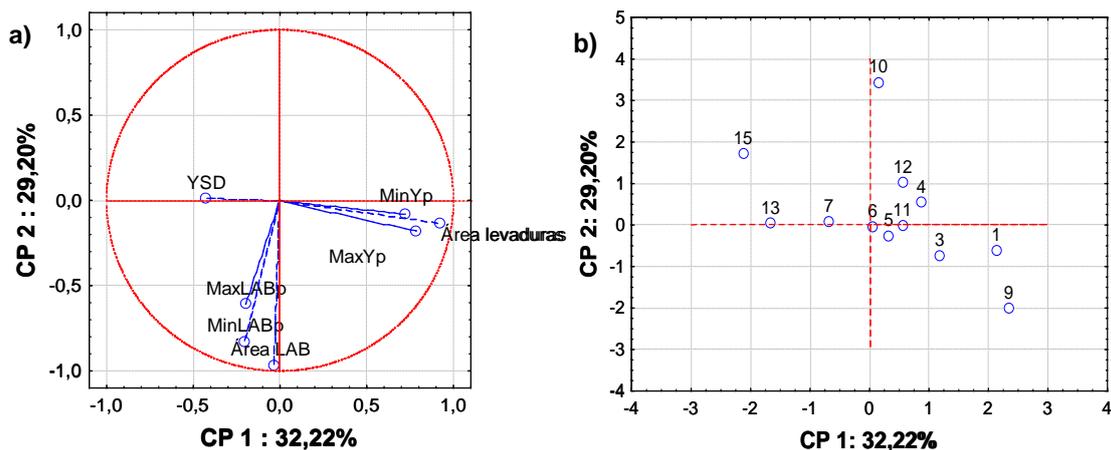


Figura 5.38. Fermentación de aceituna Gordal verde estilo sevillano. Análisis de CP de las variables relacionadas con el crecimiento de levaduras y BAL. a) Proyección de las variables en el plano de los dos primeros factores. b) Proyección de los casos en el plano formado por los dos primeros CP.

Con respecto al poder discriminante y las tendencias observadas entre los diferentes procesos aplicados (Figura 5.38b), el tratamiento 10 (4:0:6) tiene el menor crecimiento general de BAL (teniendo en cuenta la relación negativa con las variables originales), y un crecimiento moderado de levaduras, mientras que el tratamiento 15 (6:2:2) también muestra características que indican un débil crecimiento de BAL, pero aún más bajo de levaduras. Por el contrario, el tratamiento 9 (10:0:0) se caracteriza por un alto crecimiento de levaduras y BAL, pero su duplicado (tratamiento 1) muestra unos niveles altos de levaduras pero solo levemente por encima del promedio de BAL. El tratamiento 13 (7:0:3) se caracteriza por un bajo crecimiento de levaduras e intermedio de BAL. Por lo tanto, la gráfica permite una fácil y rápida discriminación de los tratamientos en función de su comportamiento general con respecto al crecimiento de las levaduras y BALs en las respectivas salmueras.

5.2.1.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras y BAL

Los estudios moleculares realizados sobre la población de BAL muestran que el único lactobacillo presente en esta fermentación de aceituna Gordal estilo sevillano es la cepa inoculada de *L. pentosus* (TOMC LAB1).

Por otra parte, la levadura más abundante al final de la fermentación es *Pichia galeiformis*, que es la única especie encontrada en los tratamientos 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10 y 12, pero que está acompañada por *Candida boidinii* en los tratamientos 3 (10% de frecuencia), 5 (10% de frecuencia), y 11 (50% de frecuencia) o *Wickerhamomyces anomalus* en el tratamiento 7 (10%). Por lo tanto, la biodiversidad de las levaduras al final del proceso es bastante limitada (aunque mayor que las de las BAL) y, aparentemente, no hay relación alguna entre las especies presentes y la composición inicial de la salmuera. *P. galeiformis* ha sido aislada recientemente, con una población relativamente alta, en el procesado de aceitunas negras naturales (Rodríguez-Gómez y col. 2010), mientras que *W. anomalus* y *C. boidinii* son dos especies de levaduras ampliamente aisladas de diferentes procesos de aceitunas de mesa (Arroyo-López y col., 2008b).

5.2.2. Fermentación de aceitunas de mesa de la variedad Manzanilla al estilo sevillano

5.2.2.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.2.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

El pH en los momentos iniciales está comprendido entre 8,76 (tratamiento 4, 7:3:0) y 6,14 (tratamiento 15, 6:2:2). Estos valores relativamente elevados se deben al exceso de alcali que queda en el interior de los frutos tras la inmersión en lejía (solución de NaOH) (Garrido Fernández y col., 1997). Posteriormente, todos los tratamiento sufren un marcado descenso del pH, estabilizándose a partir de las 500 h (Figura 5.39).

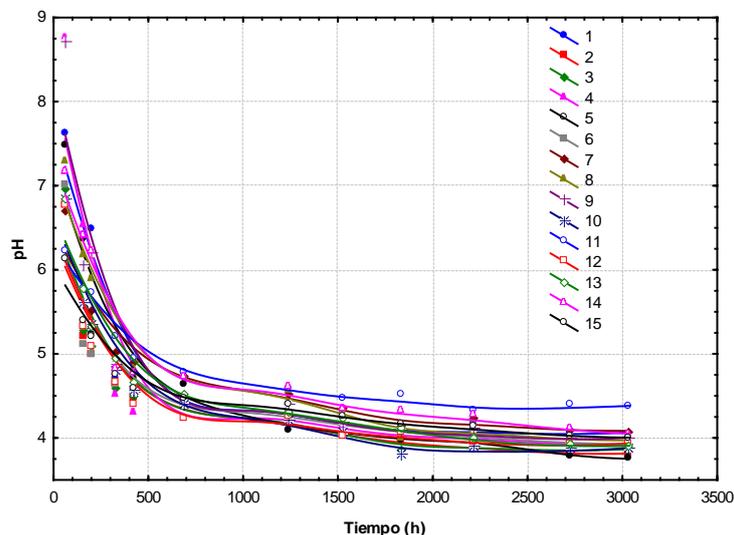


Figura 5.39. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Cambios en el pH de la salmuera en función del tiempo, según tratamientos.

Los valores finales de pH tampoco están relacionados con las concentraciones iniciales de las diversas sales, con lo que el estudio del área obtenida bajo la curva de pH en función del tiempo es una alternativa apropiada para representar los cambios de este parámetro en el transcurso de la fermentación. Dichas áreas están relacionadas con las concentraciones iniciales de sales mediante un modelo lineal ($p=0,0329$; falta de ajuste, $p=0,9028$) que toma la siguiente expresión:

$$\text{Área pH} = +1300 \cdot \text{NaCl} + 1375 \cdot \text{KCl} + 1222 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.23)$$

Como puede apreciarse, todos los componentes muestran un comportamiento similar, aunque el mayor efecto es el provocado por el KCl. En la gráfica de líneas de contorno (Figura 5.40) se puede observar que la presencia de CaCl_2 da lugar, globalmente, a un mayor descenso general del pH, lo que es favorable desde el punto de vista de la conservación. Sin embargo, el KCl tiene un efecto opuesto, es decir, produce, en general, valores de áreas de pH más elevadas (la curva de pH está más alta durante toda la fermentación). Finalmente, la concentración de NaCl parece carecer de efecto en este aspecto.

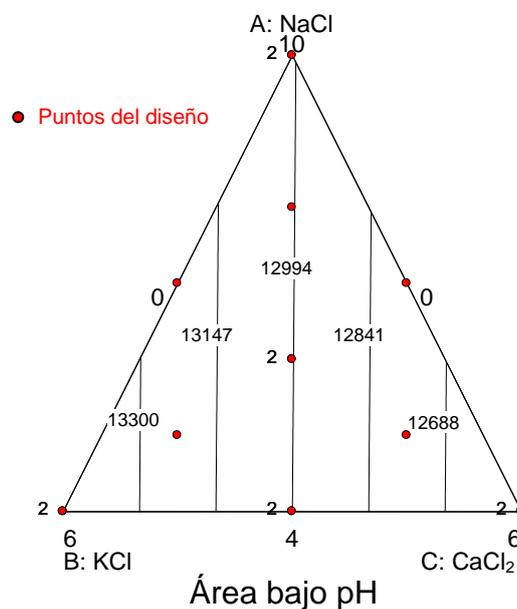


Figura 5.40. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de líneas de contorno del área bajo la curva de pH a lo largo del proceso, en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Respecto a la acidez libre al final de la fermentación (3038 h), los valores oscilan entre 0,56g ácido láctico/100m salmuera (tratamiento 14, 4:6:0) y 1,13 g ácido láctico/100m salmuera (tratamiento 5, 8:1:1) (Figura 5.41), aunque no se puede relacionar con las distintas concentraciones iniciales de sales, al igual que ocurre con la velocidad de formación del ácido.

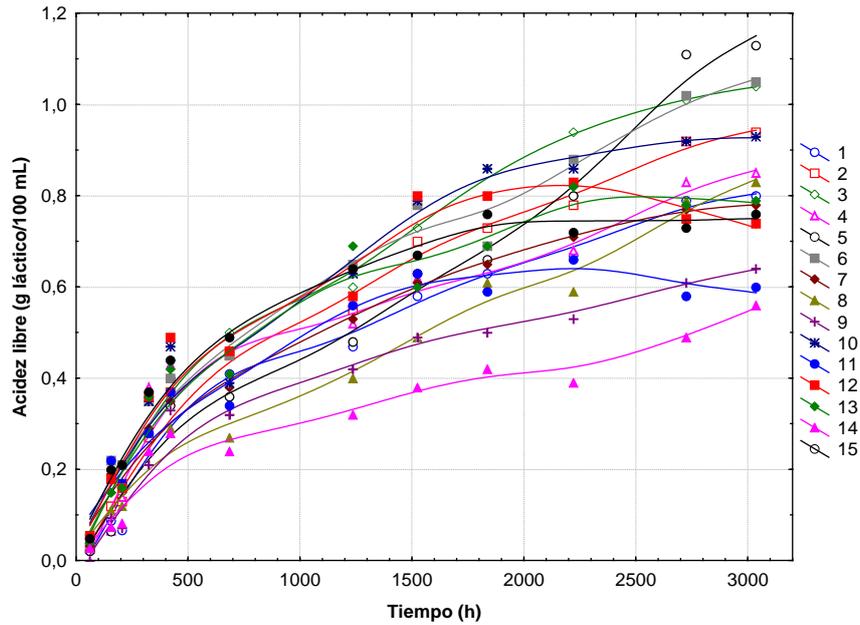


Figura 5.41. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Evolución de la acidez libre de la salmuera, expresada como g de ácido láctico por 100 mL, en función del tiempo, según tratamientos.

En cuanto al estudio de las áreas bajo las curvas de acidez libre en función del tiempo, la suma secuencial de cuadrados sugiere que las mismas están relacionadas con las concentraciones iniciales de las diversas sales mediante un modelo lineal ($p=0,0328$; falta de ajuste, $p=0,6698$) que tiene la siguiente expresión:

$$\text{Área acidez libre} = +163,8 \cdot \text{NaCl} + 130,4 \cdot \text{KCl} + 235,3 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.24)$$

En la ecuación se puede apreciar que el efecto de las diferentes sales (a juzgar por los coeficientes de la ecuación) es $\text{CaCl}_2 > \text{NaCl} > \text{KCl}$. En la gráfica de líneas de contorno (Figura 5.42) se observa que el área es mayor cuanto más se acerca la mezcla inicial al vértice CaCl_2 , lo que indica un comportamiento opuesto al seguido por pH, como es lógico. Las curvas más bajas, globalmente, se encuentran en el vértice KCl en el que hay una ausencia total del CaCl_2 . Es decir, la presencia de CaCl_2 favorece la formación de una mayor acidez libre. Por el contrario, la presencia de KCl produce un efecto contrario. Por su parte, el contenido de NaCl es poco influyente puesto que las líneas de contorno son prácticamente perpendiculares a la base.

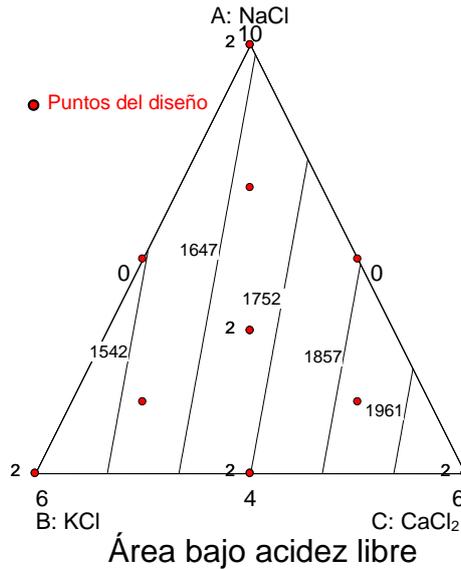


Figura 5.42. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de líneas de contorno del área bajo la curva de la acidez libre a lo largo del proceso en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La acidez combinada en los muestras iniciales está comprendida entre 0,028 Eq/L (tratamiento 2, 5:1:4) y 0,092 Eq/L (tratamiento 1, 10:0:0). Posteriormente, todos los tratamiento sufren un marcado ascenso de la acidez combinada, excepto 4, 8, 9 y 14, en los que este aumento es más moderado (Figura 5.43a). A partir de las 700 h, hay una estabilización de los niveles de este parámetro.

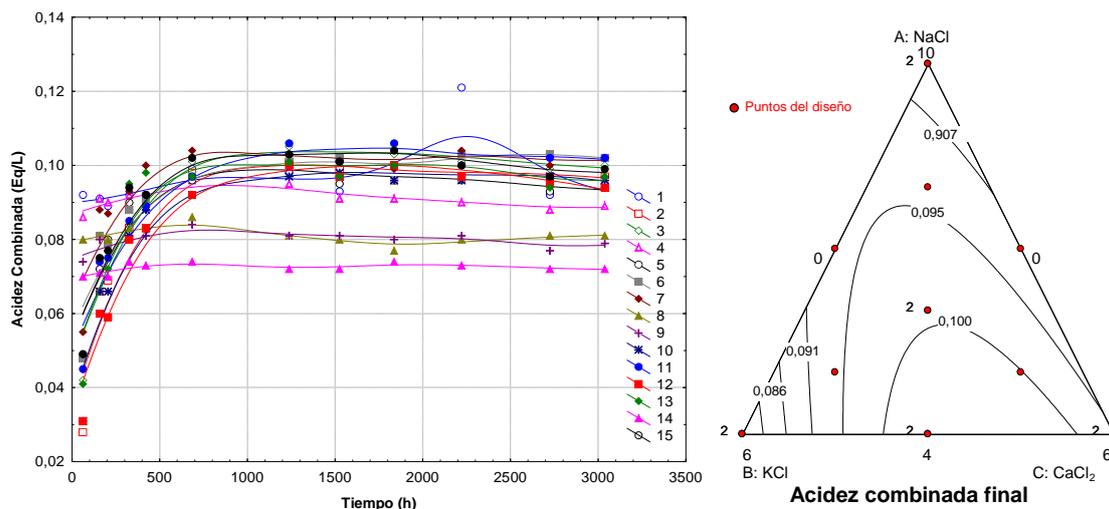


Figura 5.43. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. a) Cambios en la acidez combinada durante el proceso, según tratamientos. b) Gráfica de contorno de la acidez combinada final (en Eq/L) en función de las concentraciones iniciales de sales; los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El modelo propuesto para la acidez combinada final (Eq/L) es cuadrático ($p=0,0058$; falta de ajuste, $p=0,6284$) y tiene la siguiente expresión:

$$\text{Acidez combinada final} = +0,0088*\text{NaCl} + 0,0023*\text{KCl} + 0,0101*\text{CaCl}_2 + 0,0012*\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,0018*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \quad (5.25)$$

Como se observa, la mayor influencia sobre la misma se debe al efecto lineal del CaCl_2 , mientras que las dos interacciones tienen un efecto similar. De la gráfica de líneas de contorno (Figura 5.43b) se desprende que la superficie de la acidez combinada implica una especie de loma inclinada, que presenta su valor más elevado cuando la concentración de NaCl es 4% y las de KCl y CaCl_2 , aproximadamente 4 y 2% respectivamente. Sin embargo, dado que el valor la acidez combinada interesa que sea lo más bajo posible, dicho objetivo solo se alcanzaría a una concentración de 4% NaCl y 6% KCl y completa ausencia de CaCl_2 . Por tanto, la adición de CaCl_2 no tiene un efecto favorable sobre este parámetro en aceituna Manzanilla.

5.2.2.1.2. Color

En la Tabla 5.18 se muestran los valores obtenidos al final de la fermentación para cada uno de los parámetros de color analizados.

Tabla 5.18. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Valores de los diferentes parámetros relacionados con el color al final del proceso, según tratamientos.

Tratamientos	Índice color	L*	a*	b*
1	26,37	52,10	3,20	37,38
2	28,99	55,19	3,05	39,55
3	28,64	54,90	2,50	39,91
4	26,79	53,46	3,00	39,14
5	26,55	53,84	2,40	39,83
6	28,72	55,40	2,25	41,58
7	29,67	56,01	2,13	42,26
8	26,29	52,92	2,46	39,17
9	25,54	51,99	2,95	37,36
10	30,14	55,95	2,67	42,22
11	31,36	54,02	1,70	42,86
12	32,86	57,91	2,37	43,58
13	31,99	58,25	2,00	39,79
14	25,82	52,99	2,44	40,03
15	30,68	57,25	2,07	40,90

El índice de color se ajusta correctamente a las concentraciones iniciales de las diversas sales mediante un modelo lineal ($p=0,0025$; falta de ajuste, $p=0,3569$), tomando su ecuación la siguiente expresión:

$$\text{Índice de color} = +2,662 \cdot \text{NaCl} + 2,726 \cdot \text{KCl} + 3,602 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.26)$$

El mayor efecto es el ejercido por el CaCl_2 , seguido por el KCl y, por último, el NaCl . Dado que cuanto más elevado es este índice mejor es el color, se deduce que el mejor color se obtiene en el vértice CaCl_2 (Figura 5.44), mientras que los peores se obtendrían para las mezclas que solo incluyen NaCl y KCl . A medida que este se va sustituyendo por CaCl_2 (líneas de contorno casi paralelas al lado NaCl-KCl) el índice de color va mejorando (Figura 5.44).

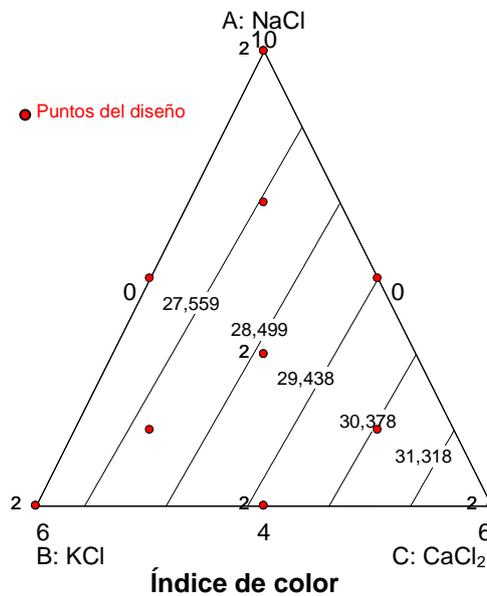


Figura 5.44. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno del índice de color al final del proceso, en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.2.2.1.3. Textura instrumental

Los datos de textura, medida objetivamente mediante el equipo Instron, muestran que los valores más bajos corresponden a los tratamientos 8 (4:6:0) y 4 (7:3:0), mientras que los más elevados se presentan en los tratamientos 12 (4:0:6) y 2 (5:1:4) (Tabla 5.19). Para la obtención de la ecuación de la textura intrumental en

función de las concentraciones iniciales de las sales en la salmuera inicial, se utiliza un modelo cúbico especial ($p > 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,09997$). La ecuación matemática del mismo es la siguiente:

$$\text{Textura instrumental} = +0,209*\text{NaCl} + 0,169*\text{KCl} + 0,294*\text{CaCl}_2 - 0,026*\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,018*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 - 0,264*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 + 0,078*\text{NaCl}*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \quad (5.27)$$

La cual permite predecir la textura instrumental que podría obtenerse tras la fermentación en función de las concentraciones iniciales de las diferentes sales. En dicha ecuación, se observa que los coeficientes lineales para todas las sales son muy similares, aunque el del CaCl_2 es el más alto. Entre las interacciones, la más destacada es KCl-CaCl_2 .

Tabla 5.19. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Valores medios de textura instrumental (N/100g) y desviaciones estándares, según tratamientos.

Tratamiento	Textura instrumental	
	Media	Desviación estándar
1	2,21	0,61
2	3,00	0,56
3	2,79	0,84
4	1,23	0,65
5	2,92	0,48
6	2,69	0,53
7	2,48	0,73
8	1,09	0,32
9	1,87	0,38
10	2,92	0,48
11	2,40	0,62
12	3,27	0,58
13	2,71	0,77
14	1,30	0,40
15	2,82	0,52

Las líneas de contorno de la Figura 5.45 muestra claramente que los valores más elevados de textura instrumental se consiguen en presencia de CaCl_2 . Por otra parte, la progresiva sustitución de NaCl por KCl no tiene apenas influencia sobre la textura. Las líneas de contorno muestran que los valores más bajos se obtienen en torno al centro de

la línea que une el vértice NaCl y KCl. En cualquier caso, el efecto del CaCl₂ se aprecia en una amplia meseta que se extiende desde el centro del diseño, aproximadamente 6% NaCl, 2% KCl y 2% CaCl₂, hasta el vértice CaCl₂, en el que la composición de la salmuera inicial es 4% NaCl y 6% CaCl₂.

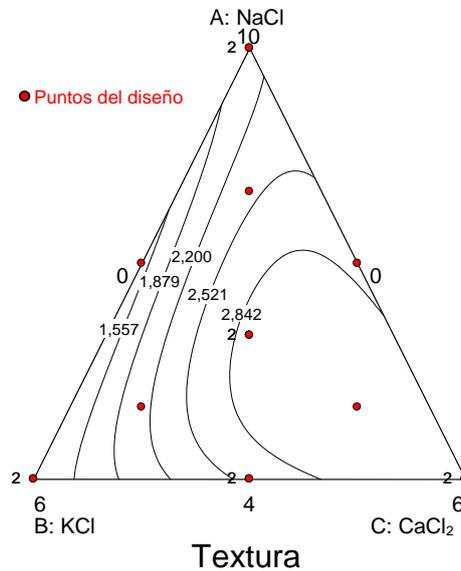


Figura 5.45. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Textura instrumental (N/100g) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.2.2.1.4. Contenido de minerales en pulpa

Al final del proceso fermentativo a los frutos se les determina las concentraciones en pulpa de los minerales implicados en el diseño (Moreno Baquero, 2011). Los contenidos de los mismos relativos al proceso tradicional, según tratamientos, se recogen en la Tabla 5.20.

Tabla 5.20. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Contenido (con respecto al proceso tradicional) de Na, K y Ca en pulpa, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido relat. Na	Contenido relat. K	Contenido relat. Ca
1	0,94	1,07	0,92
2	0,49	3,56	9,68
3	0,36	10,12	7,74
4	0,64	10,36	1,08
5	0,75	3,63	4,27
6	0,52	6,49	5,58
7	0,51	13,22	4,03
8	0,41	24,22	1,10
9	1,06	0,93	1,08
10	0,39	1,29	13,03
11	0,39	10,18	7,73
12	0,38	0,97	12,81
13	0,65	1,10	7,85
14	0,47	23,66	0,84
15	0,58	7,46	5,61
Media trad.*	1828 (81)	74 (4)	62 (4)

Nota: * Media (mg/100g pulpa) del proceso tradicional, desviación estándar entre paréntesis.

Cuando las concentraciones relativas de Na se utilizan como respuesta en el análisis del diseño experimental, el modelo sugerido para estimar el contenido relativo de Na en pulpa en función de las concentraciones de las sales en la salmuera inicial es lineal y significativo ($p > 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,6243$). El mismo tiene la siguiente expresión en valores físicos:

$$\text{Contenido relat. Na en pulpa} = +0,097 * \text{NaCl} + 0,004 * \text{KCl} - 0,004 * \text{CaCl}_2 \quad (5.28)$$

En dicha ecuación, los coeficientes de KCl y CaCl₂ indican que ambas sales tiene el mismo efecto, siendo estos mucho más bajos que el del NaCl. Al igual que ocurría en la variedad Gordal, la interpretación de estas ecuaciones se realiza de manera más sencilla e intuitiva en forma gráfica, tal como puede verse en la Figura 5.46. De este modo, a medida que el NaCl se va sustituyendo por otras sales (se desciende desde el vértice NaCl hacia la base del diagrama triangular, disminuye la concentración

relativa de Na en la pulpa, indicando la efectividad de la operación. Las líneas de contorno son paralelas entre si, debido a que el modelo es lineal, aunque esten ligeramente inclinadas, lo que indica que el K sustituye al Na de manera algo más eficiente que el Ca. En cualquier caso, se pone de manifiesto, que es posible disminuir la concentración de Na en la pulpa de la aceituna verde estilo sevillano de la variedad Manzanilla a menos de la mitad de la concentración de los procesos tradicionales mediante la sustitución parcial de la sal común por KCl y CaCl₂. Esta gráfica es muy semejante a la que se obtuvo para Gordal, aunque la sustitución del sodio en Manzanilla parece algo más eficiente, lo que posiblemente se deba al menor volumen de esta variedad.

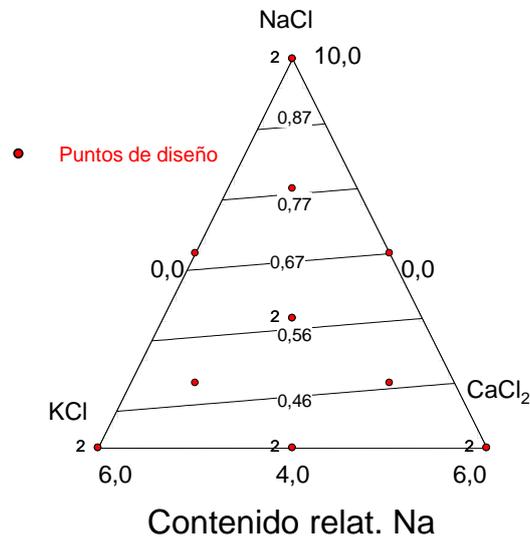


Figura 5.46. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Contenido (relativo al proceso tradicional) de Na en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El modelo sugerido por la suma de cuadrados para K es cuadrático ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,2660$). De esta forma, la ecuación final que expresa la concentración relativa de K en la pulpa en función de las concentraciones iniciales de sal tiene la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relat. K en pulpa} = & +0,106 * \text{NaCl} + 4,873 * \text{KCl} + 0,125 * \text{CaCl}_2 \\ & - 0,244 * \text{NaCl} * \text{KCl} - 0,268 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 \end{aligned} \quad (5.29)$$

La existencia de coeficientes negativos en algunas interacciones indica que tanto la presencia de sales de Na como de Ca, disminuyen la proporción de K, cosa, por otra parte, lógica. La interpretación de la ecuación mediante gráfica triangular y las correspondientes curvas de nivel, se muestra en la Figura 5.47. Como puede apreciarse, las líneas de contorno son paralelas a la base formada por la línea que une los vértices NaCl y CaCl₂, lo que indica que, en la práctica, el K sustituye tanto al Na como al Ca de manera similar. La Figura tiene, asimismo, la misma forma que la que se encontró para Gordal verde fermentada al estilo español. La adición de KCl a la salmuera inicial puede permitir el aumento del contenido en K dentro de un amplio margen pudiéndose llegar incluso a más de 20 veces el contenido inicial, lo que representa aumentar de manera importante la ingesta diaria de K con la toma de solo unas aceitunas. Dada la magnitud del incremento, puede existir un rango muy amplio para la aplicación de KCl en la fermentación de aceitunas verdes.

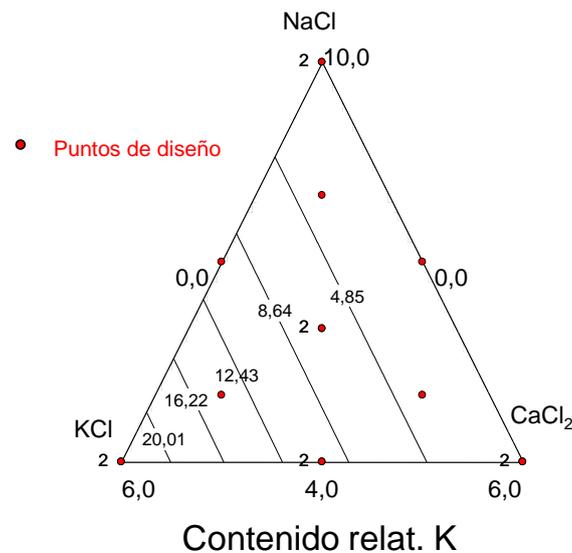


Figura 5.47. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Contenido (relativa al proceso tradicional) de K en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Por último, el modelo para expresar el contenido relativo de Ca en pulpa en función de las proporciones iniciales de sales es también cuadrático y significativo ($p < 0,001$); pero, debido a la dispersión de los datos, la falta de ajuste es también significativa ($p = 0,0076$). El mismo, no obstante, explica una proporción elevada de la varianza ($R^2 = 0,9945$) y muestra una elevada precisión (65,46). Por tanto, puede resultar

útil para predecir la tendencia en el contenido relativo de Ca. La ecuación matemática del mismo en valores físicos es la siguiente:

$$\text{Contenido relat. Ca en pulpa} = +0,114*\text{NaCl} + 0,105*\text{KCl} + 1,636*\text{CaCl}_2 + 0,108*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 + 0,088*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \quad (5.30)$$

La interpretación en forma de gráfica de esta ecuación se recoge en la Figura 5.48. Como puede apreciarse, las líneas de contorno presentan una posición paralela a la base formada por los vértices NaCl y KCl. En este caso no se aprecia la tendencia a curvarse que se observaba en la variedad Gordal, posiblemente debido a los distintos tamaños de ambas. En cualquier caso, se ve que a medida que las proporciones de las mezclas avanza desde el eje NaCl-KCl, la proporción relativa de Ca en pulpa aumenta de manera progresiva pudiéndose hasta multiplicar por 11 en relación al contenido en el proceso tradicional. Al igual que se comentó en el caso del K, existe un amplio margen para seleccionar las concentraciones de CaCl₂ que se consideren más interesantes desde el punto de vista industrial.

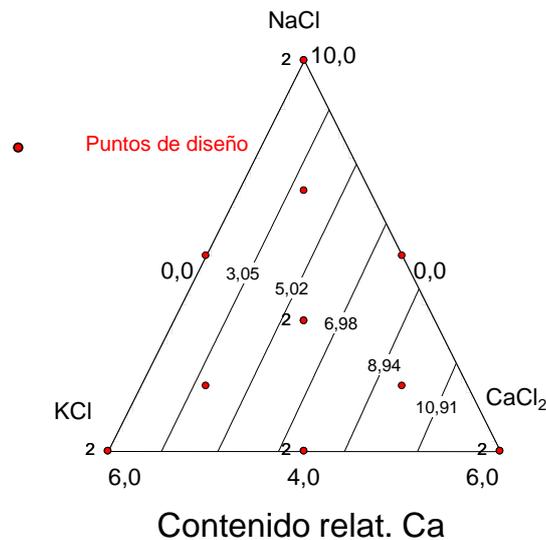


Figura 5.48. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Contenido (relativa al proceso tradicional) de Ca en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.2.2.1.5. Análisis sensorial

Las valoraciones de los panelistas se muestran en la Tabla 5.21.

Tabla 5.21. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Puntuaciones medias de los jueces para cada uno de los descriptores sensoriales estudiados, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Dureza	Fibrosidad	Crujiente
1	5,5 (1,4)	6,0 (1,3)	3,2 (2,1)	5,4 (1,3)	4,7 (1,5)	5,2 (1,9)
2	5,5 (1,3)	4,7 (1,0)	5,5 (2,0)	5,9 (1,6)	5,8 (1,4)	6,1 (1,4)
3	5,8 (1,6)	5,7 (1,4)	5,6 (2,0)	6,5 (1,0)	6,2 (1,9)	6,8 (1,6)
4	5,4 (1,4)	6,5 (1,8)	4,1 (1,4)	3,7 (1,3)	3,5 (1,3)	3,7 (1,3)
5	5,0 (1,3)	6,0 (1,3)	3,9 (1,8)	5,4 (1,0)	5,1 (2,1)	6,1 (1,4)
6	4,7 (1,6)	5,5 (2,3)	5,2 (1,9)	6,4 (1,2)	5,6 (2,0)	6,5 (1,6)
7	5,2 (1,6)	6,0 (1,5)	4,9 (2,2)	5,2 (1,3)	5,2 (1,5)	5,7 (1,5)
8	5,4 (1,1)	6,4 (1,8)	3,5 (2,2)	3,4 (1,8)	3,1 (1,7)	2,5 (1,4)
9	4,8 (1,5)	6,1 (1,6)	3,4 (2,2)	4,5 (1,5)	4,8 (1,2)	4,7 (1,3)
10	5,2 (2,6)	4,0 (1,4)	8,3 (1,7)	6,7 (1,4)	6,2 (1,6)	6,6 (1,5)
11	5,9 (1,4)	5,1 (1,4)	5,6 (2,4)	6,0 (1,0)	5,5 (1,4)	5,5 (1,5)
12	5,3 (1,8)	4,7 (1,8)	7,0 (2,0)	7,0 (1,5)	6,8 (1,5)	6,9 (1,3)
13	5,2 (1,9)	5,9 (1,5)	5,6 (1,6)	6,4 (1,2)	5,9 (1,7)	6,4 (1,6)
14	4,9 (2,1)	6,1 (2,0)	3,3 (1,9)	3,6 (1,4)	3,7 (1,6)	3,8 (1,5)
15	5,1 (1,7)	5,9(1,9)	5,1 (1,6)	6,0 (1,3)	5,4 (1,5)	5,8 (1,2)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

El estudio de los descriptores sensoriales con el panel de catadores muestra que el sabor ácido no está relacionado con la concentración inicial de sales y sus valores se mueven en un estrecho margen. En cuanto al sabor salado, el mismo puede ajustarse con un modelo lineal ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,6417$). La ecuación matemática es la siguiente:

$$\text{Salado (centrado)} = +0,062 * \text{NaCl} + 0,071 * \text{KCl} - 0,247 * \text{CaCl}_2 \quad (5.31)$$

Como puede verse, el efecto de las diferentes sales individuales sobre las puntuaciones para este descriptor presenta el siguiente orden en valores absolutos: $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{NaCl}$. La interpretación gráfica de esta ecuación se recoge en la Figura 5.49. La sensación de salado disminuye a medida que aumenta la proporción de Ca. Las

líneas de contorno, son paralelas al lado del triángulo NaCl-KCl, lo que indica que la contribución de las dos sales para el sabor salado es similar .

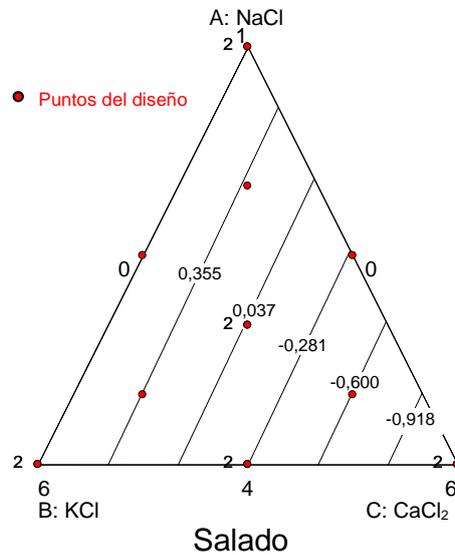


Figura 5.49. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno para el descriptor salado en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El sabor amargo puede ajustarse empleando un modelo lineal ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,4362$). La ecuación matemática tiene la siguiente expresión:

$$\text{Amargo (centrado)} = -0,150 \cdot \text{NaCl} - 0,101 \cdot \text{KCl} + 0,528 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.32)$$

Como puede observarse, el efecto individual de las diferentes sales en la puntuación para este descriptor presenta el siguiente orden en valores absolutos: $\text{CaCl}_2 > \text{NaCl} > \text{KCl}$. La interpretación gráfica y sus correspondientes líneas de contorno se recogen en la Figura 5.50. La sensación de amargo aumenta a medida que sube la proporción de Ca. Las líneas de contorno son casi paralelas al lado del triángulo NaCl-KCl. Esta tendencia es similar a la observada para la variedad Gordal.

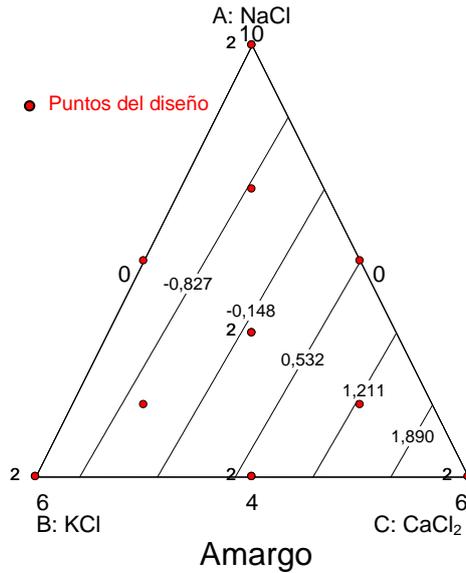


Figura 5.50. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno del sabor amargo en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La dureza se ajusta empleando también un modelo lineal ($p=0,0002$; falta de ajuste, $p=0,0871$). Tras realizar la transformación de los coeficientes en valores físicos, la ecuación tiene la siguiente expresión:

$$\text{Dureza} = -0,038 \cdot \text{NaCl} - 0,225 \cdot \text{KCl} + 0,333 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.33)$$

Se deduce de la misma que el efecto individual de las diferentes sales en valores absolutos tiene el siguiente orden: $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{NaCl}$. En la gráfica de contorno (Figura 5.51) se aprecia que la dureza aumenta a medida que sube la concentración de Ca en las salmueras, al igual que se observaba en la variedad Gordal. En este caso, las líneas son prácticamente perpendiculares a la base, lo que hace que la evolución sea casi de la concentración de NaCl y, sin embargo, dependa de la progresiva sustitución del K por Ca en el diagrama (desplazamiento de izquierda a derecha). El gráfico es bastante parecido al obtenido para la medida instrumental de textura, lo que confirma el buen funcionamiento general del panel.

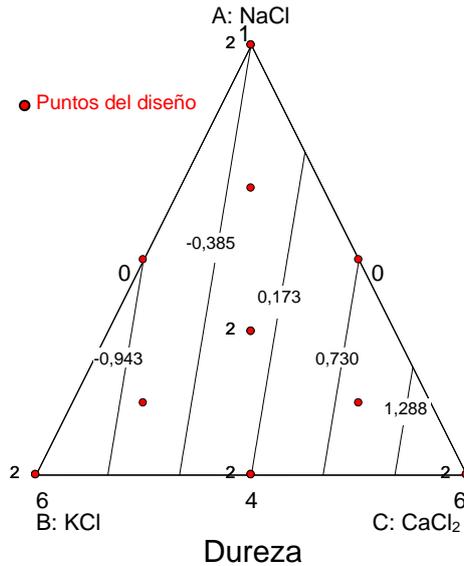


Figura 5.51. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno de la dureza en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Como en los casos anteriores, la fibrosidad se puede ajustar mediante un modelo lineal ($p=0,0096$; falta de ajuste, $p=0,4979$). La ecuación matemática que relaciona las sales con este descriptor es la siguiente:

$$\mathbf{Fibrosidad} = -0,007 * \text{NaCl} - 0,220 * \text{KCl} + 0,195 * \text{CaCl}_2 \quad (5.34)$$

Como puede deducirse, el efecto de las diferentes sales individuales en este descriptor presenta el siguiente orden de influencia: $\text{KCl} > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl}$. La evaluación de este descriptor de manera gráfica (Figura 5.52) indica que su comportamiento es similar a la la dureza y por lo tanto independiente de la concentración inicial de NaCl. El mismo mejora con la progresiva sustitución del K por Ca en el diagrama, al igual que ocurre con la variedad Gordal.

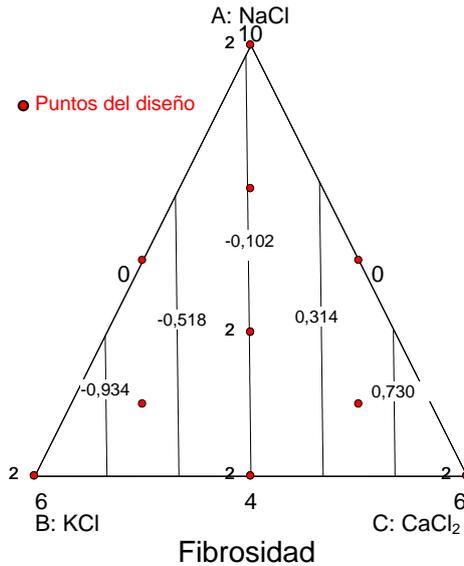


Figura 5.52. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno de la fibrosidad en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El descriptor crujiente se ajusta también mediante un modelo lineal ($p=0,0016$; falta de ajuste, $p=0,2504$). Tras realizar la transformación de los coeficientes en valores físicos, la ecuación tiene la siguiente expresión:

$$\text{Crujiente} = -0,020 \cdot \text{NaCl} - 0,263 \cdot \text{KCl} + 0,320 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.35)$$

De este modo, el efecto de las diferentes sales individuales sobre este descriptor es: $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{NaCl}$. En la gráfica de contorno (Figura 5.53) se aprecia que la sensación de crujiente sigue la misma tendencia mostrada por la dureza y la fibrosidad, es decir, aumenta de izquierda a derecha de una manera progresiva a medida que sube la proporción de Ca. En principio, esta similitud en la puntuación demuestra una gran relación entre los tres atributos elegidos para evaluar las sensaciones cinestésicas de las aceitunas y que la información suministrada por ellos puede ser redundante (lo mismo ocurre en la variedad Gordal).

Por ello, para encontrar una posible relación entre el crecimiento/muerte de la población de enterobacterias y las concentraciones iniciales de sales, se han utilizado diferentes parámetros como el área bajo la curva de crecimiento/decrecimiento, el tiempo que tardan en aparecer, la población máxima alcanzada y el tiempo que tardan en desaparecer. Dichos parámetros quedan recogidos en la Tabla 5.22.

Tabla 5.22. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Parámetros de crecimiento/muerte de la población de enterobacterias, según tratamientos.

Tratamiento	Área	Tiempo aparición (h)	Máxima población (\log_{10} ufc/mL)	Tiempo desaparición (h)
1	883	182	5,53	442
2	2723	86	7,22	686
3	1259	62	5,54	374
4	0	3038	0,00	0
5	2988	62	6,83	686
6	3056	38	7,90	590
7	3264	0	7,74	686
8	4894	38	6,53	1022
9	1834	0	6,30	422
10	2752	62	7,01	590
11	3546	0	7,99	686
12	2531	0	5,90	686
13	1853	38	7,04	422
14	3316	0	6,57	758
15	2567	0	7,64	518

El área bajo la curva de las enterobacterias no está ligada a las concentraciones iniciales de las distintas sales. En el caso del tiempo de aparición, el modelo propuesto es cúbico ($p=0,0014$; falta de ajuste, $p=0,0002$). El modelo no se ajusta correctamente, pero tiene otros parámetros ($R^2=0,8971$; precisión=13,71) que permiten utilizarlo, al menos, para el estudio de la tendencia en relación al tiempo que tardan en aparecer dichas bacterias según las concentraciones de las salmueras en las que se colocan las aceitunas. La ecuación en valores físicos es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 \text{Tiempo de aparición (h)} = & +2,51*\text{NaCl} -1245,20*\text{KCl} +15,51*\text{CaCl}_2 \\
 & +308,74*\text{NaCl}*\text{KCl} +0,51*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 +706,08*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 - \\
 & 176,16*\text{NaCl}*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \qquad \qquad \qquad (5.36)
 \end{aligned}$$

La representación gráfica de la ecuación muestra que el tiempo de aparición de estos microorganismos alcanza su máximo en presencia de NaCl y niveles bajos de KCl (7% NaCl y 3% KCl). Por el contrario, el gráfico explica claramente que la presencia de CaCl₂ reduce el tiempo de aparición de enterobacterias (Figura 5.55). Las mismas se desarrollan en mayor medida a medida que la composición de la mezcla se desplaza desde el lado NaCl-KCl hacia el vertice CaCl₂. De este modo, el tiempo que tardan en aparecer está relacionado con la presencia de KCl, aumentando a medida que lo hace la proporción de esta sal.

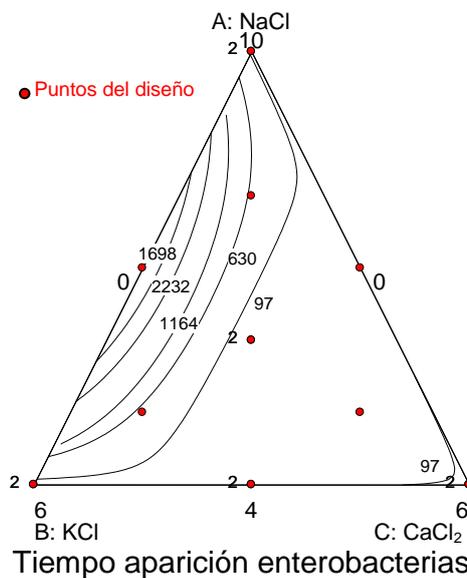


Figura 5.55. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Líneas de contorno en las que se representa el tiempo de aparición de enterobacterias (h) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Como en el caso anterior, el modelo propuesto para la población máxima de las enterobacterias es cúbico especial ($p=0,0092$; falta de ajuste, $p=0,2227$), siendo la ecuación:

$$\text{Máxima población (log}_{10} \text{ ufc/mL)} = +0,60*\text{NaCl} + 3,28*\text{KCl} + 0,32*\text{CaCl}_2 - 0,64*\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,08*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 - 1,93*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 + 0,49*\text{NaCl}*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \quad (5.37)$$

Como puede observarse, el efecto lineal más destacado es para el KCl que provoca un aumento en este parámetro. La interacción KCl-CaCl₂ es el efecto más

determinante, actuando en sentido contrario. No obstante, en caso de ecuaciones complejas como esta, lo mejor es interpretarla gráficamente.

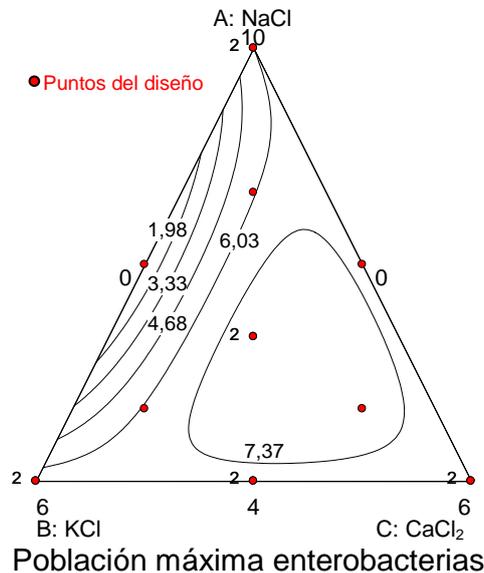


Figura 5.56. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Gráfica de contorno en la que se representa la población máxima de enterobacterias (N_{max}) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

En la Figura 5.56 se aprecia claramente que la presencia de Ca tiene un efecto favorecedor sobre el máximo crecimiento de enterobacterias habiendo una zona central en el diseño en donde se obtiene el máximo de población para estos microorganismos para concentraciones iniciales de $CaCl_2$ entre el 2% y el 4%. En cambio, en mezclas binarias de NaCl y KCl en torno al 7% NaCl y 3% KCl, la población es mínima. Es decir, en estas mezclas binarias se obtiene no solo la máxima reducción en el tiempo de aparición de enterobacterias, sino también sobre su máximo poblacional, posiblemente por la abundancia de azúcares disponibles en la salmuera desde el comienzo del proceso.

El tiempo que tardan en desaparecer las enterobacterias sigue un modelo cúbico ($p=0,0463$; falta de ajuste, $p=0,2471$), cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{T tiempo desaparecer} = +46,34 * NaCl + 387,99 * KCl + 106,48 * CaCl_2 - 7,45 * NaCl * KCl - 7,91 * NaCl * CaCl_2 - 222,10 * KCl * CaCl_2 + 49,04 * NaCl * KCl * CaCl_2 \quad (5.38)$$

Al igual que para la población máxima, el efecto lineal del KCl y la interacción KCl-CaCl₂ en la ecuación son los más destacados, aunque con signos opuestos entre ellos. Como en el caso de la anterior ecuación, su interpretación es más fácil gráficamente (Figura 5.57).

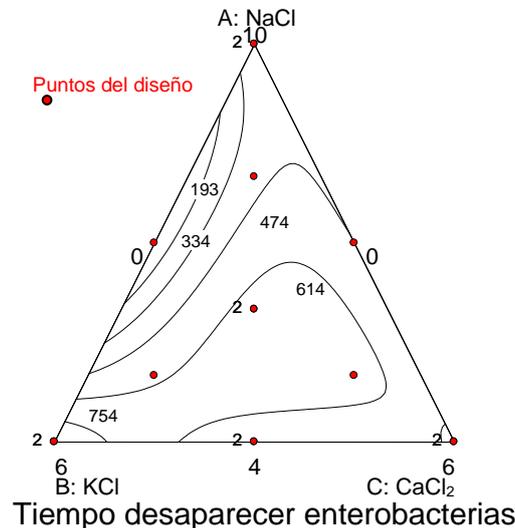


Figura 5.57. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Líneas de contorno del tiempo de desaparición de las enterobacterias en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La Figura 5.57 expresa unos resultados igualmente coincidentes con todo lo expuesto anteriormente. Cuando las enterobacterias aparecen más tarde, y alcanzan menos desarrollo, también mueren después. La desaparición más rápida tiene lugar a unas concentraciones en torno al 7% NaCl y el 3% KCl, mientras que a medida que se avanza desde el lado del triángulo NaCl-KCl hacia el vértice CaCl₂, aumenta el tiempo de permanencia de las mismas. Esto se debe a que la presencia de CaCl₂ provoca un crecimiento más lento de BAL y de la formación de acidez libre, como se observa en el caso de fermentación de la aceituna Gordal.

El comportamiento de las levaduras en todos los tratamientos es el esperado en este tipo de preparaciones. Su aparición oscila entre el 4 d (tratamiento 5) y el 21 d (tratamiento 13) y presentan un aumento rápido que se estabiliza a partir de los 30 d en torno a 4-5 log₁₀ ufc/mL (Figura 5.58).

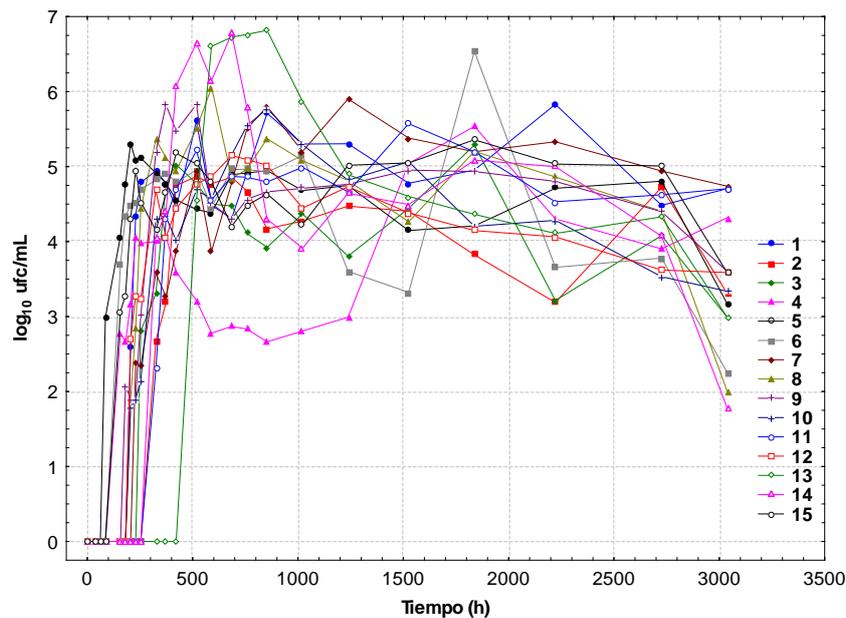


Figura 5.58. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Curvas de crecimiento de las levaduras en función del tiempo, según tratamientos.

Los datos de los recuentos no se ajustan adecuadamente a ningún modelo primario. Por tanto, para el estudio de su evolución global se recurre al uso de parámetros similares a los ya comentados para enterobacterias, los cuales se muestran en la siguiente Tabla 5.23. De todos los parámetros estudiados, la fase de latencia y la máxima población no se relacionan significativamente con la composición inicial de las salmueras por lo que solo se estudiará en detalle el área bajo la curva de crecimiento. En cualquier caso, se han encontrado muy pocas diferencias en la población máxima entre los tratamientos, aunque concentraciones iniciales elevadas de CaCl_2 (entre 3-6% CaCl_2) provocan las poblaciones más bajas de levaduras. Respecto al tiempo que tardaron en aparecer, existe una tendencia a que concentraciones iniciales más elevadas de CaCl_2 den lugar a una fase de latencia más prolongada. El área bajo la curva de crecimiento indica una tendencia a valores ligeramente más elevados cuando se incrementa la concentración de NaCl y menores cuando se eleva la de CaCl_2 . Esto está en contraposición con lo que ocurre con las enterobacterias que se afectaban más por el KCl .

Tabla 5.23. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Diferentes parámetros de crecimiento estudiados para levaduras, según tratamientos.

Tratamiento	Área bajo curva	Tiempo aparición (h)	Máximo crecimiento (\log_{10} ufc/mL)
1	14284	206	5,71
2	11274	326	4,87
3	11472	254	5,29
4	11498	158	5,54
5	13368	86	5,31
6	12553	158	5,15
7	14221	230	5,90
8	13300	206	6,06
9	13297	182	5,83
10	12460	230	5,77
11	13200	326	5,21
12	12071	206	5,15
13	12285	518	6,82
14	12788	326	6,78
15	13969	158	5,36

La población de BAL ha sido siempre la que se ha encontrado en mayor abundancia, debido a su inoculación. Al comienzo se observa un ligero decrecimiento, pero, después, aumentan de nuevo hasta alcanzar su máximo y continuar manteniéndose prácticamente constantes durante todo el tiempo que dura el estudio. Las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 5.59.

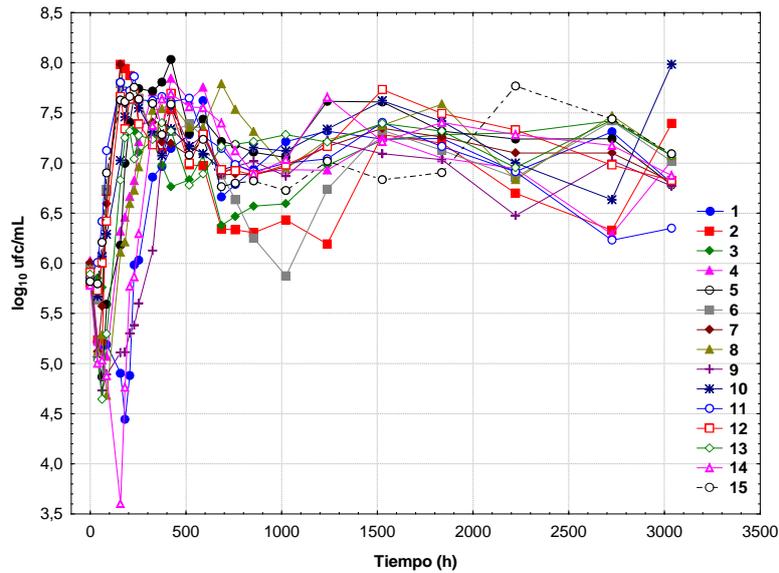


Figura 5.59. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Curvas de crecimiento de las BAL en función del tiempo, según tratamientos.

Estas curvas no se ajustan tampoco con ningún modelo primario de crecimiento. Por lo tanto, se recurre a utilizar también los parámetros antes mencionados que se muestran en la Tabla 5.24. El área bajo las curvas de crecimiento no se relaciona con las concentraciones iniciales de las sales. Además, como puede verse en la Tabla 5.24, las diferencias entre los diversos tratamientos son muy reducidas. Algo parecido ocurre con la población máxima de BAL, que tampoco está relacionada con las concentraciones iniciales de sales, y presenta diferencias muy limitadas entre tratamientos. No obstante se observa un ligerísimo incremento en el número de BAL con la disminución de NaCl, mientras que se mantiene constante con las proporciones de KCl y CaCl₂.

Tabla 5.22. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Diferentes parámetros de crecimiento estudiados para BAL, según tratamientos.

Tratamiento	Área BALs	Máxima población (log ₁₀ ufc/mL)
1	21133	7,62
2	20619	7,99
3	21477	7,81
4	20999	7,71
5	21985	8,03
6	21223	7,80
7	21579	7,74
8	21764	7,60
9	20579	7,56
10	21742	7,72
11	21254	7,86
12	21860	7,69
13	21655	7,40
14	21505	7,69
15	21754	7,76

A la vista de estos resultados microbiológicos, puede concluirse que los microorganismos más afectados por la presencia de diferentes sales son las enterobacterias, mientras que las levaduras y las BAL sufren solo ligeras modificaciones debido al empleo de diversas concentraciones iniciales de las diversas sales, pero sin que afecten substancialmente a sus comportamientos.

5.2.2.2.1. Análisis multivariante

Todos los parámetros obtenidos de las distintas poblaciones de microorganismos se reúnen y se someten a análisis de CP. Los resultados del análisis de CP indica que hay tres CP que engloban el 78,3% de la varianza total. Por tanto, la información de todos los parámetros se podría resumir en solo tres nuevas variables.

Las relaciones entre las variables originales y las nuevas se puede deducir de la tabla de correlaciones entre las mismas (Tabla 5.25). El CP1 está positivamente relacionado con el tiempo de aparición de las enterobacterias y negativamente relacionado con el resto. El CP2 está positivamente relacionada con el tiempo que

tardan en aparecer y la máxima población de levaduras y negativamente con la máxima población de BAL. Finalmente, el CP3 se relaciona positivamente con el area bajo la curva de levaduras. Por tanto, al CP1 se la puede renombrar como “enterobacterias”, el CP2 como “relación entre poblaciones de levaduras y BAL”, y al CP3 como “población de levaduras”. La Figura 5.60 muestra esta relación gráficamente.

Tabla 5.25. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Correlaciones de las variables relacionadas con el crecimiento de microorganismos y los CPs de su análisis multivariante.

Variable	CP 1	CP 2	CP 3
Área BAL	-0,478	0,077	0,438
Máxima Población BAL	-0,098	-0,885	-0,206
Área levaduras	-0,495	0,072	0,677
Tiempo aparición levaduras	-0,123	0,697	-0,637
Máxima población levaduras	-0,143	0,905	0,184
Área Enterobacterias	-0,884	-0,111	-0,041
Tiempo aparición Enterobacterias	0,872	-0,038	0,197
Máxima población Enterobacterias	-0,898	-0,039	-0,232
Tiempo desaparición Enterobacterias	-0,909	-0,110	-0,061

Nota: solo se muestran los CP con eigenvalue mayores que 1.

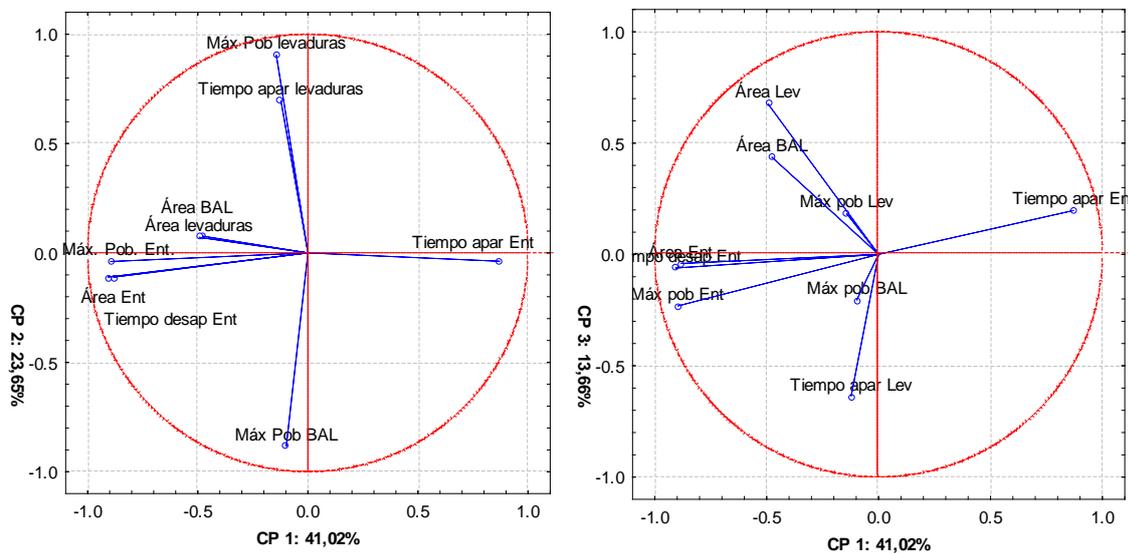


Figura 5.60. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Estudio mediante PCA de las variables relacionadas con el crecimiento microbiológico. Proyección de las variables microbianas en a) el plano formado por los dos primeros CP y b) en el plano formado por el CP1 y CP3.

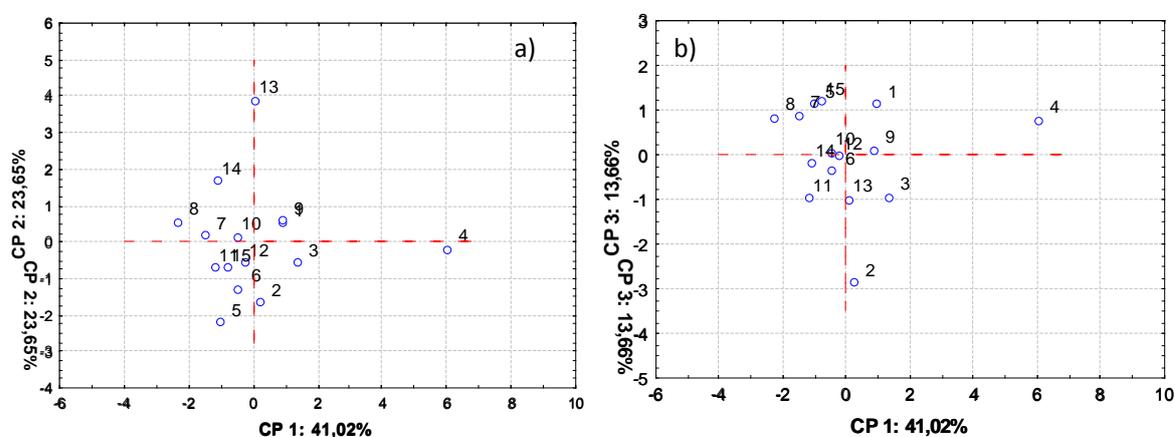


Figura 5.61. Fermentación de aceituna Manzanilla verde estilo sevillano. Estudio mediante PCA de las variables relacionadas con el crecimiento microbiológico. Proyección de los tratamientos en el plano formado por: a) CP 1 y CP2; y b) CP 1 y CP3.

En cuanto a la proyección de los CP 1 y CP 3 (Figura 5.61b), destacar la clara diferenciación del tratamiento 4, a causa de la ausencia de enterobacterias y del tratamiento 2, debido al tiempo prolongado de aparición de las levaduras en el mismo así como al área relativamente reducida bajo la curva de crecimiento de estos microorganismos.

5.2.2.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras y BAL

Los estudios moleculares realizados sobre la población de BAL muestran que el único lactobacilo presente en la fermentación es la cepa inoculada de *L. pentosus*.

La levadura más abundante al final de la fermentación, identificada por métodos moleculares, es de nuevo *Pichia galeiformis*, que está presente en todos los tratamientos, pero la misma está acompañada por *Candida tropicalis* en los tratamientos 7 (20% de frecuencia), 11 (50% de frecuencia), y 13 (50% de frecuencia) y *W. anomalous* en los tratamientos 2 (30%), 3 (50%) y 12 (50%). Por lo tanto, y al igual que en el caso de la aceituna Gordal, la biodiversidad de las levaduras al final del proceso es bastante limitada y no hay una clara relación entre las especies y la composición inicial de las salmueras.

5.2.3. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga colocada directamente en salmuera

5.2.3.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.2.3.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

Los valores iniciales de pH oscilan entre 6,67 (tratamiento 9; 0:7,33:3,66) y 5,47 (tratamiento 14; 3,67:3,67:3,67). Durante los primeros días se observa la típica bajada de pH, para estabilizarse rápidamente en torno a valores comprendidos entre 4,0 y 4,5 unidades (Figura 5.62).

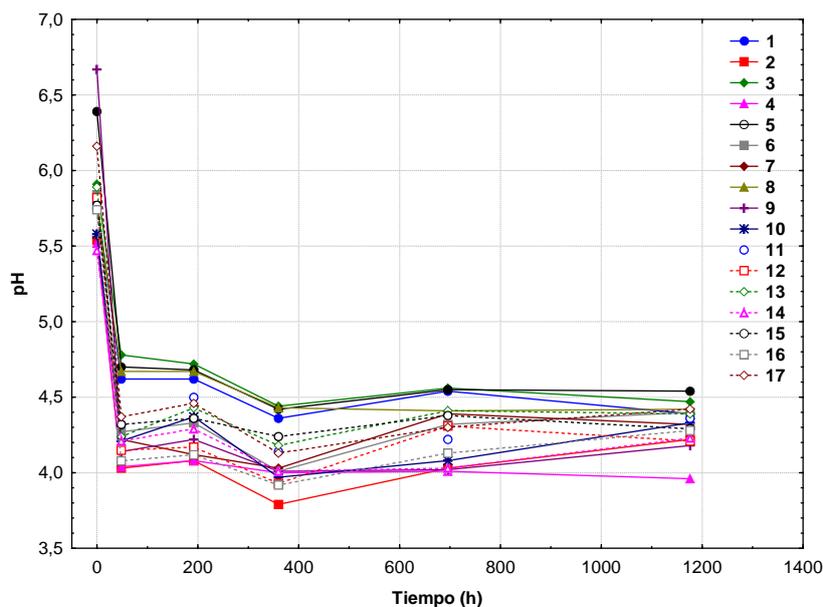


Figura 5.62. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Evolución del pH en función del tiempo, según tratamientos.

El modelo sugerido por la suma secuencial de cuadrados para expresar la relación del pH final con las concentraciones iniciales de las diferentes sales de cloruro, es cuadrático ($p=0,018$; falta de ajuste, $p=0,508$). La ecuación en términos de concentraciones de las sales tiene la siguiente expresión:

$$\text{pH} = 0,408*\text{NaCl} + 0,370*\text{CaCl}_2 + 0,415*\text{KCl} - 0,006\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 - 0,005*\text{CaCl}_2*\text{KCl} \quad (5.39)$$

Una rápida visualización de la ecuación mediante la obtención de su gráfica de contorno muestra que al aumentar los niveles de NaCl o KCl, en concentraciones similares aproximadamente, se produce un incremento en el pH final, que es inferior cuando se aumenta la proporción de CaCl₂ (Figura 5.63).

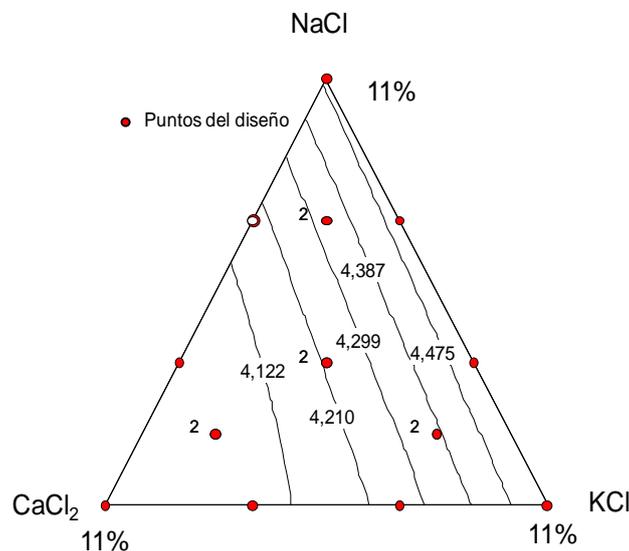


Figura 5.63. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Valores finales de pH en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Existe una contradicción aparente entre el efecto del retraso que provoca la presencia del CaCl₂ en la aparición de las BAL y los pH finales más bajos obtenidos en los tratamientos a los que se les añade CaCl₂. Sin embargo, la situación puede deberse a la baja acidez combinada en las salmueras con CaCl₂ que puede conducir a un pH más bajos incluso en presencia de una acidez libre más reducida.

La progresión de la acidez libre muestra para todos los tratamientos unos valores iniciales cercanos a 0,010 g de ácido láctico por 100 mL de salmuera, alcanzando al

final del proceso de fermentación niveles entre 0,7 y 0,8 g/100mL (Figura 5.64). La producción de acidez libre se puede ajustar mediante una cinética de formación de tercer orden, estimándose los parámetros cinéticos S_{∞} , k_a y t_{50} . La producción de acidez máxima esperada oscila entre 0,81 y 0,97 g de ácido láctico/100 mL y no está relacionada con las concentraciones iniciales de las sales. Sin embargo, la velocidad a la que se produce está afectada significativamente por la concentración de las mismas. El modelo sugerido es lineal, con un ajuste significativo ($p=0,046$; falta de ajuste, $p=0,599$). La ecuación obtenida tiene la siguiente expresión matemática:

$$k_a = 0,0019 * NaCl + 0,0036 * CaCl_2 + 0,0020 * KCl \quad (5.40)$$

Por lo tanto, la acidificación más rápida se obtiene en presencia de $CaCl_2$, seguido por KCl y $NaCl$ con contribuciones muy similares. En la Figura 5.65a se muestra la ecuación en un gráfico triangular, en la que se observa que las líneas de contorno son paralelas al eje $NaCl$ - KCl y los valores más elevados se encuentran en el vértice del $CaCl_2$. Aparentemente, la presencia de $CaCl_2$ en la salmuera estimula la producción de acidez libre en esta preparación.

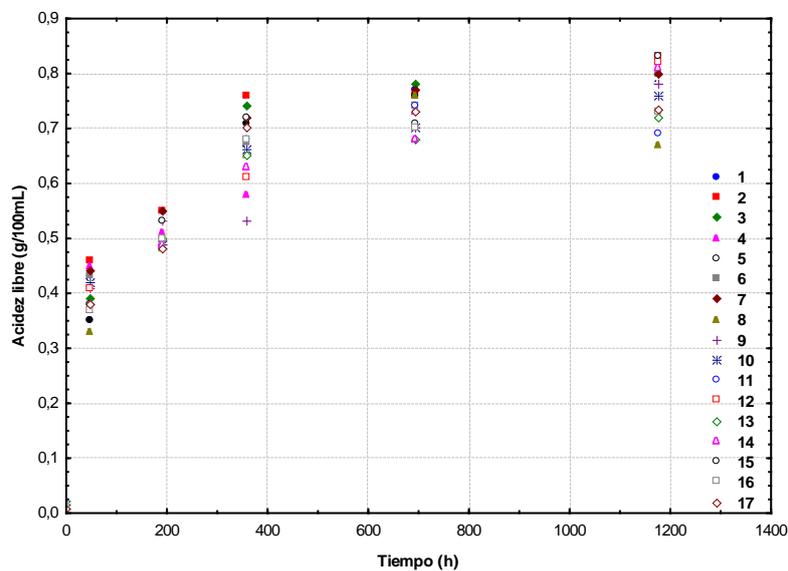


Figura 5.64. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Cambios en la producción de acidez libre (expresada como g ácido láctico/100 mL salmuera) durante el proceso, según tratamientos.

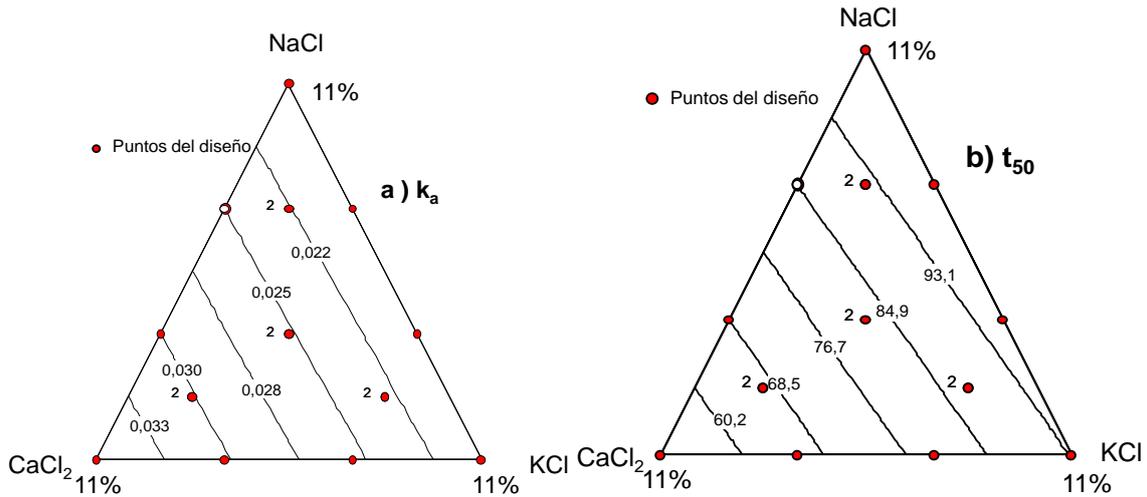


Figura 5.65. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno de a) k_a (h^{-1}), máxima tasa de producción de acidez libre, y b) t_{50} (h), tiempo para alcanzar la mitad de la máxima producción de acidez, en función de las diferentes mezclas de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El tiempo invertido en alcanzar $S_{\infty}/2$, t_{50} , es decir, el tiempo para formar la mitad de la máxima producción de acidez libre, se ve afectado por las mezclas de sales. El modelo lineal es significativo ($p=0,015$; falta de ajuste, $p=0,611$). La ecuación matemática es la siguiente:

$$t_{50} = 9,21 * NaCl + 4,73 * CaCl_2 + 8,49 * KCl \quad (5.41)$$

En la Figura 5.65b se representa el efecto de las diferentes sales sobre dicho parámetro. Las líneas de contorno son casi paralelas al eje NaCl-KCl y desciende cuando se aproxima al vértice $CaCl_2$. t_{50} puede reducirse de 93 h a tiempos por debajo de 60 h, dependiendo de la proporción de $CaCl_2$ presente en las salmueras. Se ha observado que una mezcla de 3,0% NaCl y 0,28% $CaCl_2$ minimiza el uso de NaCl en fermentaciones de pepinillos, al tiempo que conserva el producto libre de la contaminación de mohos y levaduras y mantiene una textura adecuada durante 6 meses después de ponerlos en salmuera (Guillou y Floros, 1993).

Para la acidez combinada final, el modelo propuesto es de nuevo lineal ($p=0,001$; falta de ajuste, $p=0,362$). La ecuación matemática que expresa la relación de este parámetro con las concentraciones iniciales de las sales expresadas en porcentaje es la siguiente:

$$\text{Acidez combinada (Eq/L)} = 0,0073 \cdot \text{NaCl} + 0,0072 \cdot \text{KCl} + 0,0042 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.42)$$

Las mayores aportaciones a la acidez combinada se producen, pues, por parte de NaCl y KCl mientras que la más baja es para el CaCl₂. Esto significa que el CaCl₂ ofrece mayor dificultad para la solubilización de la materia orgánica de la pulpa de la aceituna, que es la responsable de la formación de acidez combinada en las salmueras. A su vez, las salmueras con baja acidez combinada, para la misma concentración de ácido, llevan a la obtención de valores de pH más bajos, condición que puede facilitar la estabilización del producto. Las líneas de contorno obtenidas en la Figura 5.66 reflejan que los niveles de acidez combinada descienden cuando la concentración de CaCl₂ en la salmuera aumenta.

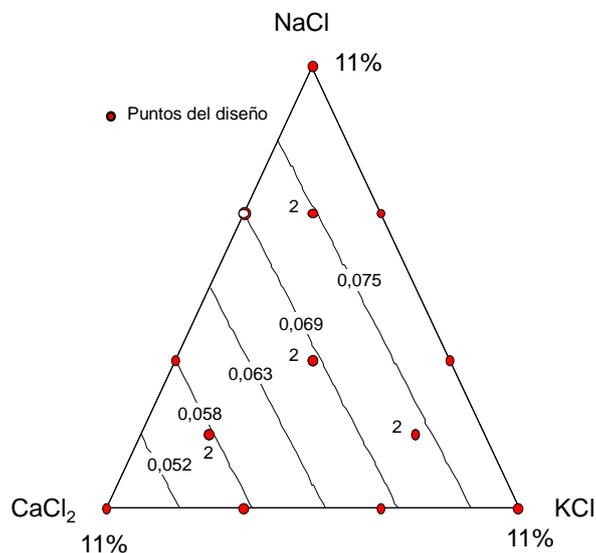


Figura 5.66. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Acidez combinada final en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.2.3.1.2. Color

En la Tabla 5.26 se muestran los valores obtenidos al final de la fermentación para cada uno de los parámetros de color analizados. Sin embargo, no se encuentra ninguna relación entre estos parámetros y las concentraciones de sales utilizadas.

Tabla 5.26. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Parámetros relacionados con el color al final del proceso, según tratamientos.

Tratamiento	L*	a*	b*
1	57,36	3,77	38,29
2	56,42	5,49	35,37
3	53,26	5,42	33,01
4	55,87	4,93	37,14
5	55,25	4,20	36,66
6	57,04	3,33	38,20
7	57,65	4,64	37,88
8	55,39	3,23	36,88
9	58,22	4,12	38,25
10	56,33	3,33	37,71
11	56,65	4,14	37,04
12	57,57	3,88	39,09
13	55,34	3,38	36,33
14	59,32	3,62	37,82
15	56,02	4,18	36,92
16	57,30	4,43	37,69
17	56,37	3,10	38,79

5.2.3.1.3. Textura instrumental

La textura más baja se obtiene en el tratamiento 5 (3,667:7,333:0) mientras que la más alta corresponde al tratamiento 15 (7,333:1,833:1,833) según se muestra en la Tabla 5.27.

Tabla 5.27. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Valores de textura instrumental (Instron) al final del proceso, según tratamientos.

Tratamiento	Textura instrumental (N/100g pulpa)
1	6,6 (0,3)
2	7,4 (0,2)
3	5,7 (0,3)
4	7,3 (0,6)
5	5,2 (0,2)
6	6,4 (0,7)
7	6,8 (0,4)
8	6,2 (0,2)
9	6,8 (0,7)
10	7,8 (0,8)
11	7,1 (0,2)
12	6,9 (0,5)
13	7,6 (0,6)
14	7,1 (0,4)
15	7,9 (0,5)
16	7,8 (0,2)
17	6,9 (0,2)

Nota: desviaciones estándares entre paréntesis.

La textura instrumental está relacionada significativamente con las mezclas de sales. El modelo sugerido por la suma secuencial de cuadrados es significativo ($p=0,0308$; falta de ajuste, $p=0,5679$). La contribución lineal más importante para mantener la textura instrumental corresponde al CaCl_2 , seguido por NaCl y KCl . Comparativamente, las interacciones $\text{NaCl}*\text{CaCl}_2$ y CaCl_2*KCl son marcadamente menores que la correspondiente a $\text{NaCl}*\text{KCl}$, que es negativa y tiende a reducir la textura instrumental. La ecuación, en términos de valores físicos es la siguiente:

$$\text{Textura instrumental (N/100g pulpa)} = 0,613*\text{NaCl} + 0,663*\text{CaCl}_2 + 0,528*\text{KCl} + 0,002*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 - 0,011*\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,004*\text{CaCl}_2*\text{KCl} + 0,025*\text{NaCl}*\text{CaCl}_2*\text{KCl} \quad (5.43)$$

La gráfica de contorno de esta ecuación (Figura 5.67) indica que un exceso de NaCl o KCl puede tener un efecto negativo sobre la textura instrumental, al igual que la interacción NaCl*KCl. Jimenez y col. (1995) proponen la existencia de una competencia entre NaCl y CaCl₂, que es dependiente del pH y especialmente intensa a pH altos (porque las paredes celulares son más sensibles a condiciones con diferencia iónica a este pH).

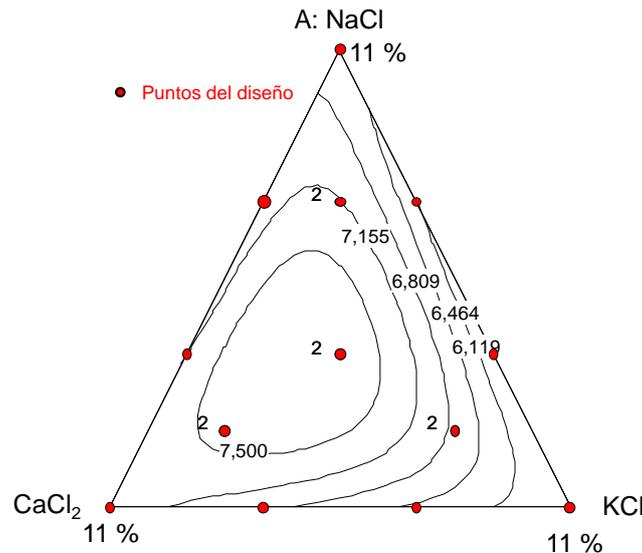


Figura 5.67. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno de la textura (N/100g pulpa) instrumental en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.2.3.1.4. Contenido de minerales en pulpa

Los contenidos relativos (con respecto al proceso tradicional) de los elementos implicados en el diseño, determinados al final del proceso fermentativo y según tratamientos, se dan en la Tabla 5.28.

Tabla 5.28. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Contenido (relativo al proceso tradicional) de Na, K y Ca en pulpa al final del proceso, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido relat. Na	Contenido relat. K	Contenido relat. Ca
1	1,00	1,00	1,00
2	0,01	0,92	11,63
3	0,04	10,56	0,75
4	0,29	0,76	9,00
5	0,31	6,38	0,78
6	0,02	7,03	6,81
7	0,37	0,81	5,82
8	0,61	3,21	0,81
9	0,01	1,81	7,40
10	0,24	2,34	5,52
11	0,75	2,30	3,92
12	0,14	1,67	9,40
13	0,19	6,75	4,16
14	0,34	3,40	5,95
15	0,56	1,50	3,64
16	0,14	1,68	8,63
17	0,19	6,70	4,82
Media trad.*	1452 (10)	109 (5)	112 (11)

Nota: *Media (mg/100g pulpa) del proceso tradicional, desviación estándar entre paréntesis.

De la misma manera que en los casos anteriores, los contenidos relativos se han relacionado con las concentraciones iniciales de las sales en las respectivas salmueras de fermentación.

La ecuación propuesta para el Na es lineal. Su ajuste es significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,4896$). La ecuación en términos de valores físicos es la siguiente:

$$\text{Contenido relativo Na en pulpa} = +0,082 * \text{NaCl} - 0,003 * \text{CaCl}_2 + 0,005 * \text{KCl} \quad (5.44)$$

Como puede deducirse, el nivel de Na depende principalmente del NaCl inicial (los coeficientes de CaCl₂ y KCl tienen valores mucho más bajos). El coeficiente negativo de CaCl₂ puede indicar que la absorción de Ca tiende a disminuir la presencia

relativa de Na, mientras que el K tiene el efecto contrario (Figura 5.68), ya que las líneas de contorno están ligeramente inclinadas hacia el vértice KCl. La realidad es que la sustitución del NaCl por otras sales, tiene una repercusión muy importante en la disminución del Na en pulpa, aunque no parece razonable su sustitución total. De todas formas, hay que tener en cuenta que en estas aceitunas no habido tratamiento alcalino que siempre contribuye también al aumento de Na y que la aceituna está más “entera”, por lo que la absorción de los diferentes elementos es menos acusada.

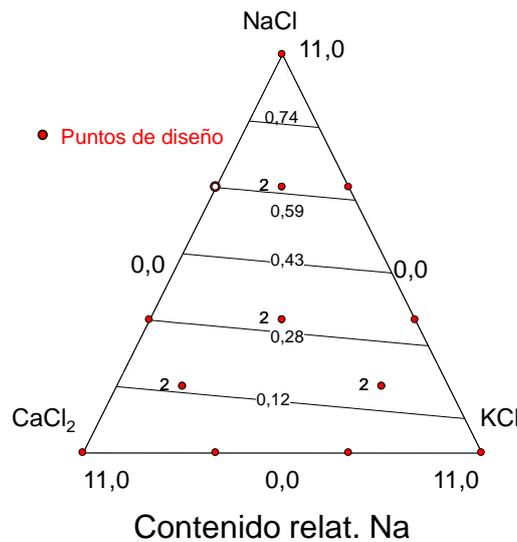


Figura 5.68. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de Na en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Para el K, el modelo propuesto es cuadrático, ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,4531$). Conserva los efectos lineales de las sales y las dos interacciones de NaCl*KCl y CaCl₂*KCl. La ecuación en términos de valores físicos es:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo K en pulpa} = & +0,088 * \text{NaCl} + 0,056 * \text{Cl}_2\text{Ca} + 0,997 * \text{KCl} \\ & - 0,040 * \text{NaCl} * \text{KCl} - 0,047 * \text{Cl}_2\text{Ca} * \text{KCl} \end{aligned} \quad (5.45)$$

Por lo tanto, el nivel de K en pulpa depende principalmente de las concentraciones iniciales de KCl en las salmueras, pero las interacciones con los otros cationes también son notables. En la práctica, el contenido de K, en general, es bastante alto debido a que en estos procesos no se pierde ese elemento en los tratamientos con

lejía ni en los lavados (Tabla 5.28). La Figura 5.69 muestra que las líneas de contorno son casi paralelas al eje que une los vértices de NaCl y CaCl₂. De la misma forma, puede observarse que, en este caso, la incorporación de KCl no produce un incremento tan elevado como en las aceitunas verdes estilo español, debido a la menor pérdida de K en esta elaboración. En cualquier caso, el contenido inicial se puede multiplicar hasta por encima de 9 veces.

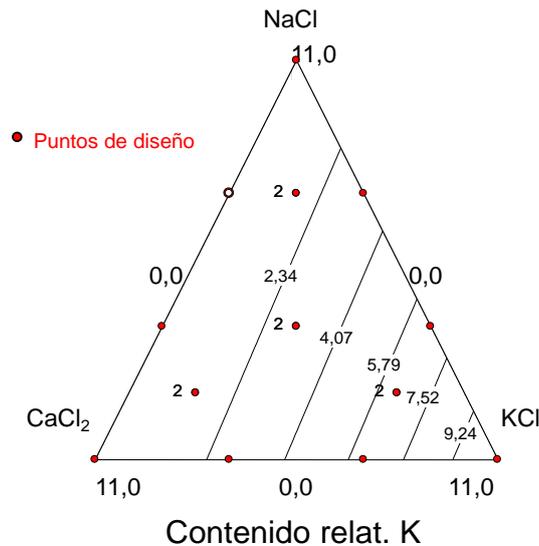


Figura 5.69. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de K en la pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La suma secuencial de cuadrados propone un modelo para describir los contenidos relativos de Ca en pulpa. Contempla los efectos lineales de las sales y las siguientes interacciones: NaCl*CaCl₂, CaCl₂*KCl, y CaCl₂*KCl*(CaCl₂-KCl). El modelo es significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,4356$). En términos de valores físicos (porcentajes) la ecuación es:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo de Ca en pulpa} = & +0,091 * \text{NaCl} + 1,054 * \text{CaCl}_2 + 0,073 * \text{KCl} \\ & + 0,054 * \text{NaCl} * \text{CaCl}_2 + 0,046 * \text{CaCl}_2 * \text{KCl} - 0,012 * \text{CaCl}_2 * \text{KCl} * (\text{CaCl}_2 - \text{KCl}) \end{aligned} \quad (5.46)$$

Por lo tanto, el contenido relativo de Ca depende, fundamentalmente, de la concentración inicial de CaCl₂, pero también de la interacción con KCl y CaCl₂, sobre todo con la primera. En la gráfica de contorno (Figura 5.70) se muestra los contenidos

relativos al aumentar las proporciones de CaCl_2 . A concentraciones bajas, las líneas de contorno son relativamente paralelas al eje NaCl - KCl , pero a medida que la proporción de CaCl_2 en las mezclas aumenta, se observa una mayor distorsión de las mismas, particularmente cuando se va llegando a los niveles máximos. En cualquier caso, también se una ligeramente más moderada absorción de Ca en relación con las aceitunas verdes estilo sevillano.

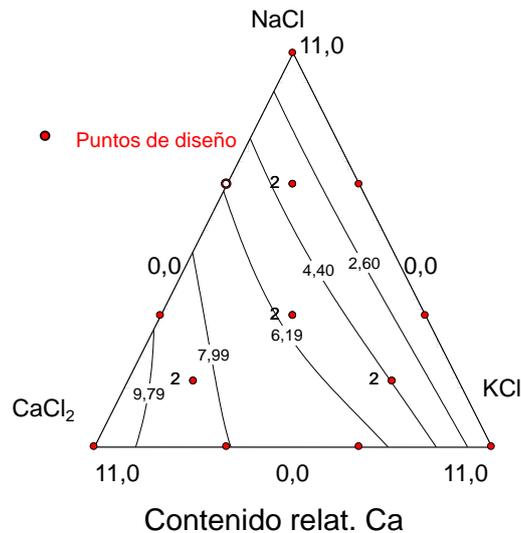


Figura 5.70. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de Ca en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Mulé y col. (2000) ha estudiado también la elaboración de aceitunas en salmuera utilizando salmueras de diversas mezclas de estas tres mismas sales, aunque las proporciones fueron del 2,66% de NaCl , CaCl_2 y KCl y del 4% de NaCl + 4% CaCl_2 . En general, estos autores comentan que el uso de mezclas de dos o tres componentes da lugar a un producto con bajo contenido de Na , mejorado en los niveles de K y Ca y buenas características organolépticas.

5.2.3.1.5. Análisis sensorial

Los valores medios obtenidos por los jueces del panel para los diversos atributos se muestran en la Tabla 5.29.

Tabla 5.29. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Puntuaciones del panel al final de la fermentación para los atributos relacionados con las concentraciones iniciales de sal, según tratamientos.

Tratamiento	Evaluación organoléptica	
	Salado	Dureza
1	7,8 (0,4)	6,9 (0,5)
2	5,1 (0,5)	7,2 (0,6)
3	6,7 (0,6)	6,1 (0,7)
4	6,5 (0,5)	7,8 (0,5)
5	7,3 (0,4)	7,2 (0,7)
6	5,8 (0,6)	7,8 (0,4)
7	7,2 (0,7)	8,0 (0,4)
8	7,0 (0,6)	7,1 (0,6)
9	4,1 (0,5)	7,0 (0,6)
10	7,3 (0,5)	7,3 (0,4)
11	7,1 (0,5)	7,2 (0,5)
12	6,5 (0,8)	8,5 (0,5)
13	6,7 (0,7)	7,8 (0,3)
14	5,5 (0,5)	8,0 (0,6)
15	7,6 (0,5)	7,4 (0,7)
16	5,5 (0,7)	7,8 (0,5)
17	6,6 (0,6)	7,4 (0,7)

Nota: desviaciones estándares entre paréntesis.

La percepción del sabor salado se relaciona, como es de esperar, con la concentración de NaCl inicial y alcanza su valor más alto en las aceitunas preparadas exclusivamente con esta sal (tratamiento 1). El KCl de manera individual también da una puntuación relativamente alta de sabor salado (6,7), mientras que el CaCl₂ lleva a la obtención de los valores más bajos para este atributo (tratamiento 2). El modelo propuesto que relaciona este descriptor con las proporciones iniciales de las diversas sales es lineal, con un ajuste significativo ($p=0,0004$; falta de ajuste, $p=0,8000$). La ecuación tiene la siguiente expresión:

$$\text{Salado (centrado)} = 0,14 * \text{NaCl} - 0,14 * \text{CaCl}_2 + 1,69 * \text{KCl} \quad (5.47)$$

En la Figura 5.71 se muestra la gráfica de líneas de contorno. La puntuación del sabor salado disminuye a medida que el CaCl_2 aumenta, mientras que la contribución de NaCl en las mezclas es ligeramente superior a la de KCl. Por lo tanto, una sustitución parcial de NaCl por KCl o CaCl_2 para disminuir la percepción de salado es posible en este proceso de elaboración. En ausencia de Ca, [Marsilio y col. \(2002\)](#) informan de puntuaciones similares en cuanto al sabor salado para aceitunas verdes fermentadas en 6% de NaCl, 6% de KCl o en una mezcla del 3% de cada sal. El análisis sensorial de kimchi, fermentado en salmueras que contienen concentraciones iniciales crecientes de hasta 7,5% de NaCl más 0,75% de KCl, no tuvo efecto significativo sobre la sensación gustativa de salado ([Choi y col., 1994](#)).

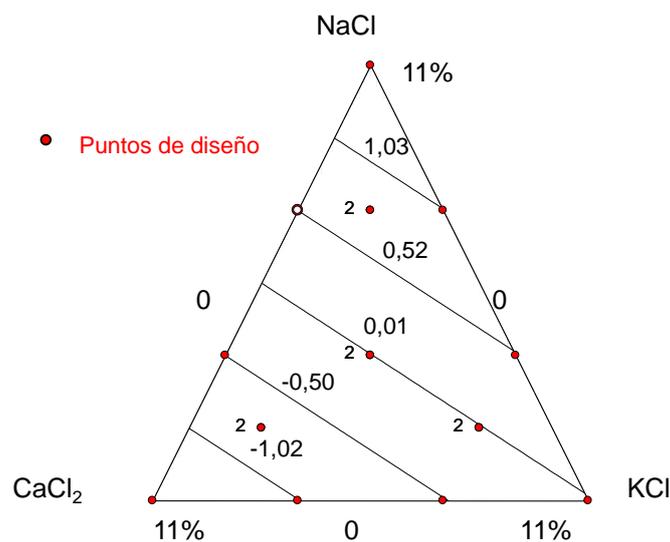


Figura 5.71. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno para el descriptor salado (centrado) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Los valores del panel para la dureza (Tabla 5.29) oscilan entre 6,1 (tratamiento 3, 0:11:0) y 8,5 (tratamiento 12, 1,833:1,833:7,333). El análisis estadístico aconseja un modelo cuadrático. El ajuste del modelo es significativo ($p=0,040$; falta de ajuste, $p=0,4287$). La ecuación es la siguiente:

$$\text{Dureza (centrada)} = -0,064\text{NaCl} - 0,027\text{CaCl}_2 - 0,089\text{KCl} + 0,034\text{NaCl}*\text{CaCl}_2 + 0,018\text{NaCl}*\text{KCl} + 0,027*\text{CaCl}_2*\text{KCl} \quad (5.48)$$

En la gráfica de contorno, la región con más dureza se sitúa en el área donde la concentración de CaCl_2 es aproximadamente la mitad que la de NaCl o KCl (Figura 5.72). De este modo, en fermentaciones de aceitunas, la máxima dureza siempre se obtiene en presencia de CaCl_2 . Los efectos de NaCl y KCl en presencia de unos niveles cada vez más bajos de Ca son, sin embargo, muy similares (contorno casi paralelo a la línea que conecta los vértices de NaCl y KCl). Esto concuerda con los resultados en textura obtenidos por Marsilio y col. (2002) que informan de unas valoraciones casi idénticas para aceitunas verdes fermentadas en 6% de NaCl o KCl y las procedentes de una mezcla del 3% de cada sal.

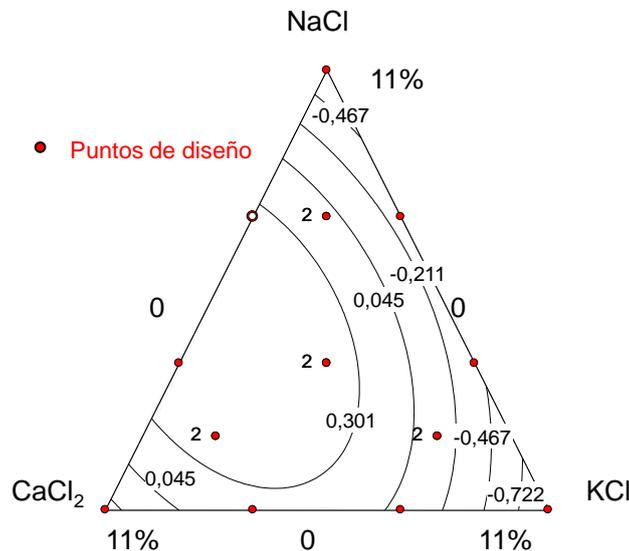


Figura 5.72. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno del descriptor dureza en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Los resultados obtenidos son consecuentes con los datos de García y col. (1994), que observan que una adición de 10 mmol/L de CaCl_2 a las soluciones de envasado compensa el ablandamiento provocado por la esterilización. Tassou y col. (2007) comentan que la presencia de CaCl_2 causa un aumento en la profundidad de la región periférica en la que tiene lugar la rotura de la pared celular. La pulpa es más fuerte y dura cuando se añade 4% de CaCl_2 a las salmueras. El único efecto observado sobre las propiedades mecánicas de la piel de estos frutos es el endurecimiento con una salmuera

de 6% de NaCl después de añadir CaCl₂. Los grandes contrastes de consistencia detectados entre la piel y la pulpa de aceituna negra natural de la variedad Conservolea pueden provenir de las diferencias en la composición y estructuras, aunque las propiedades de la pulpa dependiera más de las variaciones debidas a las proporciones de las sales (Tassou y col., 2007).

El Ca ha mostrado también un efecto favorable sobre la dureza de otros productos. Por ejemplo en pepinillos, una baja concentración de NaCl (0-5,8%) con 0,2% de CaCl₂ lleva a un aumento en la dureza del mesocarpio del fruto (Fleming y col., 1987). La adición de 0,5 kg/L de CaCl₂ a tiras de zanahorias mantiene su dureza durante el almacenamiento debido a la estabilización de las paredes celulares por iones Ca⁺⁺ (Izumi y Watada, 1994). Aparentemente, los tratamientos con Ca conducen a la ocupación de los enlaces disponibles en los distintos componentes de la capa intercelular (pectina, lignina, etc.) (Roy y col., 1994), que, a su vez, reduce el ablandamiento del fruto. Este mecanismo puede ser también aplicable a las aceitunas de mesa.

5.2.3.2. Efecto sobre los microorganismos

Las enterobacterias están siempre presentes desde el inicio, crecen rápidamente y, después, descienden bruscamente (Figura 5.73).

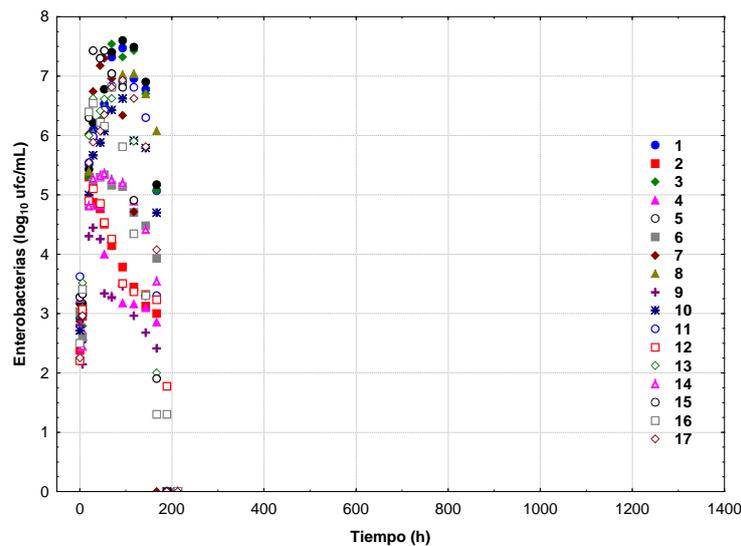


Figura 5.73. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Cambios en las poblaciones de enterobacterias durante el proceso, según tratamientos.

La fase de muerte de las enterobacterias es opuesta al crecimiento de levaduras y BAL. En la mayoría de los tratamientos desaparecen después de las 250 h y no se detectan a partir de las 400 h, coincidiendo con la máxima población de BAL. Así, las enterobacterias juegan un papel muy limitado en este proceso de elaboración. Dicho comportamiento está de acuerdo con el crecimiento en aceitunas verdes y puestas directamente en salmuera (verdes o negras) ya descrito con anterioridad (Garrido Fernández y col., 1997). Tassou y col. (2007) también informan que el patrón de las bacterias Gram negativas no está claro y que son inactivadas rápidamente durante fermentaciones de aceitunas griegas. Sin embargo, el KCl permite el crecimiento de *Escherichia cloacae* en extractos de pepinillos (Naewbanij y col., 1990).

En un intento de considerar el ciclo microbiano completo se lleva a cabo una estimación del área bajo las curvas de crecimiento. Un concepto similar, llamada área fraccional, ha sido ya utilizado por Lambert y Lambert (2003), para deducir el efecto inhibitor de un compuesto por la proporción de la reducción del área con respecto a un control positivo sin su presencia, o por Conte y col. (2007), que utiliza el índice de crecimiento para estudiar el efecto de los extractos de limón en el crecimiento de bacterias malolácticas. En ausencia de un control positivo, las áreas estandarizadas bajo la curva resultan ser un parámetro muy útil.

El modelo deducido a partir de la suma secuencial de cuadrados es lineal ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,2833$). La gráfica de contorno muestra que la presencia de CaCl_2 tiene un marcado efecto en la reducción del crecimiento global de enterobacterias (Figura 5.74), mientras que concentraciones iniciales mayores tanto de NaCl o KCl (solos o en combinación) dan lugar a una mayor presencia de estos microorganismos. El efecto de cada una de estas sales es similar, dado que las curvas de contorno son casi paralelas a la línea que conecta sus vértices.

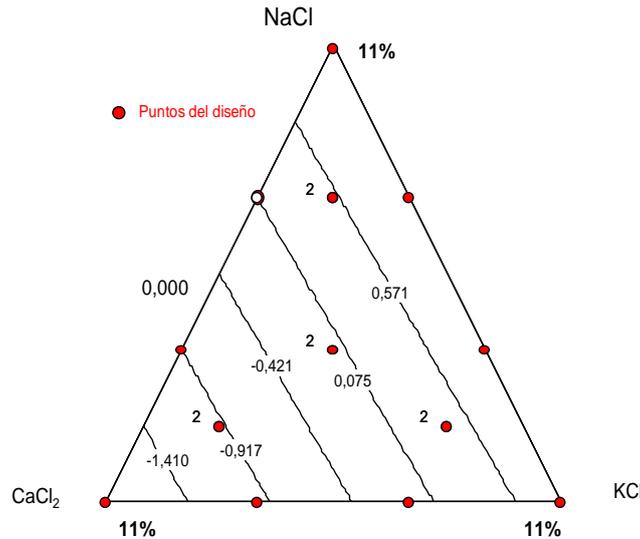


Figura 5.74. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno de las áreas estandarizadas bajo las curvas de crecimiento de enterobacterias en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La Figura 5.75 muestra la evolución de las poblaciones de levaduras en los diferentes tratamientos ensayados. En los mismos puede observarse una primera fase de crecimiento activo hasta alcanzar su máximo nivel poblacional para luego descender ligeramente y elevarse al final del proceso.

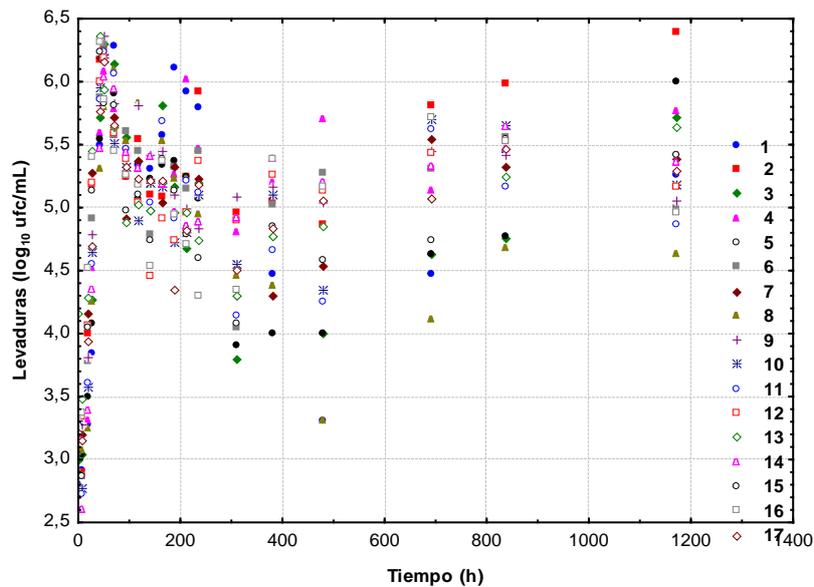


Figura 5.75. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Evolución de la población de levaduras durante el proceso, según tratamientos.

En la Tabla 5.30 se muestran los parámetros estimados mediante el ajuste con la ecuación de Peleg para las fases de crecimiento y muerte de estos microorganismos. Las tasa de crecimiento de las levaduras son altas y tienen bajos t_{cg} (tiempo para alcanzar la mitad de la población máxima), lo que indica que las mismas aparecen después de un periodo relativamente corto de la colocación en salmuera, pero se desarrollan con rapidez.

Tabla 5.30. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Valores de los parámetros obtenidos tras el ajuste del modelo de Peleg (1996) a los datos de crecimiento y muerte de las levaduras durante el proceso, según tratamientos.

Tratamiento	$\log_{10}N_s$	k_g (h^{-1})	t_{cg} (h)	k_l (h^{-1})	R^2
1	6,3 (0,2)	0,25 (0,04)	52 (4)	0,024 (0,003)	0,98
2	6,5 (0,6)	0,25 (0,08)	37 (7)	0,008 (0,002)	0,94
3	6,2 (0,6)	0,24 (0,09)	44 (8)	0,013 (0,003)	0,87
4	5,8 (0,2)	0,33 (0,09)	38 (3)	0,008 (0,001)	0,98
5	6,1 (0,2)	0,27 (0,05)	45 (4)	0,013 (0,001)	0,98
6	6,3 (0,3)	0,33 (0,11)	34 (4)	0,005 (0,002)	0,95
7	6,4 (0,5)	0,28 (0,11)	34 (5)	0,011 (0,002)	0,91
8	6,5 (0,2)	0,22 (0,02)	52 (3)	0,016 (0,001)	0,99
9	6,2 (0,3)	0,28 (0,09)	39 (5)	0,019 (0,005)	0,96
10	6,1 (0,3)	0,35 (0,02)	35 (5)	0,008 (0,002)	0,91
11	5,8 (0,4)	0,32 (0,16)	35 (6)	0,010 (0,004)	0,90
12	6,3 (0,5)	0,29 (0,06)	37 (5)	0,046 (0,016)	0,99
13	6,6 (0,4)	0,39 (0,17)	32 (4)	0,020 (0,006)	0,91
14	7,5 (0,3)	0,26 (0,05)	46 (4)	0,017 (0,004)	0,98
15	6,3 (0,4)	0,33 (0,12)	35 (5)	0,020 (0,008)	0,97
16	6,5 (0,7)	0,27 (0,07)	35 (5)	0,038 (0,007)	0,97
17	6,3 (0,4)	0,24 (0,06)	42 (6)	0,027 (0,007)	0,98

Nota: N_s , población máxima alcanzada; k_g , tasa constante de crecimiento; t_{cg} , tiempo para alcanzar $N_s/2$; k_l , tasa constante de muerte. Desviaciones estándar entre paréntesis.

t_{cg} y k_l (tasa de muerte) muestran una relación significativa con la concentración de la sal en las mezclas, pero no así los demás parámetros. La suma de cuadrados para t_{cg} sugiere un modelo cuadrático ($p=0,0497$; falta de ajuste, $p=0,5747$) que lleva a la

retención de los efectos lineales y la interacción $\text{NaCl} \cdot \text{CaCl}_2$. En términos de valores físicos, la ecuación tiene la siguiente expresión:

$$t_{cg} = 4,51 \cdot \text{NaCl} + 3,46 \cdot \text{CaCl}_2 + 3,62 \cdot \text{KCl} - 0,36 \cdot \text{NaCl} \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.49)$$

La sal que más contribuye al descenso de t_{cg} es NaCl , seguido por KCl y CaCl_2 . La presencia conjunta de CaCl_2 y NaCl favorece aparentemente la aparición de las levaduras más tempranamente (signo negativo), aunque la interpretación de este tipo de ecuaciones en las que intervienen interacciones se realiza siempre más fácilmente mediante la representación gráfica.

La gráfica de contorno de en dos dimensiones ilustra el efecto de las diversas sales estudiadas sobre t_{cg} (Figura 5.76a). Los valores mayores se detectan en presencia de NaCl , mientras que son menores para KCl y CaCl_2 . La presencia de CaCl_2 facilita la aparición de levaduras a lo largo de una pendiente que asciende al aproximarse al vértice correspondiente a esta sal.

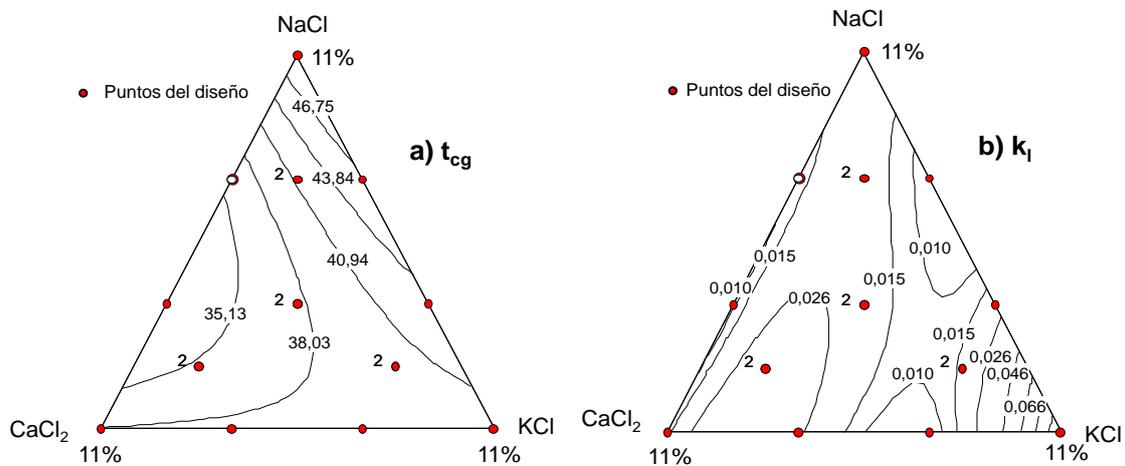


Figura 5.76. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno de a) t_{cg} (h), tiempo para alcanzar $N_s/2$, y b) k_l (h^{-1}), tasa constante de muerte para las poblaciones de levaduras en el proceso, ambos casos en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

La suma de cuadrados para k_l propone un modelo cúbico ($p=0,0006$; falta de ajuste, $p=0,070$). La ecuación en términos físicos (porcentajes) es algo compleja por lo que se comenta solo su interpretación gráfica. (Figura 5.76b) Las tasas de muerte más

alta se detectan con la presencia de elevadas concentraciones iniciales de KCl mientras que el NaCl o el CaCl₂, de manera individual o formando mezclas ternarias, llevan a tasas inferiores de muerte.

Además, se estudia las áreas bajo las curvas de crecimiento de las levaduras. El modelo deducido de la suma secuencial de cuadrados es lineal, con un ajuste significativo y un error no significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,0212$). Sin embargo, otros parámetros del ajuste tienen valores favorables ($R^2 = 0,76$; precisión = 13,79) por que la misma puede interpretarse como una posible tendencia. En la gráfica de contorno se observa que para las levaduras (Figura 5.77) la situación se invierte con respecto a las enterobacterias: la mayor presencia de levaduras se relaciona con la concentración más alta de CaCl₂, mientras que su presencia es cada vez más débil cuando las concentraciones iniciales de NaCl y KCl (por separado o en combinación) se incrementan.

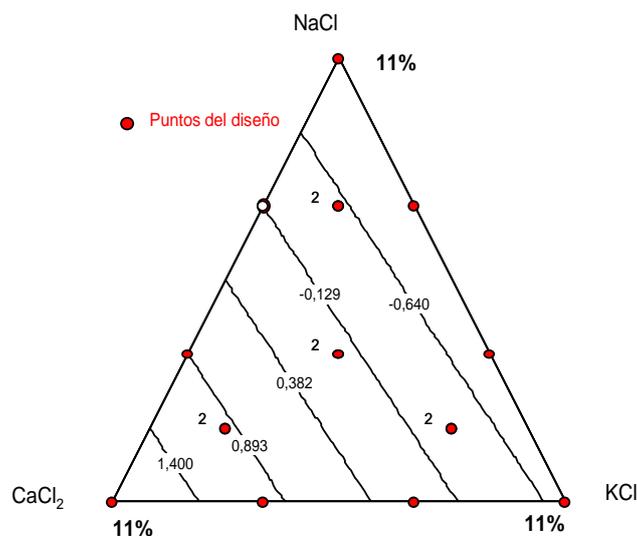


Figura 5.77. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Líneas de contorno de las áreas estandarizadas bajo las curvas de crecimiento de levaduras en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El crecimiento de las BAL no es uniforme y tiene una gran dispersión en la fase de latencia entre los diferentes tratamientos (Figura 5.78). Algunos de ellos presentan las típicas fases de crecimiento y muerte, tratamientos en los que NaCl y KCl están

incluidos pero donde el CaCl_2 está ausente o en bajas concentraciones iniciales (tratamientos 1, 3, 8 y 13). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos solo muestran una fase de crecimiento sin ocurrir un descenso de sus poblaciones.

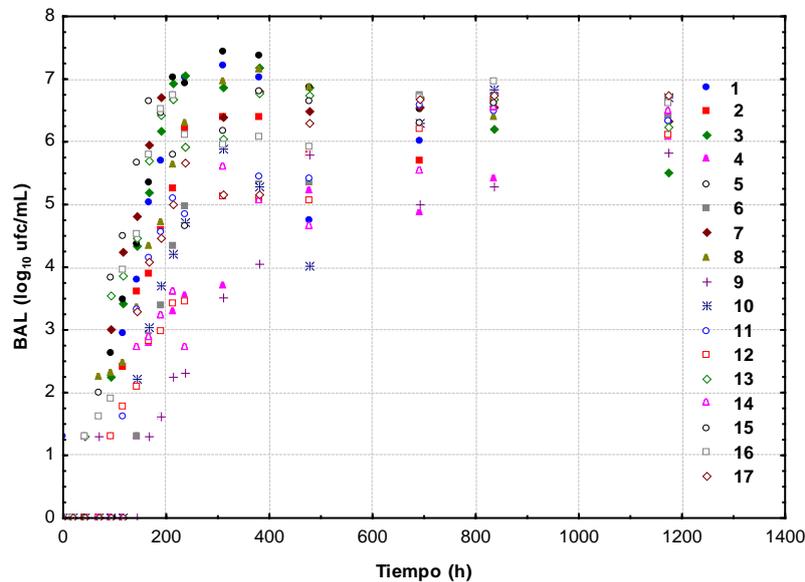


Figura 5.78. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Evolución de la población de BALs en función del tiempo, según tratamientos.

En la Tabla 5.31 se muestran los valores de los parámetros obtenidos mediante la aplicación de la ecuación de Peleg (1996) para las BAL, excepto k_l (no estimado en el caso de solo crecimiento). Los tiempos más largos para alcanzar la mitad de la máxima población (t_{cg}) se obtienen para los tratamientos 9 (473 h, 0:3,667:7,333) y 4 (416 h, 3,667:0:7,333) con altas concentraciones iniciales de CaCl_2 mientras que los menores son para el tratamiento 15 (153 h, 7,333:1,833:1,833) y 7 (178 h, 7,333:0:3,667) con poco CaCl_2 . Las tasas más bajas de crecimiento se observan también en los tratamientos con altas proporciones de CaCl_2 : tratamientos 9 ($0,032 \text{ h}^{-1}$, 0:3,667:7,333) y 12 ($0,035 \text{ h}^{-1}$, 1,833:1,833:7,333). Sin embargo, ninguno de los parámetros de la ecuación de Peleg para las BAL está significativamente relacionado con las concentraciones iniciales de las sales, por lo que no se puede construir un modelo secundario ni obtener gráficas de contorno en función del mismo.

Tabla 5.31. Fermentación de aceituna Aloreña de Málaga en salmuera. Valores de los parámetros del modelo de Peleg (1996) ajustado a los datos de crecimiento y descenso de las BAL a lo largo del proceso, según tratamientos.

Tratamientos	$\log_{10}N_s$	k_g (h^{-1})	t_{cg} (h)	k_l (h^{-1})	R^2
1	7,2 (0,4)	0,097 (0,011)	218 (10)	0,003 (0,001)	0,99
2	6,5 (0,1)	0,074 (0,007)	245 (8)	No descenso	0,98
3	-	0,096 (0,003)	219 (4)	0,004 (0,001)	0,99
4	5,6 (0,4)	0,033 (0,008)	416 (59)	No descenso	0,90
5	8,1 (1,6)	0,096 (0,010)	212 (10)	0,002 (0,001)	0,99
6	6,5 (0,2)	0,086 (0,015)	272 (15)	No descenso	0,99
7	6,6 (0,1)	0,102 (0,014)	178 (7)	No descenso	0,99
8	7,0 (0,2)	0,075 (0,017)	252 (17)	0,004 (0,002)	0,97
9	5,5 (0,2)	0,032 (0,004)	473 (28)	No descenso	0,96
10	6,2 (0,2)	0,060 (0,017)	293 (32)	No descenso	0,99
11	5,8 (0,2)	0,080 (0,018)	226 (19)	No descenso	0,98
12	6,0 (0,2)	0,035 (0,005)	392 (37)	No descenso	0,99
13	-	0,080 (0,004)	205 (9)	0,001 (0,001)	0,98
14	6,1 (0,3)	0,035 (0,007)	370 (45)	No descenso	0,93
15	6,5 (0,1)	0,118 (0,020)	153 (9)	No descenso	0,98
16	6,5 (0,1)	0,116 (0,015)	179 (8)	No descenso	0,90
17	6,6 (0,1)	0,063 (0,008)	269 (11)	No descenso	0,98

Notas: N_s , población máxima alcanzada; k_g , tasa constante de crecimiento; t_{cg} , tiempo para alcanzar $N_s/2$; k_l , tasa constante de descenso. Desviaciones estándares entre paréntesis. La probabilidad del test ANOVA F para el ajuste fue siempre $<0,0001$.

Debe recalcar en este caso el efecto simultáneo desfavorable del $CaCl_2$ en enterobacterias y BAL (en una menor proporción), ya que puede indicar que la inhibición de la enterobacterias podría deberse a un efecto del propio $CaCl_2$ y no a cambios en los metabolitos (ácido láctico, por ejemplo) producidos por las mismas durante la fermentación. Por el contrario, el efecto estimulante del $CaCl_2$ en levaduras (en oposición a lo observado para enterobacterias y BAL) puede estar relacionada con una competencia mejor por los sustratos fermentables cuando las bacterias están más inhibidas, una menor presencia de ácido láctico (y por tanto valores mayores de pH) o estar causado por diferentes mecanismos de interacción de $CaCl_2$ con cada uno de estos grupos de microorganismos.

En general, las poblaciones de BAL aumentan progresivamente y normalmente se encuentran por encima de las levaduras al final de la fermentación, con lo que todos los tratamientos siguen un proceso ácido láctico. Una fermentación láctica vigorosa favorece la estabilidad mediante el descenso de las poblaciones de otros

microorganismos, especialmente levaduras, cuyo crecimiento puede prevenirse usando mezclas de NaCl y CaCl₂ en fermentaciones de pepinillo, junto con sorbato potásico (Guillou y Floros, 1993). La tasa máxima de crecimiento específico de *L. plantarum* en jugo de aceituna negra se alcanza en una combinación determinada de NaCl (377 mM) y acetato-Ca y lactato (67mM, juntos), pero concentraciones mayores del último compuesto llevan a un efecto inhibitor.

Tsapatsaris y Kotzekidou (2004) encuentran una tasa máxima de crecimiento específico de un cultivo mixto de *L. plantarum* y *D. hansenii* en fermentaciones de jugo de aceitunas cuando el medio se suplementa con una proporción del 50% de NaCl-KCl. Sin embargo, Tassou y col. (2007) no encuentran ningún efecto sobre las BAL cuando se añaden 5 g/L de KCl (0,5%) a la salmuera inicial. Por el contrario, a 40 g/L de NaCl, el crecimiento de las levaduras se duplica en ausencia de CaCl₂. La presencia de CaCl₂ a bajas concentraciones en fermentación de pepinillo (Guillou y col., 1992) o aceitunas negras (Tassou y col., 2007) afecta principalmente la textura pero, del mismo modo que se ha demostrado en este trabajo, cuando se aplican concentraciones iniciales mayores puede influenciar el crecimiento microbiano. Fermentaciones naturales espontaneas con baja concentración de sal conducen a una calidad altamente variable, ablandamiento y producción de sabores desagradables en sauerkraut, pero el uso de un cultivo iniciador de *Leuconostoc mesenteroides* provoca una textura firme y la reducción de sabores desagradables para todos los niveles de las sales ensayados (Johanningsmeier y col., 2007). Así, las fermentaciones con mezclas de sales pueden beneficiarse también mediante el uso de cultivos iniciadores de BAL.

5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE CLORURO SÓDICO POR OTRAS SALES MINERALES EN LOS ENVASADOS

5.3.1. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano

Es importante recordar que en esta parte del trabajo, todos los tratamientos contienen un nivel basal del 2,5% de NaCl, por lo que cuando se aluda a las condiciones de un tratamiento, por ejemplo 1,5:1:0, dicho tratamiento contiene 1,5% de KCl + 1%

de CaCl_2 + 0% de MgCl_2 , además del 2,5 % de NaCl que se omite para no hacer repetitiva la exposición.

5.3.1.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.3.1.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

El pH de las salmueras iniciales es diferente en función de las sales (Tabla 5.32), oscilando entre 1,98 (tratamientos 8 y 13, con las siguientes concentraciones en sales: 1:0,91:0,59 y 1:1,5:0, respectivamente) y 2,21 (tratamiento 1; 2,5:0:0).

El pH inicial, según indica la suma secuencial de cuadrados, se puede ajustar con un modelo lineal. El análisis de varianza correspondiente para ajustar el mismo a los datos indica que el modelo es significativo ($p < 0,0001$), y la falta de ajuste no significativa ($p = 0,9612$). El modelo, por otra parte, explica alrededor del 82% de la varianza. A partir de los pseudocomponentes se puede obtener la ecuación transformada, de manera que pueda aplicarse a la misma las concentraciones iniciales de las distintas sales de envasado (g/100mL salmuera) para calcular el pH inicial:

$$\text{pH inicial} = +0,88 * \text{KCl} + 0,73 * \text{CaCl}_2 + 0,77 * \text{MgCl}_2 \quad (5.50)$$

Como puede verse, el efecto de las diferentes sales individuales sigue el siguiente orden $\text{KCl} > \text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2$. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recoge en la Figura 5.79. El pH disminuye al desplazarse la composición desde el vértice KCl hacia el vértice CaCl_2 .

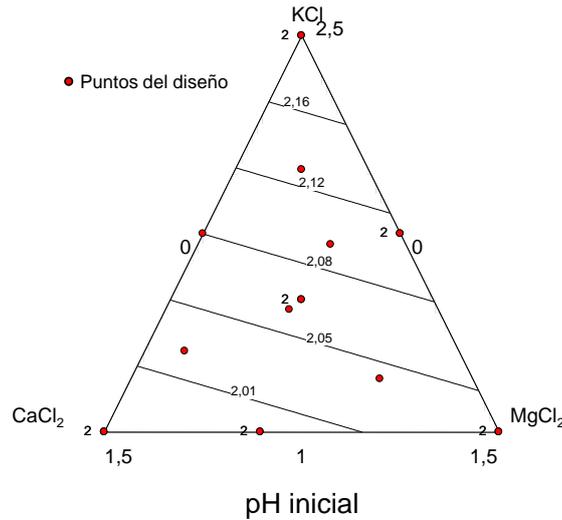


Figura 5.79. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno del pH inicial de la salmuera en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Los valores finales del pH de los envasados, a las 2880 h del mismo, se muestran también en la Tabla 5.32. Dichos valores oscilan entre 2,42 (tratamiento 16; 1:0:1,5) y 2,79 (tratamiento 1; 2,5:0:0).

Tabla 5.32. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Valores de pH inicial y final de las salmueras, según tratamientos.

Tratamiento	pH inicial	pH final
1	2,21	2,79
2	2,07	2,57
3	2,11	2,67
4	2,00	2,47
5	2,07	2,59
6	2,09	2,64
7	2,20	2,73
8	1,98	2,47
9	2,00	2,49
10	2,13	2,66
11	2,13	2,65
12	1,99	2,49
13	1,98	2,47
14	2,08	2,62
15	2,08	2,49
16	1,98	2,42
17	2,04	2,54
18	2,02	2,51
19	2,07	2,58

El pH final se puede ajustar con un modelo lineal. Los datos de análisis de varianza resultante de la deducción del modelo correspondiente indica que el mismo resulta significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,3366$). Una vez deducidos los coeficientes del modelo, se obtiene la ecuación transformada que se expresa a continuación:

$$\text{pH final} = +1,10 \cdot \text{KCl} + 0,90 \cdot \text{CaCl}_2 + 0,95 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.51)$$

Como puede verse, el efecto de las diferentes sales individuales sigue el siguiente orden $\text{KCl} > \text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2$, que es el mismo que se obtiene para el pH inicial. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recoge en la Figura 5.80, en la que se observa un comportamiento global similar al descrito para el pH inicial.

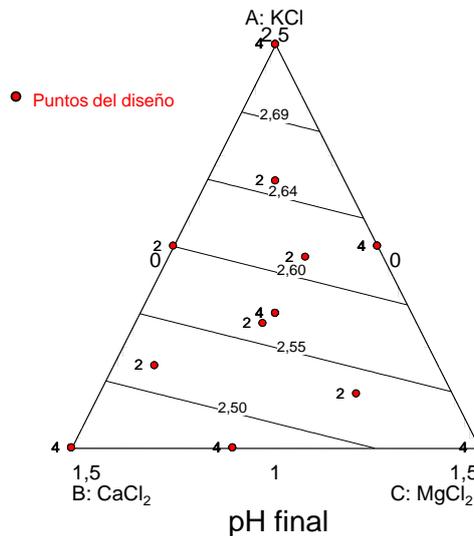


Figura 5.80. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno del pH final en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Los datos finales de acidez libre varían entre 0,49 (tratamiento 1; 2,5:0:0) y 0,62 (tratamientos 9 y 16; 1,201:0,352:0,948 y 1:0:1,5) (Tabla 5.33).

Tabla 5.33. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Valores finales de acidez libre y acidez combinada de las salmueras, según tratamientos.

Tratamiento	Acidez libre (g láctico/100 mL)	Acidez combinada (Eq/L)
1	0,49	0,023
2	0,51	0,016
3	0,55	0,020
4	0,53	0,013
5	0,55	0,018
6	0,58	0,021
7	0,54	0,022
8	0,57	0,014
9	0,62	0,017
10	0,57	0,021
11	0,52	0,018
12	0,61	0,017
13	0,57	0,015
14	0,50	0,019
15	0,59	0,018
16	0,62	0,020
17	0,59	0,020
18	0,58	0,018
19	0,52	0,020

La acidez libre se ajusta a un modelo lineal. Como puede apreciarse en el análisis de varianza, el mismo es significativo ($p=0,0001$; falta de ajuste, $p=0,0570$). El modelo explica solo en torno al 42% de la varianza, aunque su precisión es buena (10,687). Por ello, aunque el mismo no sea muy adecuado para predecir la acidez libre en función de las concentraciones de las diversas sales en la salmuera inicial, sí que puede resultar interesante porque permite observar una posible tendencia del efecto de las sales añadidas sobre este parámetro. La ecuación matemática tiene la siguiente expresión:

$$\text{Acidez libre} = +0,20 \cdot \text{KCl} + 0,24 \cdot \text{CaCl}_2 + 0,27 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.52)$$

Como puede verse, el efecto de las diferentes sales individuales tiene el siguiente orden $\text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2 > \text{KCl}$. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recogen en la Figura 5.81. El MgCl_2 tiene la mayor contribución a la acidez libre. En la gráfica de contorno (Figura 5.81), los valores

aumentan desde el vértice KCl hacia la base opuesta cuando éste se sustituye por CaCl_2 o MgCl_2 . Sin embargo, el aumento es más rápido cuando se reemplaza por MgCl_2 .

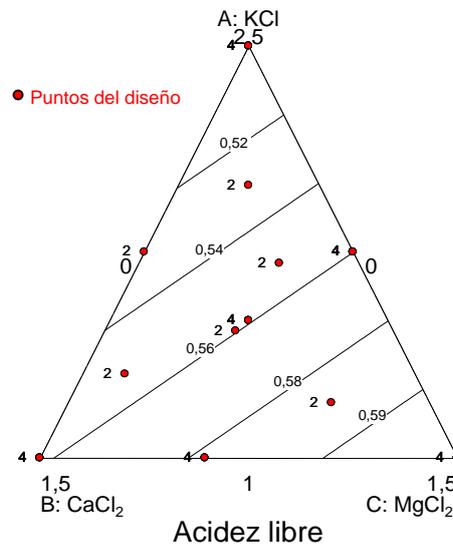


Figura 5.81. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno de la acidez libre final en las salmueras en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 cercano a ellos.

La acidez combinada tiene unos valores finales que oscilan entre 0,013 Eq/L (tratamiento 4; 1:1,5:0) y 0,023 Eq/L (tratamiento 1; 2,5:0:0) (Tabla 5.33). Sin embargo no se encuentra relación alguna entre estos valores y las concentraciones de sales en las salmueras.

5.3.1.1.2. Color

En la Tabla 5.34 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los parámetros de color estudiados.

Tabla 5.34. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Valores finales de los diferentes parámetros relacionados con el color de los frutos, según tratamientos.

Tratamientos	Índice color	L*	a*	b*
1	29,07	53,46	3,77	35,43
2	29,06	53,89	3,84	34,78
3	31,20	54,44	4,49	33,61
4	31,46	55,02	4,21	33,97
5	31,10	54,70	4,50	33,69
6	29,83	53,91	4,48	33,54
7	30,65	54,19	4,62	34,69
8	30,08	54,18	4,56	34,15
9	29,36	54,52	4,31	34,63
10	30,10	54,41	4,02	34,03
11	31,36	54,99	4,20	34,31
12	32,80	56,10	4,20	35,13
13	29,08	53,93	4,12	35,28
14	29,53	53,75	4,31	36,02
15	29,90	54,46	3,96	35,09
16	28,62	53,51	4,02	35,69
17	28,55	53,28	4,02	35,05
18	29,57	54,09	4,12	35,96
19	28,35	52,90	4,11	34,57

Los parámetros finales de color L*, a* e índice de color no muestran ningún cambio debido a la adición de sales en los envasados. Sin embargo, el parámetro b* se relaciona con las mismas mediante un modelo cuadrático ($p=0,0193$; falta de ajuste, $p=0,7550$). A pesar de ello, la proporción de la varianza explicada es baja ($\sim 31\%$), lo que hace que el modelo no se pueda considerar fiable. Todo ello, obliga a tener mucho cuidado en la interpretación de estos datos, pudiéndose hablar solo de tendencias y no de una función en sentido estricto. El modelo, una vez transformados, da lugar a la siguiente ecuación:

$$b^* = +13,10 \cdot KCl + 11,66 \cdot CaCl_2 + 16,37 \cdot MgCl_2 + 2,13 \cdot KCl \cdot CaCl_2 - 2,47 \cdot KCl \cdot MgCl_2 \quad (5.53)$$

Tabla 5.35. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Valores finales de textura (N/100g aceituna), según tratamientos.

Tratamientos	Textura instrumental	
	Media	Desviaciones estándar
1	2,7	0,9
2	3,3	0,9
3	2,7	0,6
4	3,5	0,6
5	3,2	0,7
6	2,8	0,6
7	2,7	0,6
8	3,2	0,7
9	3,2	0,5
10	2,4	0,6
11	2,9	0,7
12	3,3	0,7
13	3,5	0,7
14	3,2	0,6
15	2,9	0,6
16	2,8	0,5
17	3,4	0,6
18	3,6	0,9
19	2,0	0,4

Tras obtener los coeficientes, se tiene la siguiente ecuación para estimar la textura instrumental en función de las concentraciones expresadas en porcentajes:

$$\text{Textura} = +1,12 \cdot \text{KCl} + 1,62 \cdot \text{CaCl}_2 + 1,01 \cdot \text{MgCl}_2 + 0,48 \cdot \text{CaCl}_2 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.54)$$

El orden de importancia de los efectos lineales de las diferentes sales es $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{MgCl}_2$, siendo el de la interacción $\text{CaCl}_2 \cdot \text{MgCl}_2$ de menor magnitud que cualquiera de los efectos lineales. En la gráfica de contorno (Figura 5.83) se observa que los tratamientos con CaCl_2 poseen valores mayores de textura, como ya se ha descrito en las experiencias de fermentación. Por el contrario, los valores más bajos se detectan en el eje KCl-MgCl_2 , sin la adición de CaCl_2 .

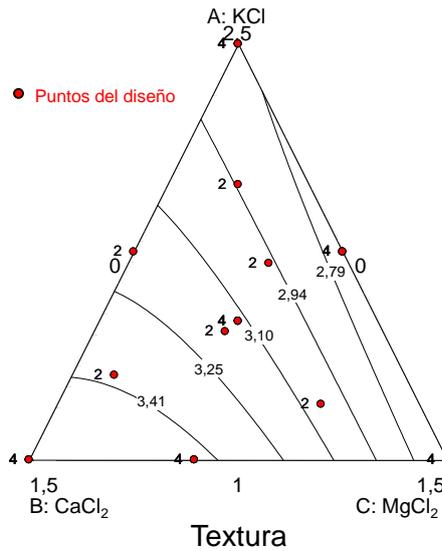


Figura 5.83. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno de la textura final en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.3.1.1.4. Contenido de minerales en pulpa

Este diseño tiene en consideración los resultados de las experiencias anteriores. En este sentido, en lugar de la salmuera de envasado que habitualmente se emplea con el 5% de sal, la proporción de la misma se ha reducido solo al 2,5%, completándose hasta el nivel habitual con KCl, CaCl₂ y MgCl₂, utilizándose las limitaciones ya explicadas en Materiales y Métodos. Las concentraciones relativas de Na, K, Ca, y Mg en pulpa al final del equilibrio se recogen en la Tabla 5.36.

Tabla 5.36. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Contenido (relativo al proceso tradicional) en Na, K, Ca, y Mg, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido relat. Na	Contenido relat. K	Contenido relat. Ca	Contenido relat. Mg
1	0,45	14,20	1,02	0,80
2	0,46	7,85	2,84	12,10
3	0,46	9,00	0,89	16,40
4	0,45	5,24	5,49	0,90
5	0,48	7,80	2,61	11,41
6	0,48	8,96	1,02	16,90
7	0,47	13,55	1,02	0,80
8	0,45	5,15	3,98	13,90
9	0,45	6,13	2,27	20,90
10	0,47	6,27	0,93	11,90
11	0,45	10,16	1,98	5,70
12	0,45	5,25	4,02	13,80
13	0,46	5,08	5,28	0,90
14	0,48	9,07	3,30	0,80
15	0,45	8,83	1,98	12,80
16	0,47	5,20	1,07	33,00
17	0,47	7,77	3,19	11,51
18	0,46	6,95	4,58	4,60
19	1,00	1,00	1,00	1,00
Media trad.*	1606 (15)	75 (1)	83 (1)	10 (1)

Nota: *Media (mg/100g pulpa) proceso tradicional, desviación estándar entre paréntesis.

Como puede apreciarse en la Tabla 5.36, la reducción de Na en los diferentes tratamientos ha sido relativamente homogénea presentando el producto final una proporción de Na de tan solo el 45-48% con respecto al producto tradicional. Ello representa que las nuevas presentaciones van a tener un contenido de sodio en torno a 800mg/100g pulpa. El resultado es tan homogéneo porque, en realidad, el diseño está basado en utilizar una salmuera base del 2,5% de NaCl en todas las mezclas del mismo y las únicas variables son las otras sales. Ésto quiere decir que envasándose con esta salmuera los niveles de sodio se reducen prácticamente a la mitad, con el consiguiente beneficio para los consumidores. Dicha reducción podría provocar una mejora considerable de la imagen del producto y, por consiguiente, un mayor consumo,

fundamentalmente en personas afectadas por problemas cardiovasculares relacionados con dicho elemento, tal como la hipertensión.

La independencia de la reducción del contenido relativo de Na en esta experiencia se ha comprobado, ajustando el diseño a los datos de la Tabla 5.36. El modelo no ha sido significativo, por lo que puede concluirse que la reducción de sal no depende de las concentraciones iniciales de las otras tres, siempre que estas sumen 2,5%.

Sin embargo, el cambio relativo en el contenido todos los demás elementos de las sales añadidas a la salmuera de envasado sí que mostraron una relación significativa. Se describen a continuación los modelos encontrados para cada una de ellos en función de las proporciones iniciales en las salmueras.

El contenido de potasio en pulpa está relacionado con las concentraciones iniciales mediante una ecuación cuadrática cuyo ajuste es significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,8787$). La ecuación transformada en los términos adecuados para la aplicación directamente de los porcentajes iniciales de las sales a la misma toma la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo K en pulpa} = & +5,49 * \text{KCl} - 0,30 * \text{CaCl}_2 + 1,58 * \text{MgCl}_2 \\ & - 1,43 * \text{KCl} * \text{MgCl}_2 \end{aligned} \quad (5.55)$$

De ella se deduce que la concentración final de K en pulpa depende fundamentalmente de los niveles iniciales de KCl, aunque también existe una influencia negativa de la presencia de CaCl_2 y de la interacción $\text{KCl} * \text{MgCl}_2$. En cualquier caso, la interpretación se realiza mejor, como siempre, mediante las líneas de contorno de los diagramas triangulares (Figura 5.84).

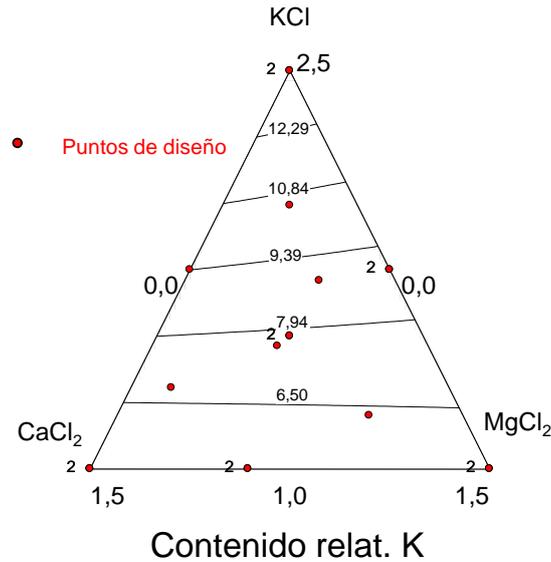


Figura 5.84. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de K en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Como se desprende de la Figura 5.84, la forma de la ecuación se refleja en que las líneas de contorno muestran una cierta inclinación para concentraciones bajas o moderadas de las otras sales, reduciéndose el contenido relativo más rápidamente a medida que se desciende en el eje KCl-CaCl₂ que cuando se hace lo mismo a lo largo del KCl-MgCl₂. Ello indica que se requieren concentraciones más elevadas de CaCl₂ que de MgCl₂ para provocar un cambio similar en el contenido relativo de K en la pulpa. En otras palabras, la mezcla necesita una proporción más elevada del primero a medida que la misma se desplaza hacia la izquierda. A concentraciones más elevadas, la línea de contorno es ya paralela a la base, lo que implica que en este caso, ya la proporción del incremento de K en la pulpa depende solo del porcentaje total de las otras sales, pero no de sus proporciones en las mezclas.

En los envasados normales las concentraciones de K son del orden de 75 mg/100 g pulpa (Tabla 5.36), multiplicándose unas 6 veces el mismo en algunos de los tratamientos. Teniendo en cuenta que los requerimientos de este mineral se sitúan en 3500 mg/día ([FDA Nutrition Labelling Manual, A guide for developing and using data bases, 1998](#)), el consumo de aceitunas enriquecidas en KCl puede ser un buen complemento para cubrir las necesidades de K.

En relación al contenido en calcio, el modelo sugerido es cuadrático y significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,2142$). La ecuación ya transformada para ser utilizada con porcentajes, es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Contenido relativo Ca en pulpa} = & +0,401 * \text{KCl} + 2,829 * \text{CaCl}_2 + 0,384 * \text{MgCl}_2 \\ & + 0,510 * \text{KCl} * \text{CaCl}_2 + 0,733 * \text{CaCl}_2 * \text{MgCl}_2 \end{aligned} \quad (5.56)$$

El coeficiente más destacado es el correspondiente a la sal de este elemento. Sin embargo, conviene poner de manifiesto todos los coeficientes de la ecuación son positivos, lo que quiere decir que tanto las demás sales como sus interacciones aumentan la concentración en Ca en pulpa. El estudio de la ecuación mediante representación gráfica se recoge en la Figura 5.85.

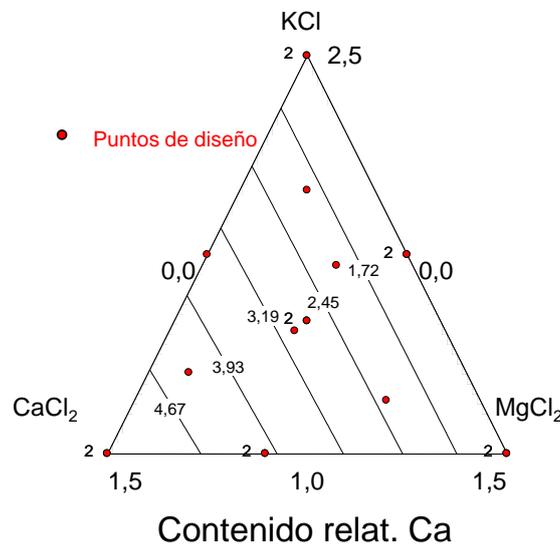


Figura 5.85. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de Ca en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El fruto ya de por sí contiene una concentración de Ca importante en el proceso habitual que aplican las empresas (en torno a 85 mg/100g pulpa). Pero la adición aumenta claramente la concentración del mismo hasta llegar a niveles de alrededor de unas cinco veces el habitual en el vértice CaCl_2 (Figura 5.85). Las líneas de contorno son rectas y paralelas a la base KCl-MgCl_2 , lo que indica que la incorporación de Ca a la pulpa es independiente, aproximadamente, de las proporciones de las otras sales. Por tanto, los términos cuadráticos del modelo tienen, en la práctica, un efecto limitado.

Como ocurre en otros casos, el margen de adición de CaCl_2 para conseguir un incremento interesante desde el punto de vista del valor nutricional en calcio es amplio, por lo que no sería difícil hacer compatible un posible enriquecimiento de la proporción del mismo con el hecho de que ello no represente ningún inconveniente de tipo sensorial.

Finalmente, en cuanto al contenido en Mg, este es un elemento que tiene poco efecto sobre el desarrollo de microorganismos por lo que su empleo en aceitunas tendría solo la finalidad de enriquecer el producto en este nutriente, del que, por otra parte, se tiene unas necesidades diarias relativamente limitadas (400 mg/día), según [FDA Nutrition Labelling Manual \(1998\)](#).

En este caso, el modelo sugerido es solo lineal y se ajusta significativamente ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,9683$). Toma la forma siguiente para ser utilizado en porcentajes de sales en la salmuera de envasado:

$$\text{Contenido relativo de Mg en pulpa} = +1,013 \cdot \text{KCl} + 1,089 \cdot \text{CaCl}_2 + 16,849 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.57)$$

Como se desprende de la ecuación, la contribución más destacada al contenido en Mg la realiza la presencia de MgCl_2 , teniendo el resto de sales efectos muy similares. La interpretación gráfica se da en la Figura 5.86.

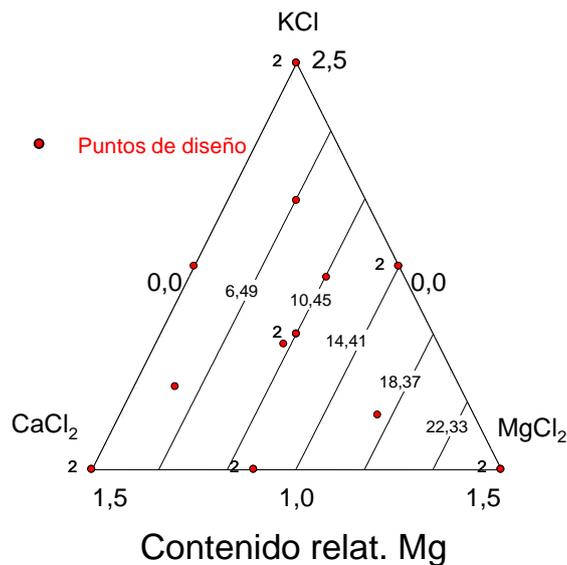


Figura 5.86. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de Mg en función de la concentración de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Las líneas de contorno son totalmente paralelas a la base KCl-CaCl₂, lo que indica el aspecto ya comentado anteriormente de la limitada influencia de la presencia de las otras sales en la absorción de Mg por la pulpa de las aceitunas.

La concentración en el producto normal está en torno a los 10 mg/100 g pulpa, (Tabla 5.36). Sin embargo cuando se incorpora la sal del mismo a la salmuera, el contenido en este elemento aumenta de una manera importante, pudiéndose llegar a tener, en algunos tratamientos, proporciones en pulpa en torno a unas 23 veces la del producto tradicional, especialmente cuando se añade 1,5% de MgCl₂ en la salmuera de envasado.

En definitiva, de todo lo anteriormente expuesto resulta que la sustitución de la sal común utilizada habitualmente en el envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano por una mezcla de sales puede resultar una manera muy fácil de disminuir el contenido final en sodio prácticamente a la mitad, al tiempo que se obtienen productos enriquecidos en otros elementos tales como K, Ca, y Mg. Desde el punto de vista práctico, esta forma de obtener las nuevas presentaciones es muy simple y económica, ya que no implicaría ningún tipo de modificación del proceso de fermentación, que podría seguir practicándose tal y como se realiza en la actualidad.

5.3.1.1.5. Análisis sensorial

Los valores medios de los jueces para los diversos atributos del producto final se dan en la Tabla 5.37. Para su estudio estadístico se ha procedido previamente a centrarlos por jueces, transformación que es usual cuando se está más interesado en los tratamientos que en el comportamiento de los panelistas.

Tabla 5.37. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Puntuaciones medias de los jueces para cada uno de los descriptores sensoriales estudiados, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Dureza	Fibrosidad	Crujiente
1	6,6 (2,5)	7,7 (2,3)	4,9 (2,3)	9,4 (2,5)	8,4 (3,3)	8,9 (3,0)
2	8,5 (2,2)	9,2 (1,6)	6,9 (3,5)	8,9 (2,9)	8,6 (3,4)	8,5 (3,2)
3	8,2 (2,8)	8,3 (2,6)	5,1 (2,3)	9,4 (2,4)	8,9 (3,0)	9,5 (2,2)
4	7,1 (2,9)	6,8 (3,3)	9,8 (2,9)	10,5 (2,4)	10,7 (2,0)	10,9 (2,4)
5	8,4 (2,7)	9,4 (1,6)	7,4 (3,7)	9,7 (3,2)	9,5 (2,9)	9,4 (3,1)
6	7,5 (2,8)	9,2 (2,5)	3,9 (2,1)	8,3 (2,2)	7,8 (2,7)	9,3 (2,3)
7	8,0 (2,6)	8,4 (1,7)	4,2 (2,0)	8,7 (1,7)	8,7 (2,5)	8,3 (2,8)
8	6,6 (2,4)	8,8 (2,3)	9,1 (4,0)	10,1 (2,1)	9,9 (2,1)	10,6 (1,7)
9	9,1 (2,7)	8,4 (2,0)	7,7 (3,4)	9,0 (2,4)	9,9 (2,7)	9,7 (2,1)
10	8,0 (2,8)	8,4 (1,8)	5,0 (2,1)	9,2 (2,6)	8,0 (3,5)	8,7 (3,1)
11	6,8 (2,3)	7,1 (2,7)	5,3 (2,6)	8,4 (3,1)	9,2 (3,3)	9,1 (3,5)
12	9,0 (1,7)	8,2 (2,5)	9,7 (3,6)	9,2 (2,4)	9,2 (2,5)	9,1 (1,8)
13	7,8 (2,1)	8,2 (1,9)	11,2 (3,2)	10,4 (1,5)	10,2 (2,5)	10,4 (2,2)
14	7,7 (3,0)	8,3 (2,7)	7,3 (4,0)	10,5 (1,9)	9,1 (2,9)	10,1 (2,5)
15	8,4 (2,1)	9,6 (2,0)	6,8 (3,0)	9,0 (2,3)	8,8 (3,1)	9,1 (2,7)
16	8,5 (2,7)	9,6 (2,6)	6,8 (2,8)	8,2 (2,2)	8,5 (3,0)	8,5 (2,4)
17	8,3 (3,2)	9,3 (2,6)	6,8 (3,5)	9,4 (3,2)	9,8 (2,9)	9,8 (2,4)
18	7,9 (3,3)	8,7 (2,5)	10,0 (3,1)	9,6 (2,4)	9,3 (3,4)	9,9 (2,6)
19	8,0 (2,3)	9,3 (2,7)	4,4 (1,7)	8,5 (2,7)	7,7 (3,0)	8,3 (2,4)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

El sabor ácido se ajusta con un modelo lineal, mostrando el análisis de varianza que el ajuste es significativo ($p=0,0013$; falta de ajuste, $p=0,9883$). Considerando los coeficientes del modelo, la ecuación tiene la siguiente expresión:

$$\text{Ácido (centrado)} = -0,12 \cdot \text{KCl} - 1,25 \cdot \text{CaCl}_2 + 0,26 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.58)$$

Como puede verse, los efectos lineales de las diferentes sales siguen el siguiente orden $\text{CaCl}_2 > \text{MgCl}_2 > \text{KCl}$. En la gráfica de contorno (Figura 5.87) se aprecia que el sabor ácido aumenta de izquierda a derecha de una manera progresiva a medida que sube la proporción de MgCl_2 . En este caso, las líneas son casi perpendiculares a la base, lo que hace que, en esta ocasión, la evolución sea prácticamente independiente de la concentración de KCl y, sin embargo, dependa de la progresiva sustitución del CaCl_2 por MgCl_2 en el diagrama.

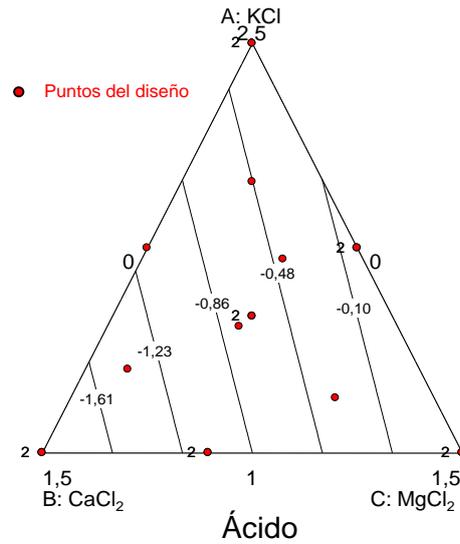


Figura 5.87. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno de la puntuación para sabor ácido (centrado para jueces) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El sabor salado se puede ajustar mediante un modelo lineal, que resulta significativo ($p=0,0003$; falta de ajuste, $p=0,4834$). Al realizar la transformación de los coeficientes, la ecuación tiene la forma expresada a continuación:

$$\text{Salado (centrado)} = +0,23 \cdot \text{KCl} - 1,26 \cdot \text{CaCl}_2 + 0,50 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.59)$$

Al igual que para el sabor ácido, el efecto de las diferentes sales individuales sigue el siguiente orden $\text{CaCl}_2 > \text{MgCl}_2 > \text{KCl}$. La evaluación de este descriptor (Figura 5.88) es independiente de la concentración inicial de NaCl. Mejora con la progresiva sustitución del KCl y MgCl_2 por CaCl_2 en el diagrama (desplazamiento de derecha a izquierda).

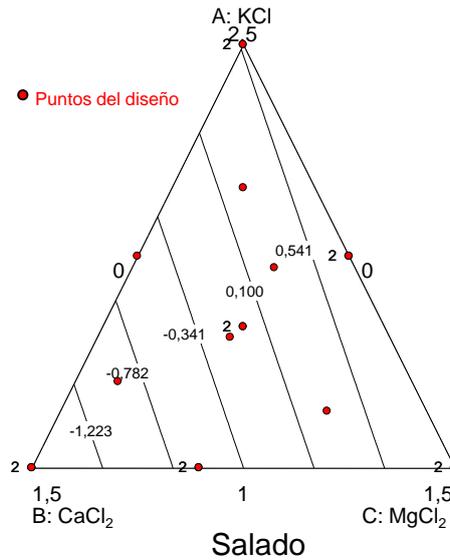


Figura 5.88. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Línea de contorno de las puntuaciones para el sabor salado (centrado para jueces) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El sabor amargo puede ajustarse empleando un modelo lineal, que resulta significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,5653$). Considerando los coeficientes del modelo, la ecuación transformada queda reflejada en la siguiente expresión:

$$\text{Amargo (centrado)} = -1,40 * \text{KCl} + 1,81 * \text{CaCl}_2 - 0,59 * \text{MgCl}_2 \quad (5.60)$$

Como puede apreciarse, los efectos lineales de las diferentes sales responden al siguiente orden $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{MgCl}_2$. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recogen en la Figura 5.89. La sensación de amargo aumenta a medida que sube la proporción de CaCl_2 . Las líneas de contorno, son casi perpendiculares al lado $\text{KCl}-\text{CaCl}_2$, indicando que el efecto de las concentraciones de MgCl_2 no es muy importante y que el sabor amargo depende fundamentalmente de las relaciones KCl/CaCl_2 .

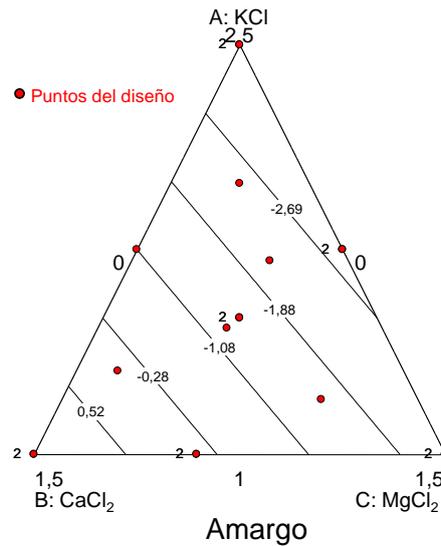


Figura 5.89. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Líneas de contorno de las puntuaciones de sabor salado (centrado para jueces) en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

El resto de descriptores, dureza, fibrosidad y crujiente, no han estado relacionados con las diferentes mezclas de sales utilizadas en la preparación de las salmueras de envasado.

5.3.1.1.6. Análisis multivariante

Se ha realizado en este caso mediante la técnica PLS, con objeto de relacionar las respuestas sensoriales con las características fisicoquímicas del producto, incluyendo el contenido de las aceitunas en los minerales analizados. El estudio se ha realizado utilizando los resultados centrados de las puntuaciones sensoriales como variables respuestas (matriz Y) y las segundas como variables cuantitativas independientes (matriz X). Como resultado del análisis se ha obtenido la proyección de ambas matrices en los componentes obtenidos con PLS (Figura 5.90).

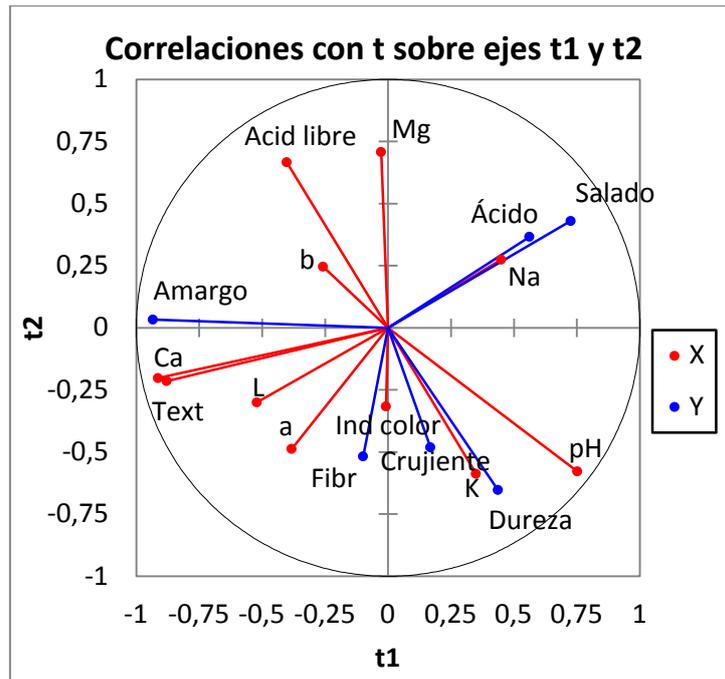


Figura 5.90. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Proyección de los descriptores sensoriales y las variables físico-químicas en el plano de las dos primeras componentes PLS.

Como puede observarse, existe poca correlación entre muchos de los descriptores sensoriales así como de las variables físico-químicas porque todas ellas se distribuyen de una manera bastante regular dentro del círculo unidad de la Figura 5.90. Sin embargo, también se aprecia que fibrosidad, crujiente y dureza (sensaciones cinestésicas) están muy próximas entre sí y, por tanto, fuertemente relacionadas. De la misma manera, los descriptores ácido y salado se sitúan prácticamente en el mismo vector, indicando una intensa relación entre ellos. Sin embargo, la sensación de amargo está muy poco relacionada con el resto de los descriptores utilizados en este estudio.

Por lo que respecta a las características físico-químicas, el contenido de Na se relaciona (bajos cosenos de los vectores respectivos) con ácido y salado. Igualmente, el contenido en calcio y la textura instrumental están íntimamente relacionados entre sí y con la sensación de amargo; en este caso, la textura lo está indirectamente por su relación con el calcio. El contenido en K está ligado a dureza y a crujiente en mayor intensidad, mientras su contribución a la fibrosidad es menos intensa. Próximo al pH esta también el K así como el índice de color (pero la longitud de este es relativamente

reducida). La relación entre las características físico-químicas no está claramente relacionada entre sí ni tampoco con los descriptores sensoriales.

Por tanto, la figura es muy clara en cuanto a poner de manifiesto las relaciones entre las variables integrantes de ambas matrices (descriptores sensoriales y características físico-químicas) así como también dentro de ellas.

Si a esta matriz se añaden las correlaciones de los casos con las componentes PLS, se podrá poner de manifiesto las características que mejor definen a cada tratamiento (Figura 5.91).

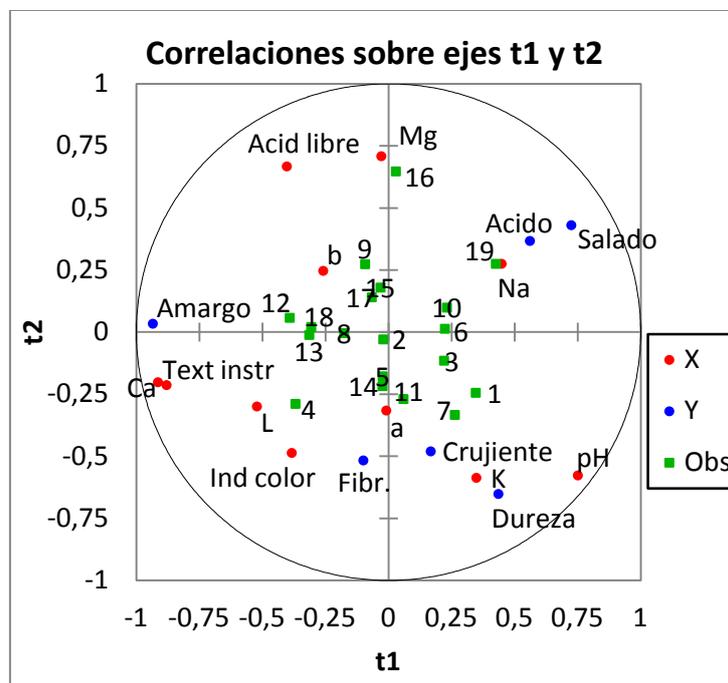


Figura 5.91. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Proyección de los descriptores sensoriales, las variables físico-químicas y los tratamientos en el plano de las dos primeras componentes PLS.

De la observación de la Figura 5.91 se deduce que la mayoría de los tratamientos se agrupan en torno al centro de los ejes, lo que indica unas características relativamente semejantes entre todos ellos. No obstante, destacan dos de ellos. Así, el control (que es el producto habitual envasado solo con sodio), está caracterizado fundamentalmente por su sabor salado y ácido así como por su alto contenido en sodio. Por otra parte, el tratamiento 16 destaca con respecto a los demás, por su elevado contenido en Mg y alta

elevado acidez, lo que está de acuerdo con lo antes comentado en el sentido de que la acidez libre aumentaba a medida que crecía la presencia de $MgCl_2$ en las salmueras de envasado (Figura 5.91).

El estudio estadístico permite la obtención de las ecuaciones que predicen las puntuaciones sensoriales en función de las características físico-químicas, así como el grado de relación de estas con las componentes PLS.

5.3.1.2. Efecto sobre los microorganismos

Durante todo el periodo de estudio de estos envasados no se detectan ni enterobacterias ni BAL, por lo que solo se puede estudiar la evolución de las poblaciones de levaduras.

El comportamiento de las levaduras en todos los tratamientos es el esperado en este tipo de preparaciones. Se detectan poblaciones elevadas ($\sim 5 \log_{10}$ ufc/mL) desde el primer día de envasado, produciéndose un descenso progresivo hasta el final del estudio (Figura 5.92).

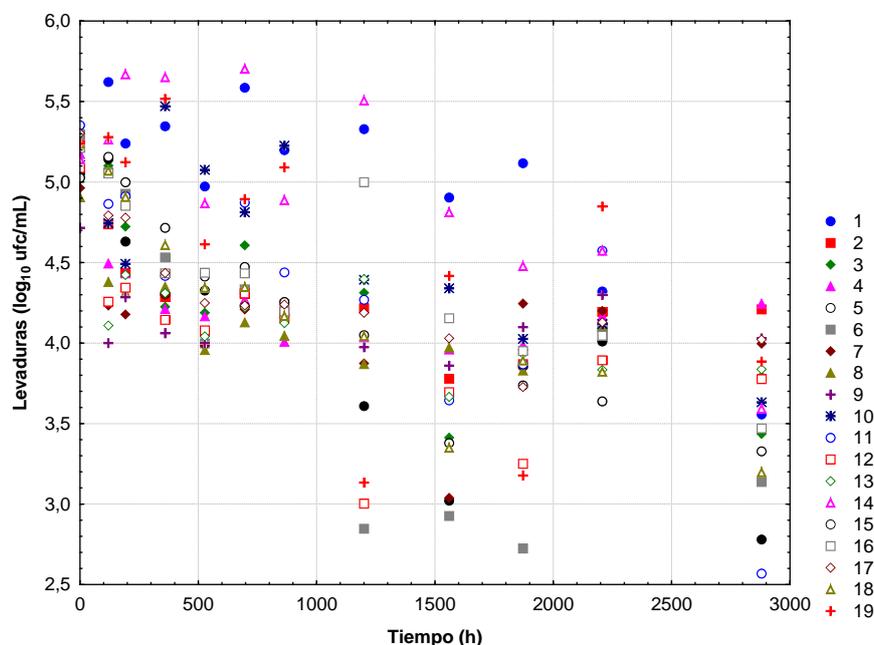


Figura 5.92. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Cambio de la población de levaduras con el tiempo, según tratamientos.

Tabla 5.38. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales. Valores del área bajo la curva de la población de levaduras con el tiempo, según tratamientos.

Tratamiento	Área bajo curva
1	13681
2	11984
3	11704
4	11796
5	10979
6	10481
7	11529
8	11471
9	11710
10	12450
11	11648
12	10891
12	11547
14	13560
15	11362
16	12158
17	12011
18	11433
19	11924

La evolución de la población de levaduras no se ajusta adecuadamente a ninguna ecuación primaria de crecimiento/muerte de microorganismos. Por tanto, se recurre al estudio del área bajo las curvas (Tabla 5.38), con objeto de obtener una visión global del efecto las mezclas de sales sobre la presencia de levaduras a lo largo del envasado.

El área puede ajustarse empleando un modelo cuadrático, que resulta significativo ($p=0,0008$; falta de ajuste, $p=0,4986$). Sin embargo, en este caso, el grado de explicación de la varianza que se obtiene es bajo, por lo que el modelo no se pueda considerar totalmente fiable. De todas formas, la precisión estuvo ligeramente por encima del límite de 4 fijado para la significación. Todo ello obliga a tener mucho cuidado en la interpretación de estos datos. Considerando los coeficientes del modelo, y una vez realizada la transformación de los mismos, la ecuación queda de la forma reflejada a continuación:

$$\text{Áreas levaduras} = +5032 \cdot \text{KCl} + 2666 \cdot \text{CaCl}_2 + 7548 \cdot \text{MgCl}_2 + 1710 \cdot \text{KCl} \cdot \text{CaCl}_2 - 2648 \cdot \text{KCl} \cdot \text{MgCl}_2 - 1367 \cdot \text{CaCl}_2 \cdot \text{MgCl}_2 \quad (5.61)$$

Como puede observarse, los efectos lineales de las diferentes sales tienen el siguiente orden $\text{MgCl}_2 > \text{KCl} > \text{CaCl}_2$. En cuanto a las interacciones, siendo todas de menor magnitud, destacan las interacciones del KCl con las otras dos sales. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recogen en la Figura 5.93. Las áreas son mayores en la línea que conecta los vértices KCl-CaCl₂ y en el vértice de MgCl₂. Sin embargo, en las zonas centrales del triángulo es donde se detectan las áreas menores, y por lo tanto, un crecimiento más reducido.

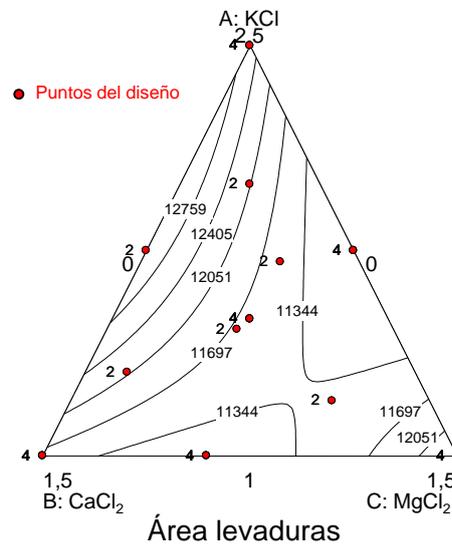


Figura 5.93. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes sales.

Líneas de contorno del área bajo la curva de las levaduras en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

5.3.2. Envasado de aceitunas Aloreña de Málaga tradicional

5.3.2.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.3.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

La Tabla 5.39 muestra los valores obtenidos para el pH, acidez libre y combinada al final del envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional.

Tabla 5.39. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Valores finales de pH, acidez libre y acidez combinada en las salmueras, según tratamientos.

Tratamiento	pH	Acidez libre (g láctico/100 mL)	Acidez combinada (Eq/L)
1	3,88	0,46	0,056
2	3,94	0,44	0,038
3	3,66	0,47	0,108
4	3,80	0,45	0,035
5	3,89	0,45	0,036
6	3,77	0,47	0,038
7	3,79	0,57	0,045
8	3,80	0,48	0,040
9	4,02	0,40	0,037
10	3,95	0,41	0,040
11	3,85	0,45	0,043
12	3,87	0,45	0,036
13	3,68	0,44	0,036
14	3,59	0,48	0,038
15	3,90	0,43	0,044

Los valores finales (1193 h) de pH oscilan entre 3,59 (tratamiento 14; 2,5:1,25:1,25) y 4,02 (tratamiento 9; 3,75:1,25:0) (Tabla 5.39). El pH final se ajusta con un modelo lineal ($p=0,0373$; falta de ajuste, ($p=0,4193$). Teniendo en cuenta los coeficientes del modelo, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\text{pH final} = +0,79*\text{NaCl}+0,74*\text{KCl}+0,69*\text{CaCl}_2 \quad (5.62)$$

Los efectos lineales siguen el orden $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CaCl}_2$. La interpretación en forma de gráfica triangular con sus correspondientes líneas de contorno se recoge en la Figura 5.94. Los mayores valores de pH se detectan en el vértice de NaCl, sufriendo un descenso a medida que la composición de la mezcla se desplaza hacia el vértice CaCl_2 . Por el contrario, el efecto del KCl es poco destacado.

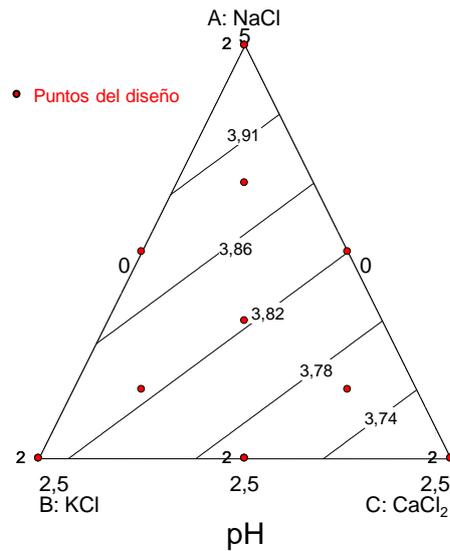


Figura 5.94. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Líneas de contorno del pH final en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Finalmente, ni la acidez libre ni la acidez combinada se pueden relacionar con las concentraciones iniciales de las sales en las salmueras de envasado, con unos valores que oscilan entre 0,40 y 0,57g láctico/100 mL de salmuera para la acidez libre y 0,035 y 0,108 Eq/L para la acidez combinada.

5.3.2.1.2. Color

En la Tabla 5.40 se muestran los diferentes parámetros relacionados con el color de los frutos del envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes mezclas de sales. Sin embargo, ninguno de los parámetros estudiados puede ser relacionado con las concentraciones iniciales de sales minerales utilizadas en los diferentes tratamientos.

Tabla 5.40. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Valores finales de los parámetros de color de aceituna, según tratamientos.

Tratamientos	Índice color	L*	a*	b*
1	38,71	56,26	5,29	36,31
2	39,29	55,35	5,86	31,56
3	39,05	54,31	6,20	32,00
4	42,90	57,22	3,17	33,59
5	41,53	56,63	5,82	34,18
6	37,19	53,30	6,20	29,77
7	36,80	51,82	6,55	26,42
8	37,15	55,02	5,07	32,92
9	38,76	54,62	6,06	31,49
10	37,39	53,04	6,06	29,25
11	38,89	54,26	5,76	28,91
12	38,01	54,01	5,76	28,30
13	38,75	51,11	7,44	25,19
14	38,76	54,73	5,65	32,14
15	42,60	58,41	5,37	34,67

5.3.2.1.3. Textura instrumental

Los valores de textura para cada uno de los tratamientos oscilan entre 3,9 (tratamiento 8; 4,167:0,417:0,417) y 5,4 (tratamiento 10; 3,750:0:1,25) (Tabla 5.41). Al igual que en el caso del color, no se pueden relacionar estos valores con las concentraciones iniciales de las salmueras de envasado.

Tabla 5.41. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Valores finales de textura de aceituna, según tratamientos.

Tratamiento	Textura instrumental	
	Media	Desviación estándar
1	4,7	0,8
2	4,6	1,0
3	4,5	1,1
4	4,8	1,3
5	4,3	0,6
6	4,4	0,7
7	4,4	1,0
8	3,9	2,4
9	4,8	1,3
10	5,4	0,9
11	4,5	1,7
12	4,3	0,8
13	4,1	0,6
14	4,8	1,3
15	4,5	0,8

5.3.2.1.4. Contenido de minerales en pulpa

Al final de la vida de mercado se les determina a los frutos las concentraciones en pulpa de los elementos implicados en el diseño (Moreno Baquero, 2011). Los contenidos relativos al proceso tradicional de envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional, según los diferentes tratamientos, se da en la Tabla 5.42.

Tabla 5.42. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Contenidos (relativos al producto tradicional) de Na, K y Ca en pulpa, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido relat. Na	Contenido relat. K	Contenido relat. Ca
1	1,01	1,01	0,93
2	0,95	1,03	0,90
3	0,70	1,16	3,23
4	0,70	1,09	3,11
5	0,77	3,97	1,28
6	0,77	3,22	1,95
7	0,80	5,85	0,89
8	0,88	1,87	1,25
9	0,89	3,34	1,03
10	0,82	1,12	2,12
11	0,75	2,34	1,67
12	0,72	5,01	0,95
13	0,77	1,54	2,41
14	0,69	2,75	2,02
15	1,04	0,96	1,17
Media trad.*	1481 (34)	95 (2)	111 (8)

Nota: * Media (mg/100g pulpa) proceso tradicional, desviación estándar entre paréntesis.

Para este tipo de aceituna, todos los modelos sugeridos para explicar los cambios en el contenido relativo de Na, K y Ca en la pulpa de las aceitunas en función de las concentraciones de las respectivas sales han sido lineales.

En el caso del Na, el mismo se ajusta adecuadamente y es significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,9717$). Una vez realizada la transformación, la ecuación para aplicar directamente los porcentajes de las sales en las salmueras de envasado es la siguiente:

$$\text{Contenido relativo Na en pulpa} = +0,194 * \text{NaCl} + 0,108 * \text{KCl} + 0,083 * \text{CaCl}_2 \quad (5.63)$$

Como era de esperar el coeficiente más elevado (mayor contribución al contenido en Na en la pulpa del producto final), es el correspondiente al NaCl, mientras que los de los otros dos son bastante más bajos y próximos entre sí. La ecuación

representa un plano inclinado en el que las pendientes son los respectivos coeficientes. El estudio de la misma mediante gráfica triangular se da en la Figura 5.95.

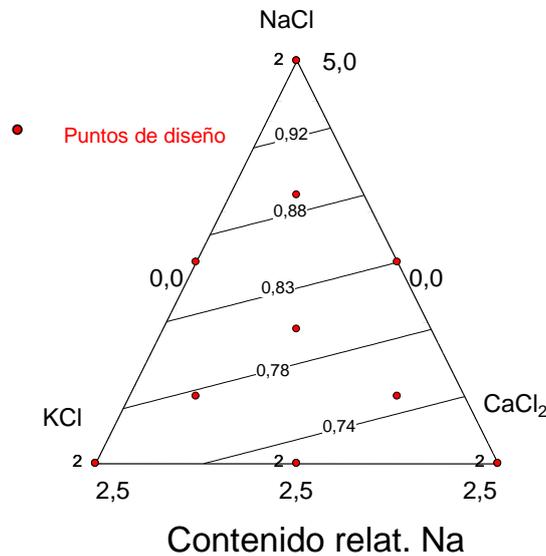


Figura 5.95. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al producto tradicional) de Na en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

Aparte del hecho lógico de que, a medida que disminuye la proporción añadida de NaCl descienda la proporción de Na en pulpa, las líneas de contorno son paralelas entre sí, pero inclinadas hacia el eje que une los vértices NaCl y KCl. Esto quiere decir que el contenido relativo de Na disminuye más rápidamente a medida que el NaCl se sustituye por KCl que cuando se cambia por CaCl₂. Por tanto, aparentemente, la presencia de calcio dificulta la eliminación de Na. En general, el descenso del contenido relativo de Na en pulpa que se consigue de esta manera es bastante moderado ya que el producto final queda con una proporción de aproximadamente el 75% del original.

En el caso del K, el modelo es, asimismo, significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, ($p = 0,9407$). La ecuación transformada obtenida para calcular la concentración relativa de K en es la siguiente:

$$\text{Contenido relativo K en pulpa} = +0,215 * \text{NaCl} + 1,928 * \text{KCl} + 0,178 * \text{CaCl}_2 \quad (5.64)$$

El coeficiente más alto (contribución más elevada) es la del KCl mientras que los coeficientes correspondientes a las otras dos sales son relativamente similares. La interpretación mediante líneas de contorno se da en la Figura 5.96.

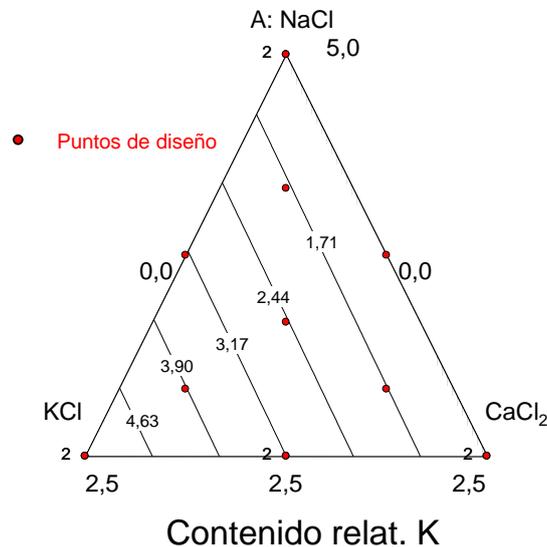


Figura 5.96. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al producto tradicional) de K en pulpa en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 cercano a ellos.

Las líneas de contorno son paralelas al lado que une los vértices NaCl y CaCl₂, en la que no existe proporción alguna de KCl en la salmuera inicial (contenido relativo de K más bajo). A medida que la proporción de KCl aumenta, también lo hace de manera sistemática la proporción de K en pulpa, que alcanza, como era de esperar, su valor más alto en el vértice KCl. El hecho de que las líneas de contorno sean totalmente paralelas indican que el K en pulpa disminuye de manera similar cuando se sustituye por NaCl o CaCl₂ el KCl o viceversa, siempre que la proporción de las dos sales siga la línea de contorno. En todo caso, debe recalcar el hecho de que el aumento relativo de K es bastante más moderado que en las experiencias de fermentación descritas anteriormente, pudiéndose mejorar el contenido en potasio de las aceitunas de este tipo hasta en unas cinco veces, con un impacto destacado en las características nutricionales del producto, que, además, parece más realista que la realización de tales cambios en las experiencias de fermentación descritas anteriormente.

Respecto al Ca, el modelo es asimismo lineal y significativo ($p < 0,0001$; falta de ajuste, $p = 0,4400$). En ese caso, el mismo es mucho más simple que el encontrado para las fermentaciones de las variedades Gordal y Manzanilla (modelos cúbicos). Posiblemente ello se deba a que, en estas aceitunas, los frutos no se han tratado con NaOH y la pulpa permanece más “entera” que en las aceitunas verdes estilo español y la pulpa presenta menos receptores para la adhesión del Ca.

La ecuación en función de las variables en porcentajes es la siguiente:

$$\text{Contenido relativo de Ca en pulpa} = +0,188 * \text{NaCl} + 0,176 * \text{KCl} + 1,074 * \text{CaCl}_2 \quad (5.65)$$

Como era de esperar el coeficiente más alto corresponde al Ca mientras que los otros dos son relativamente más bajos pero bastante similares entre sí. Como siempre, la mejor interpretación se efectúa mediante la representación de los diagramas triangulares correspondientes y sus líneas de contorno, tal como se ha realizado en la Figura 5.97.

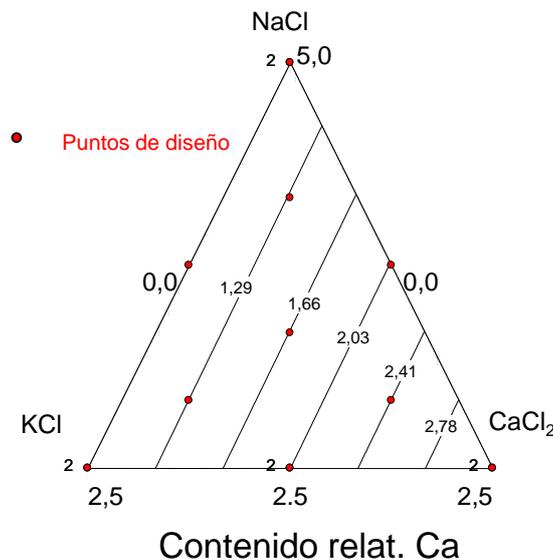


Figura 5.97. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Líneas de contorno del contenido (relativo al proceso tradicional) de Ca en pulpa, en función de las concentraciones iniciales de sales. Los duplicados del diseño se indican con un 2 junto a ellos.

En dicha Figura 5.97 se aprecia que el Ca sigue un comportamiento similar al ya observado en los demás elementos. Aumenta cuando la mezcla se desplaza desde el lado que une los vértices NaCl y KCl hacia el vértice CaCl₂. El aumento es progresivo,

dando lugar a unas líneas de contorno prácticamente paralelas. El aumento que se produce en la concentración de Ca a los porcentajes más altos empleados es del orden de unas tres veces el que se encuentra en el producto tradicional. El que las líneas sean paralelas indica que el Ca puede sustituir proporciones iguales de Na y de K. Como se ha comentado anteriormente, en esta preparación no parece darse, pues, un efecto de apreciable de retención de Ca en pulpa.

5.3.2.1.5. Análisis sensorial

Los resultados medios dados por los panelistas para cada uno de los descriptores se expresan en la Tabla 5.43. Para su estudio estadístico, y como en casos anteriores, se ha procedido previamente a centrarlos por panelistas. En este caso, las puntuaciones de los descriptores salado, amargo y fibrosidad han estado relacionadas con la concentración inicial de sales minerales en el envasado.

Tabla 5.43. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Puntuaciones medias del panel para cada descriptor, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Textura	Fibrosidad	Crujiente
1	4,8 (1,8)	6,7 (1,5)	4,7 (2,0)	7,3 (1,6)	6,5 (2,7)	7,9 (2,2)
2	5,6 (2,2)	6,5 (2,0)	5,9 (2,3)	7,1 (1,6)	6,5 (2,5)	7,5 (2,1)
3	4,1 (1,6)	4,8 (2,3)	6,6 (2,2)	7,8 (1,5)	6,8 (2,2)	8,1 (2,4)
4	4,4 (1,7)	5,7 (1,7)	6,6 (2,2)	7,3 (1,3)	6,5 (2,1)	7,7 (2,2)
5	4,7 (2,0)	6,3 (1,9)	5,3 (1,7)	7,4 (1,7)	6,8 (2,2)	8,0 (2,1)
6	4,3 (1,9)	5,4 (1,6)	6,4 (2,3)	7,6 (1,2)	7,1 (2,2)	8,3 (2,0)
7	5,1 (1,9)	6,5 (1,8)	5,3 (2,0)	7,4 (1,7)	6,6 (2,0)	7,7 (2,1)
8	4,4 (1,8)	6,0 (1,7)	5,8 (2,2)	6,9 (1,3)	6,5 (1,9)	7,5 (2,1)
9	4,8 (1,8)	5,9 (2,0)	5,7 (1,5)	7,2 (1,3)	6,7 (2,0)	7,3 (2,2)
10	4,8 (1,8)	5,9 (1,5)	5,9 (1,6)	7,5 (1,1)	6,6 (2,2)	7,6 (2,4)
11	5,3 (2,2)	6,1 (1,9)	5,6 (2,3)	7,5 (1,5)	6,8 (2,4)	7,7 (2,1)
12	4,4 (2,2)	5,5 (1,6)	5,3 (1,9)	7,1 (1,6)	6,7 (1,7)	7,3 (2,2)
13	4,7 (2,1)	5,8 (1,7)	6,4 (2,0)	7,3 (1,6)	6,8 (2,6)	8,2 (1,8)
14	4,6 (2,2)	5,8 (1,7)	5,4 (2,5)	7,2 (1,5)	6,8 (1,9)	7,5 (2,1)
15	4,9 (2,1)	6,4 (1,9)	4,8 (1,7)	6,9 (1,4)	6,3 (2,1)	7,1 (2,3)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

Para el sabor salado, el modelo sugerido por la suma secuencial de cuadrados es lineal y significativo ($p=0,0173$; falta de ajuste, $p=0,9203$). La ecuación en términos transformados para aplicarse a porcentajes iniciales de las sales es:

$$\text{Salado (centrado)} = +0,11 \cdot \text{NaCl} - 0,08 \cdot \text{KCl} - 0,36 \cdot \text{CaCl}_2 \quad (5.66)$$

De la ecuación se deduce que la mayor contribución a esta sensación gustativa en la aceituna Aloreña de Málaga la ofrece la presencia de NaCl mientras que la menor se debe al CaCl_2 . En realidad, debido a su signo negativo, la que indica la expresión anterior es que esta última sal ejerce, de hecho, un efecto que enmascara esta sensación. La representación de la ecuación en gráfica triangular y sus líneas de contorno se da en la Figura 5.98.

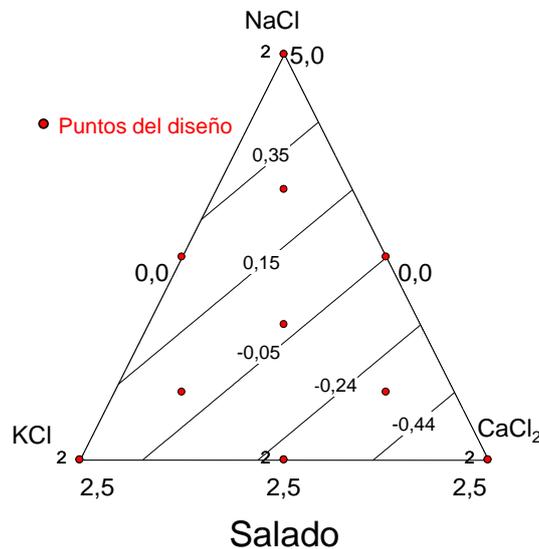


Figura 5.98. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Cambios en los valores del descriptor salado, según concentraciones iniciales de sales.

Como puede observarse en la Figura 5.98, la puntuación de salado desciende claramente a medida que nos movemos del vértice del NaCl hacia el vértice del CaCl_2 . Por otra parte, las líneas de contorno son casi perpendiculares a la base opuesta al vértice KCl, lo que indica que la concentración de esta sal tiene poca influencia en los niveles de salado. De acuerdo con las líneas de contorno, la menor puntuación del sabor salado se encuentra cuando la proporción de Na es 3,75% (2,5% base + 1,25% en el centro del eje NaCl- CaCl_2) y 1,25% CaCl_2 y es, aproximadamente, independiente de la

proporción de KCl. A medida que uno se desliza dentro de la región experimental que se extiende desde la línea que une el vértice KCl y el centro del eje NaCl-CaCl₂ hacia el vértice NaCl, aumenta la puntuación del sabor salado.

En el caso del sabor amargo, el modelo sugerido es también lineal y presenta un ajuste significativo ($p=0,0035$; falta de ajuste, $p=0,9779$). Una vez transformado el mismo para su aplicación en variables físicas, queda en los términos siguientes:

$$\text{Amargo (centrado)} = -0,06*\text{NaCl} - 0,11*\text{KCl} + 0,42*\text{CaCl}_2 \quad (5.67)$$

Como puede apreciarse en la misma, la sal que más aumenta la puntuación del sabor amargo es el CaCl₂. Sin embargo, la presencia de NaCl y KCl tienden a enmascarar esta sensación. La representación gráfica de la grafica triangular y sus líneas de contorno se dan en la Figura 5.99.

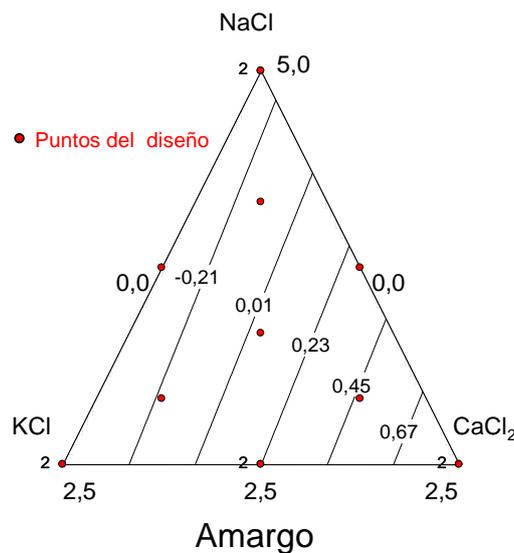


Figura 5.99. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Cambios en los valores del descriptor amargo, según concentraciones iniciales de sales.

Como se desprende de la Figura 5.99, el valor central del sabor amargo (0,00) se obtiene, aproximadamente, en la línea de contorno que está cercana al centro del diseño en el que la proporción de CaCl₂ es en torno a 2/3 de la proporción máxima añadida (2,5%). A medida que la composición de la mezcla se desliza hacia el lado NaCl-KCl (con lo que disminuye la proporción de CaCl₂ simultáneamente) las puntuaciones (centradas para jueces) del sabor amargo disminuyen y alcanzan el mínimo en ausencia

de la sal de calcio. Por el contrario, a medida que las proporciones de CaCl_2 van incrementándose (la mezcla se desplaza del eje NaCl-KCl al vértice CaCl_2) se intensifica la sensación gustativa de amargo. Es decir, en este producto, debe tenerse en cuenta que la presencia de la sal de calcio siempre va a ir incrementando la puntuación del sabor amargo de manera proporcional a la cantidad que se añada de la misma.

La fibrosidad es normal que destaque en el análisis sensorial de la aceituna Aloreña de Málaga puesto que esta preparación no se somete a tratamiento con álcali. El modelo sugerido para relacionar la misma con las proporciones de las diferentes sales en los envasados es cuadrático, incorporando la interacción $\text{KCl}*\text{CaCl}_2$, y significativo ($p=0,0119$; falta de ajuste, $p=0,9762$). La ecuación expresada en variables físicas tiene la siguiente forma:

$$\text{Fibrosidad (centrado)} = -0,033*\text{NaCl} + 0,041*\text{KCl} + 0,031*\text{CaCl}_2 + 0,190*\text{KCl}*\text{CaCl}_2 \quad (5.68)$$

Como puede apreciarse en la misma, el componente más importante para el aumento de la puntuación de esta sensación cinestésica es la interacción $\text{KCl}*\text{CaCl}_2$. De cualquier forma, su estudio detallado se hará, como siempre, mediante las correspondientes gráficas de contorno (Figura 5.100).

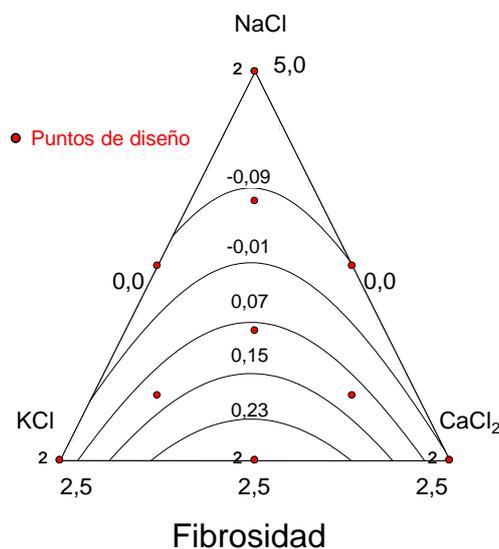


Figura 5.100. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Cambios en los valores del descriptor fibrosidad, según concentraciones iniciales de sales.

Como se observa, el efecto de la interacción se refleja en la curvatura de las líneas de contorno, que indican la existencia de una loma inclinada que se inicia en el vértice Na, en ausencia tanto de KCl como de CaCl₂ y termina en el centro del eje KCl-CaCl₂. Ello implica que la fibrosidad va aumentando a medida que disminuye la concentración de NaCl en la salmuera inicial y aumenta a medida que se incrementan las proporciones de KCl y CaCl₂. La máxima pendiente (elevación) de la fibrosidad se obtiene cuando las proporciones de ambas sales se mantienen equilibradas, descendiendo ligeramente cuando las mezclas se desplazan desde esa posición hacia la izquierda (vértice KCl) o derecha (vértice CaCl₂). Por tanto, en esta preparación la relación entre la fibrosidad y la presencia de estas dos sales se pone de manifiesto de una manera muy clara.

5.3.2.2. Efecto sobre los microorganismos

Durante los casi 50 d de estudio que se monitoriza el envasado de aceitunas Aloreña de Málaga tradicional no se detecta crecimiento de BAL o enterobacterias, sino sólo de levaduras.

El crecimiento de las levaduras a lo largo de los 50 d del estudio se muestra en la Figura 5.101.

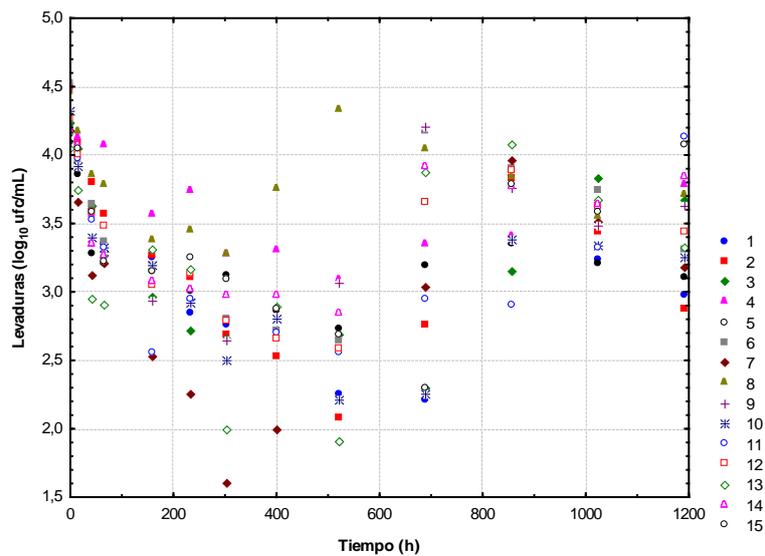


Figura 5.101. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Evolución de las poblaciones de levaduras con el tiempo, según tratamientos.

Como puede apreciarse todos los tratamientos tienen poblaciones iniciales cercanas a 4-4,5 log₁₀ ufc/mL. Posteriormente, sufren una reducción hasta las 500 h alcanzando recuentos entre 2 y 3 log₁₀ ufc/mL, por efecto del conservante. Finalmente las poblaciones remontan progresivamente llegando a unos niveles que oscilan entre 3 y 4 log₁₀ ufc/mL. Sin embargo, ni las poblaciones ni otros parámetros relacionados con el crecimiento/decrecimiento microbiano se han podido relacionar con las concentraciones de sales utilizadas. A pesar de ello, en la Tabla 5.44 se dan algunos de estos parámetros relacionados con el desarrollo de levaduras que se utilizarán en el análisis multivariante.

Tabla 5.44. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Parámetros de crecimiento de las levaduras, según tratamientos.

Tratamiento	Área	Población final (log ₁₀ ufc/mL)	Población mínima (log ₁₀ ufc/mL)
1	3462	2,98	2,20
2	3650	2,87	2,08
3	3628	3,67	2,30
4	4162	3,79	3,09
5	3732	3,10	2,73
6	4062	3,31	2,64
7	3410	3,18	1,90
8	4516	3,71	3,27
9	4049	3,63	2,64
10	3488	3,25	2,26
11	3609	4,13	2,56
12	3953	3,44	2,58
13	3847	3,33	1,90
14	4082	3,85	2,85
15	3821	4,08	2,30

5.3.2.2.1. Análisis multivariante

Utilizando los datos fisicoquímicos y microbiológicos de las salmueras como variables, el análisis jerárquico para la formación de grupos demuestra que los tratamientos replicados son perfectamente reconocidos y agrupados (datos no mostrados). Por otra parte, el ACP extrae cuatro CPs superiores a 1, lo que indica que el número total de variables se puede agrupar en cuatro nuevos factores que explican prácticamente el 82% de la variabilidad. La relación entre los CP y las variables

originales se puede deducir de la proyección de las variables originales en el plano de los dos primeros CPs (Figura 5.102). Las variables relacionadas con el color están agrupadas claramente con el CP1 (sus cosenos o proyecciones sobre CP1 son elevados), pudiendo ser re-nombrado el mismo como "color". Sin embargo, los parámetros de crecimiento microbiano tienen sus proyecciones más importantes (cosenos más altos) en el CP2. Por último, pH, acidez libre y acidez combinada presentan una clara relación con el CP3.

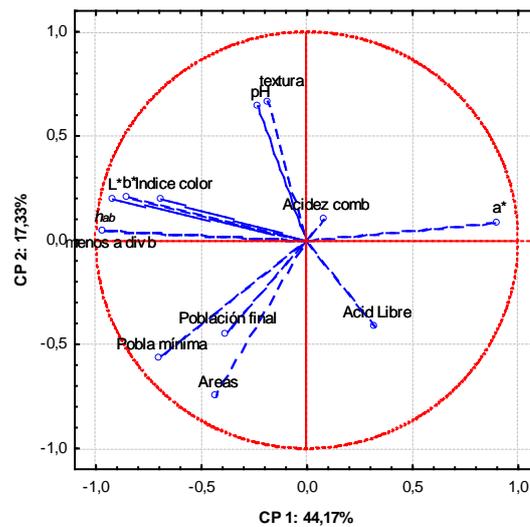


Figura 5.102. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. ACP, proyección de las variables en el plano formado por los dos primeros CPs.

Los diferentes tratamientos pueden ser caracterizados cuando sus resultados se representan en el plano de los dos primeros CPs (Figura 5.103). El tratamiento 1 y su duplicado 2, situados en el primer y segundo cuadrante, se caracterizan por unos parámetros microbiológicos por encima de la media, lo cual no es lo más recomendable en este tipo de preparaciones. Esto implica que envasados con solo NaCl presentan un mayor crecimiento microbiano que aquellos que contienen algún tipo de mezcla. El tratamiento 13 se caracteriza por un color por encima de los demás y unos parámetros microbiológicos ligeramente bajos. Otros tratamientos, como el 4, 8 y 14, se distinguen por unos parámetros microbiológicos y de color por debajo de la media.

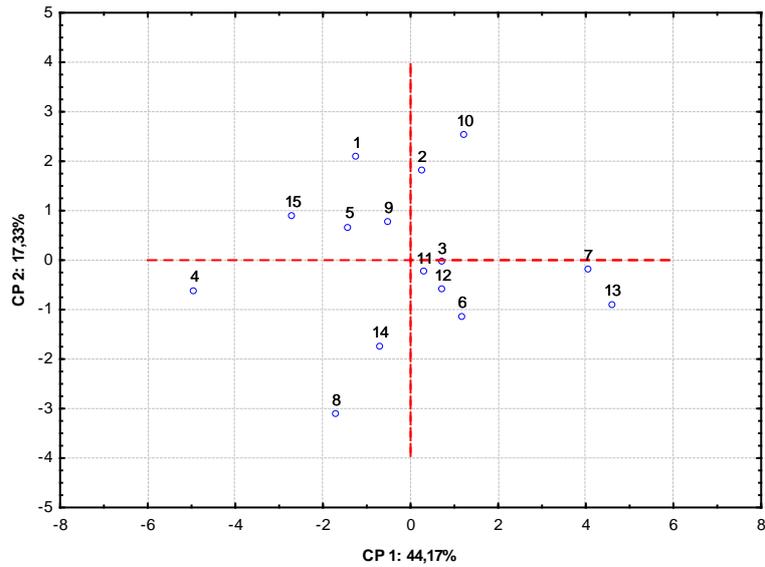


Figura 5.103. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. ACP, proyección de los tratamientos en el plano formado por los dos primeros CPs.

5.3.2.2.2. Caracterización de las poblaciones de levaduras

Al final del envasado hay solo dos especies dominantes, identificadas por métodos moleculares como *S. cerevisiae* y *P. membranifaciens*. En la Tabla 5.45 se muestran las frecuencias de cada una de estas levaduras en los diferentes tratamientos. Por lo tanto, la biodiversidad de las levaduras al final del proceso es bastante limitada y no hay una clara relación entre las especies y la composición inicial de la salmuera. [Arroyo-López \(2007\)](#) describe a *S. cerevisiae* como una de las especies representativas de este tipo de preparaciones.

Tabla 5.45. Envasado de aceituna Aloreña de Málaga tradicional con diferentes sales. Distribución de frecuencias de las dos especies de levaduras presentes en las salmueras, según tratamientos.

Tratamientos	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. membranefaciens</i>
1	80	20
2	100	0
3	5	95
4	50	50
5	40	60
6	20	80
7	100	0
8	50	50
9	10	90
10	50	50
11	60	40
12	0	100
13	5	95
14	10	90
15	30	70

5.4. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE CLORURO DE ZINC EN LOS ENVASADOS

Dado el efector inhibitor que el $ZnCl_2$ ha tenido sobre las poblaciones de microorganismos, se ha procedido al estudio de su evaluación como conservante en el envasado de aceitunas. El producto, además, podría considerarse como fortificado en este elemento mineral, con probado efecto beneficioso para prevenir problemas gastrointestinales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

5.4.1. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$

En esta parte del trabajo se utilizan cuatro concentraciones diferentes de $ZnCl_2$ (0,025%, 0,05%, 0,075% y 0,1%) más un control con sorbato potásico.

5.4.1.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.4.1.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

El pH de todos los tratamientos comienza en torno a 3,3 unidades y durante el estudio se pueden diferenciar 3 fases (Figura 5.104). En la primera, el pH aumenta hasta 3,5 a las 800 h de seguimiento. En la segunda fase, que dura desde las 800 h hasta las 2500 h aproximadamente, se produce una cierta estabilización. Finalmente, y hasta el final del envasado, el pH aumenta hasta valores que oscilan entre 3,7 y 3,8 unidades. Como se puede observar, todos los tratamientos incluido el control muestran una tendencia similar.

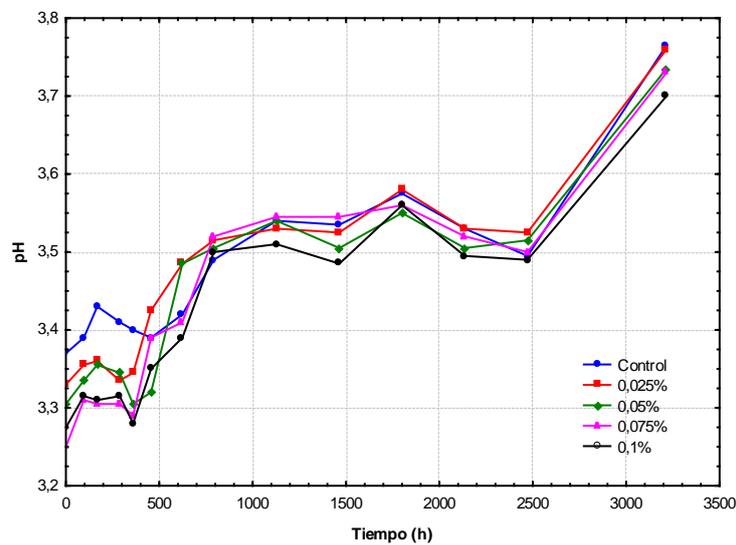


Figura 5.104. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución del pH con el tiempo, según tratamientos

En el caso de la acidez libre, todos los tratamientos parten de unos valores cercanos a 0,53 g de ácido láctico por 100 mL de salmuera (Figura 5.105). Entre el inicio del envasado y las 1800 h, siguen una misma tendencia pero con el tratamiento Control ligeramente con valores superiores. A partir de ese momento, los tratamientos con $ZnCl_2$ y el Control se diferencian aun más, alcanzando diferencias entre ellos de prácticamente 0,10 g de ácido láctico por 100 mL de salmuera.

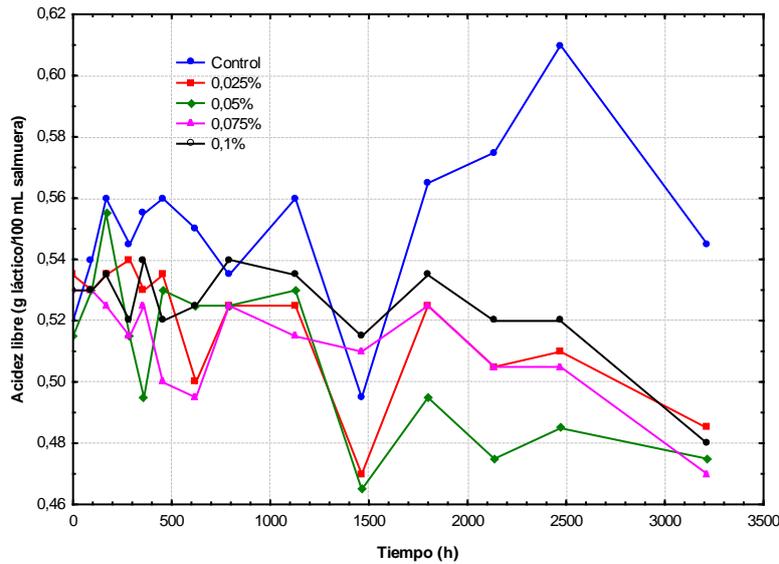


Figura 5.105. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución de la acidez libre con el tiempo, según tratamientos.

Respecto a la acidez combinada (Figura 5.106), ésta muestra un comportamiento similar al observado para la acidez libre. En una primera parte, todos los tratamientos se comportan del mismo modo, con valores cercanos a 0,025 Eq/L. A partir de las 1500 h, la acidez combinada aumenta, pero desciende de nuevo en los últimos muestreos, particularmente en el caso del Control.

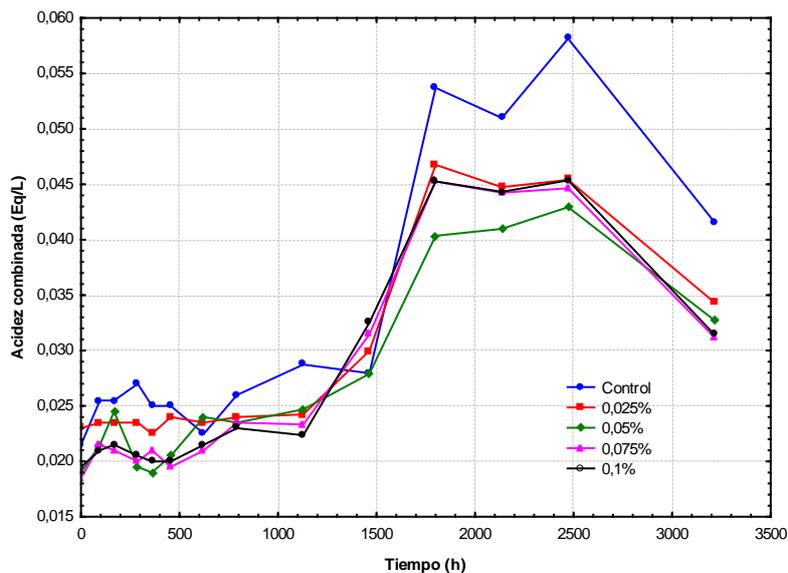


Figura 5.106. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución de la acidez combinada con el tiempo, según tratamientos.

5.4.1.1.2. Color

Todos los parámetros estudiados relacionados con el color muestran un comportamiento similar, no detectando diferencias significativas entre los tratamientos con $ZnCl_2$ y el Control. Para el índice de color (Figura 5.107a), al principio, los valores oscilan alrededor de 30 y disminuyen paulatinamente a lo largo del tiempo hasta alcanzar niveles cercanos a 28. El resto de parámetros, L^* , a^* y b^* (Figura 5.107b, c y d, respectivamente), se mantienen constantes (con ligeras oscilaciones) durante todo el tiempo de estudio. Sin embargo, ninguno de los parámetros ha podido ser estadísticamente relacionado con los diferentes tratamientos utilizados.

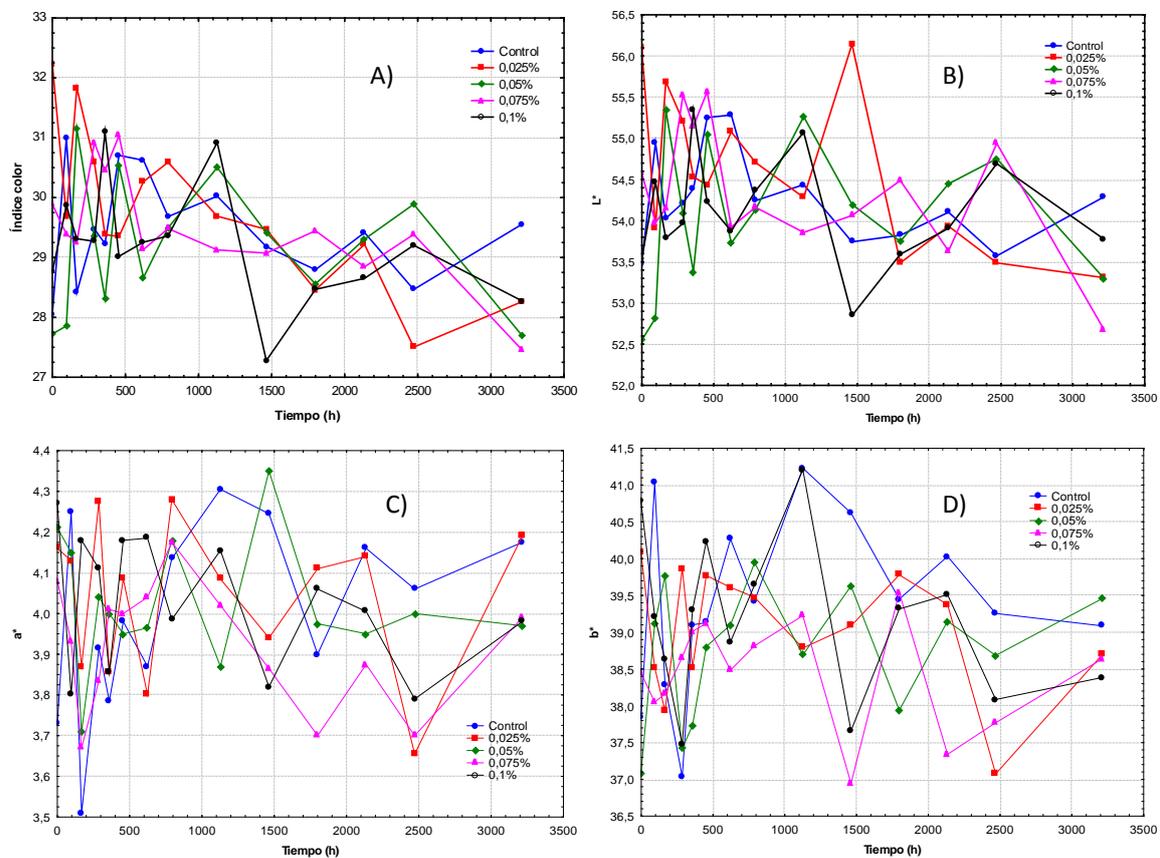


Figura 5.107. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución con el tiempo de los parámetros relacionados con el color: a) índice de color; b) L^* ; c) a^* ; y d) b^* , según tratamientos.

5.4.1.1.3. Contenido de Zn en pulpa

Al término de la experiencia, el contenido de Zn en la pulpa de las aceitunas se recoge en la Tabla 5.46.

Tabla 5.46. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Contenido de Zn en la pulpa al final de la experiencia, según tratamientos.

Tratamiento	Contenido de Zn en pulpa (mg/100g pulpa)	
	Media	Desviación estándar
Control	0,35	0,01
0,025%	5,1	0,1
0,050%	10,7	0,3
0,075%	15,4	0,1
0,100%	24,9*	0,7

Nota: *La cantidad de Zn encontrada en este tratamiento parece excesiva, a juzgar por la secuencia de incrementos seguida en los tratamientos anteriores, pero no se ha podido encontrar la causa de ese posible error.

El contenido de Zn en el producto habitual de esta presentación es muy reducido, 0,35 mg/100g pulpa. Sin embargo, la incorporación de cantidades progresivas de Zn a las salmueras de envasado ha dado lugar a un incremento paulatino del mismo en la pulpa. De esta forma, 100g de pulpa de aceituna envasada con una salmuera al 0,050% podría suministrar la totalidad de la cantidad diaria recomendada para Zn, fijada en estos momentos en 10 mg/día. Aproximadamente, 50 g de las muestras que se prepararon con el 0,075% podrían suministrar igualmente una ingesta interesante en torno al 75% de esas necesidades.

Por todo ello, aunque la adición de Zn al envasado de aceituna Manzanilla al estilo sevillano, ha tenido un efecto inhibitor de levaduras inferior al observado para el envasado tradicional con sorbato, su utilización puede resultar interesante por dar lugar al mismo tiempo a un producto fortificado en Zn.

5.4.1.1.4. Análisis sensorial

Los valores medios que los jueces otorgan a los diversos descriptores sensoriales se dan en la Tabla 5.47.

Tabla 5.47. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con ZnCl₂. Puntuaciones medias de los jueces para cada uno de los descriptores, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Dureza	Fibrosidad	Crujiente
Control	8,4 (3,3)	9,4 (2,4)	4,5 (2,9)	8,6 (3,8)	8,6 (2,9)	8,5 (3,5)
0,025%	6,3 (2,8)	8,0 (2,2)	3,4 (1,9)	9,7 (2,6)	8,6 (3,5)	9,1 (3,5)
0,05%	7,5 (3,6)	8,3 (2,3)	3,9 (2,5)	8,6 (3,1)	7,8 (3,0)	8,2 (3,8)
0,075%	5,6 (2,3)	7,0 (2,3)	3,9 (2,0)	8,5 (3,1)	7,7 (3,6)	8,3 (4,1)
0,10%	6,7 (2,9)	7,4 (2,0)	3,8 (2,2)	9,3 (2,6)	8,6 (3,4)	8,2 (3,8)

Nota: Desviaciones estándares en paréntesis.

Al realizar un ACP a los datos centrados para todos los descriptores usando los panelistas como variables, se detectan dos autovalores mayores que uno, los cuales explican el ~87,93% de la varianza. La relación entre los atributos (Figura 5.108) muestra que el CP1 está relacionado positivamente con el sabor amargo y, con una correlación menor, con ácido y negativamente con la dureza. El CP2 está asociado con salado, fibrosidad y crujiente.

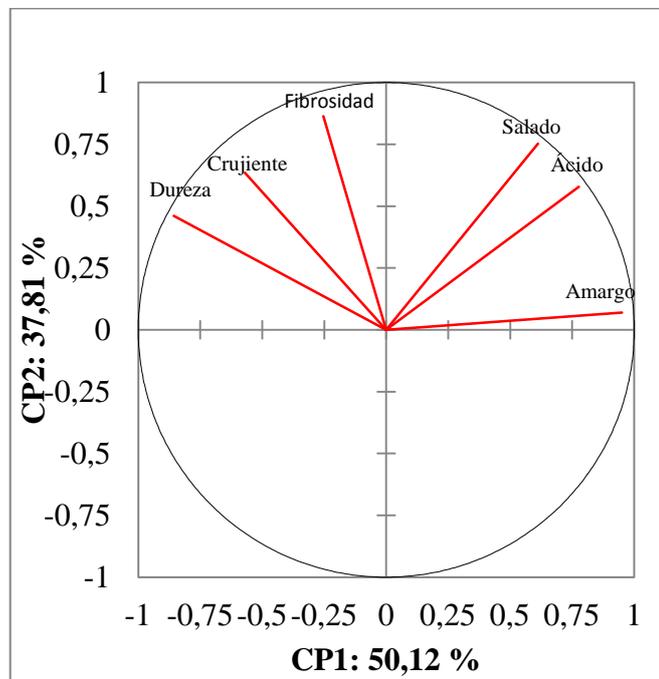


Figura 5.108. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con ZnCl₂. ACP basado en las puntuaciones de los descriptores sensoriales: proyección de los descriptores sensoriales en el plano de los dos primeros CPs.

Cuando se introduce la concentración de Zn en el análisis, la posición de los diferentes descriptores no varía substancialmente y siguen obteniéndose tan solo dos componentes principales con autovalores superiores a la unidad, que explican el 84,13% (Figura 5.109). Por el contrario, la concentración de Zn se sitúa en una posición claramente opuesta a salado y ácido, lo que indica que a medida que se añade Zn disminuyen las puntuaciones para los descriptores salado y ácido. Sin embargo, no está directamente relacionado con las sensaciones cinestésicas (dureza, fibrosidad y crujiente) ni con la de amargo.

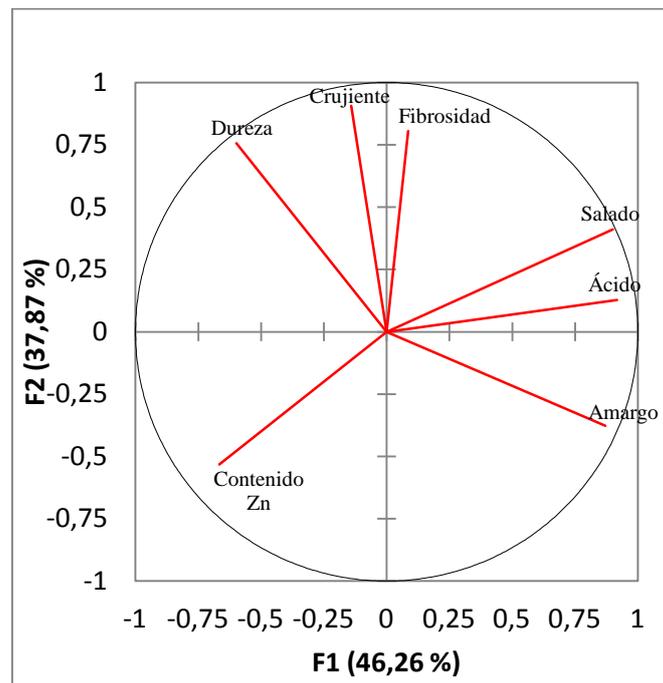


Figura 5.109. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. ACP basado en las puntuaciones de los descriptores sensoriales y contenido en Zn en pulpa: proyección de los descriptores sensoriales en el plano de los dos primeros CPs.

La proyección de los tratamientos en el plano de los dos componentes principales muestra que el análisis de CP puede discriminar claramente los tratamientos (Figura 5.110). El Control se caracteriza por ser un producto con puntuaciones más elevadas de salado, ácido y amargo. De la misma forma, el producto conteniendo 0,025% de $ZnCl_2$ es el que obtiene puntuaciones sensoriales más elevadas en dureza y fibrosidad, principalmente, y, en menor medida, crujiente. Por el contrario, los tratamientos con 0,075% y 0,100% se distinguen por poseer bajas puntuaciones de

todos los descriptores y elevados contenidos en Zn en pulpa. La ventaja de estos últimos es que presentan menos sabor amargo, salado y ácido que el control o el resto de los tratamientos con Zn, aunque también ofrecen menores puntuaciones de las sensaciones cinestésicas. Para algunos mercados menos acostumbrados a las aceitunas de mesa, esa menor intensidad en la percepción de las sensaciones gustativas (salado, ácido amargo) podría ser interesante.

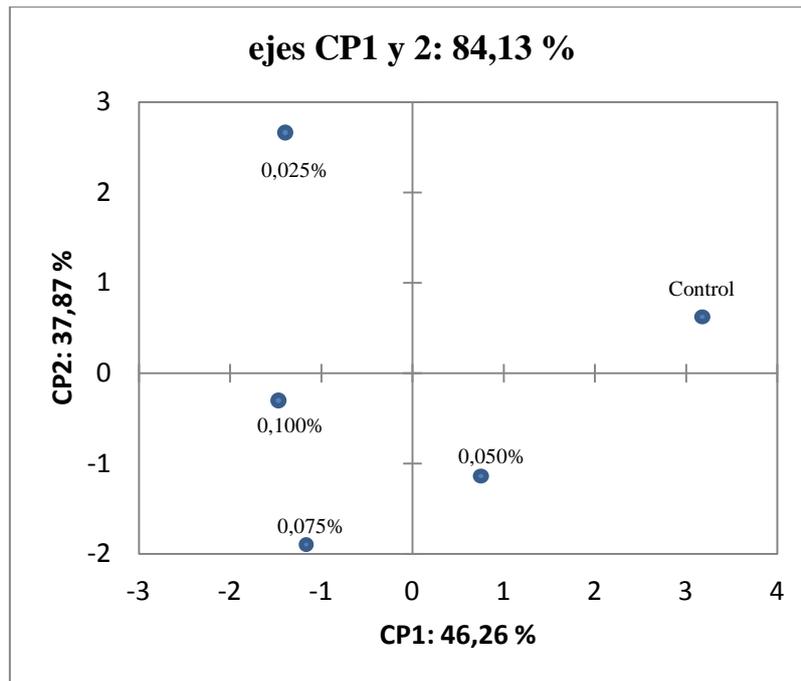


Figura 5.110. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con diferentes concentraciones de $ZnCl_2$. Análisis de CP basado en las puntuaciones de los descriptores sensoriales y concentración de Zn en pulpa: proyección de los casos en el plano de los dos primeros CPs.

Una visión todavía más clara de la relación entre las puntuaciones cinestésicas (incluyendo el contenido en Zn en pulpa) y los correspondientes tratamientos se obtiene cuando se realiza una representación del tipo denominado “biplot”, que incluyen simultáneamente los vectores correspondientes a los descriptores y a los tratamientos (Figura 5.111). Como puede apreciarse no es más que otra manera de proyectar las relaciones de los descriptores y los tratamientos sobre el plano de las dos CPs. Sin embargo al estar ambos aspectos simultáneamente en un mismo gráfico, se facilita la interpretación de las relaciones entre ambos.

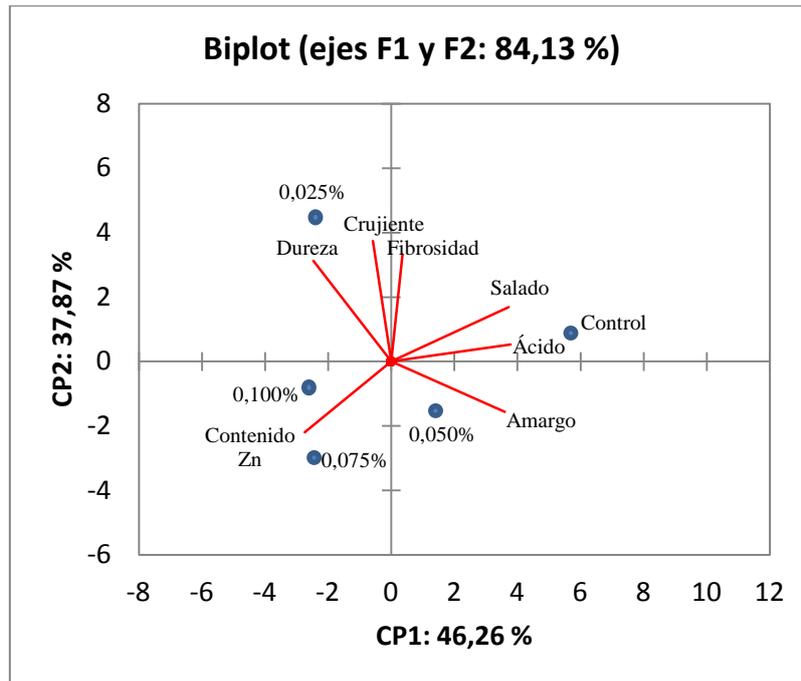


Figura 5.111. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. ACP basado en las puntuaciones de los descriptores sensoriales y concentración de Zn en pulpa: vectores correspondientes a los descriptores sensoriales y proyección de los casos en el plano de los dos primeros CPs (“biplot”).

5.4.1.2. Efecto sobre los microorganismos

De los tres grupos de microorganismos que se están estudiando a lo largo de este trabajo, en esta experiencia solo se obtienen recuentos de BAL y levaduras, mientras que no se detectan enterobacterias.

Los recuentos de BAL son muy similares en todos los tratamientos y el Control. Inicialmente, las poblaciones están alrededor de los $5 \log_{10}$ ufc/mL, y se observa un rápido aumento hasta las 800 h alcanzando $\sim 6,5 \log_{10}$ ufc/mL (Figura 5.112). Posteriormente, empieza una segunda fase caracterizada por un descenso paulatino hasta niveles poblacionales cercanos a los iniciales. Finalmente, se observa de nuevo un aumento de las poblaciones en los tratamientos con $ZnCl_2$ pero no en el caso del Control.

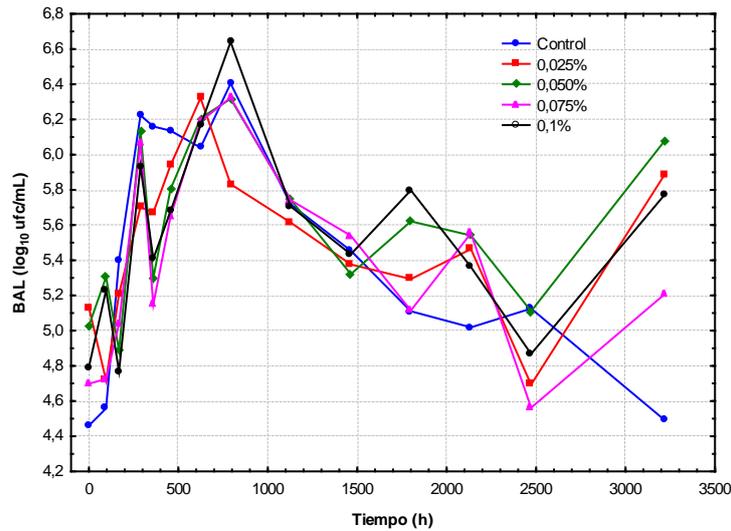


Figura 5.112. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución de las poblaciones de BAL con el tiempo, según tratamientos. Desviaciones estándares $<0,5 \log_{10} \text{ ufc/mL}$.

Se ha estudiado igualmente el área bajo BAL en estos envasados con $ZnCl_2$. Los resultados se dan en la Figura 5.113. Como se desprende de ella, a medida que aumenta la concentración de $ZnCl_2$ se observa una ligera tendencia a que aumente el área, llegando a ser la diferencia significativa para 0,075%. Sin embargo, a partir de este nivel se produce una fuerte inhibición de las BAL. Por tanto, a las proporciones que posiblemente se utilicen en la práctica, el efecto de la adición de las sales de $ZnCl_2$ sobre el crecimiento de las BAL no llegue a ser destacado.

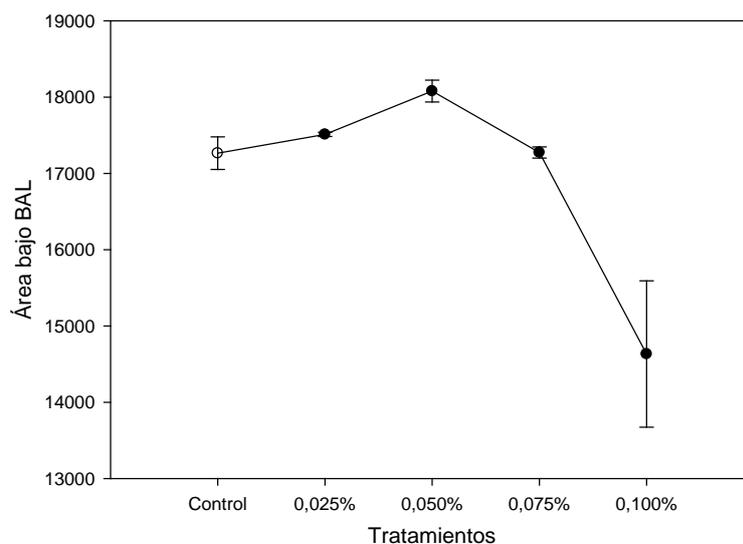


Figura 5.113. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Cambios globales en la población de BAL, estimados por las áreas bajo las curvas de evolución de las respectivas poblaciones, según tratamientos.

En el caso de las levaduras, en los momentos iniciales las poblaciones se sitúan alrededor de $5 \log_{10}$ ufc/mL, para ir disminuyendo paulatinamente hasta unos niveles de $2,5-3,0 \log_{10}$ ufc/mL al final del envasado (Figura 5.114). En todo momento, la evolución del Control ha mostrado valores poblacionales por debajo de todos los tratamientos con $ZnCl_2$, mostrando que la utilización de sorbato potásico ha sido más eficaz para la conservación que el $ZnCl_2$, aunque se haya apreciado una disminución de la presencia de levaduras con el tiempo en todos los tratamientos ensayados.

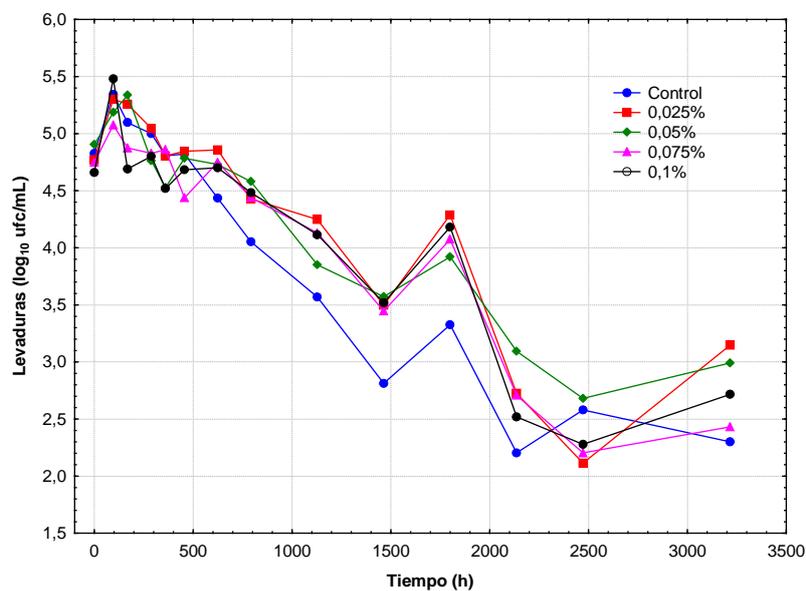


Figura 5.114. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Evolución de las poblaciones de levaduras con el tiempo, según tratamientos.

Al igual que se ha hecho con las BAL, se ha estudiado la evolución global de las levaduras mediante el estudio del área bajo la curva de su población con el tiempo (Figura 5.115). En ella se aprecia claramente que los envasados con sales de Zn han tenido, en general, una mayor población de levaduras, particularmente en los que contienen 0,025% y 0,050% de $ZnCl_2$. El comportamiento observado en este caso se debe a que las sales de Zn se han comportado de una manera menos eficaz que en los medios sintéticos, particularmente para la especie y cepa encontrada en los envasados.

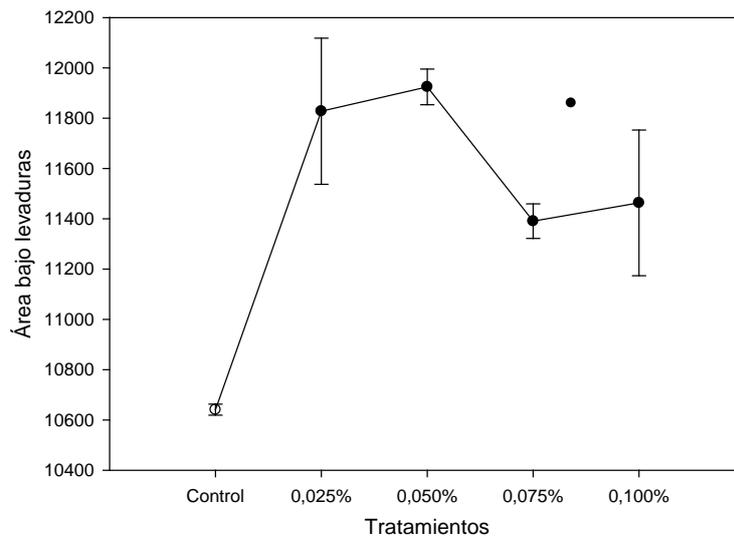


Figura 5.115. Envasado de aceituna Manzanilla estilo sevillano con $ZnCl_2$. Cambios globales en la población de levaduras, estimados por las áreas bajo las curvas de evolución de las respectivas poblaciones, según las concentraciones iniciales de sal.

Al caracterizar las poblaciones microbianas se observa que en el caso de las BAL, los cincuenta aislamientos realizados correspondieron a una única especie, *L. pentosus* (100% frecuencia). Igualmente, en los cincuenta aislamientos de levaduras realizados, solo se identifica una especie (100% frecuencia), *P. galeiformis*. Así, el objetivo debería ser inhibir el crecimiento de *P. galeiformis* en este producto, aunque sería necesario la realización de un número mayor de ensayos para confirmar que esta especie es la única que se encuentra en los envasados de aceituna Manzanilla estilo sevillano en bolsas de plástico en las condiciones experimentales de este trabajo. [Rodríguez-Gómez y col. \(2010\)](#) informan de la identificación de esta especie en aceitunas de las variedades Hojiblanca y Manzanilla.

5.4.2. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$

En esta experiencia de envasado se utilizan tres concentraciones diferentes de $ZnCl_2$ (0,05%, 0,075% y 0,1%) más un Control con sorbato potásico.

5.4.2.1. Efecto sobre los parámetros fisicoquímicos

5.4.2.1.1. pH, acidez libre y acidez combinada

Los cambios en el pH se muestran en la Figura 5.116. No se detecta un efecto del $ZnCl_2$ sobre el pH inicial de las salmueras, que oscila entre 3,81 y 4,00 unidades. A lo largo del tiempo, los cambios son reducidos (solo 0,2 unidades) debido principalmente a la elevada acidez combinada en todos los tratamientos (Figura 5.116). El pH al final del envasado es muy similar variando de 4,00 (tratamiento 0,050% $ZnCl_2$) a 4,06 unidades (Control). De todas maneras, pequeñas diferencias en el valor de pH puede tener importantes influencias en la evolución de algunas características, sobre todo de la textura y el color (Garrido Fernández y col., 1997).

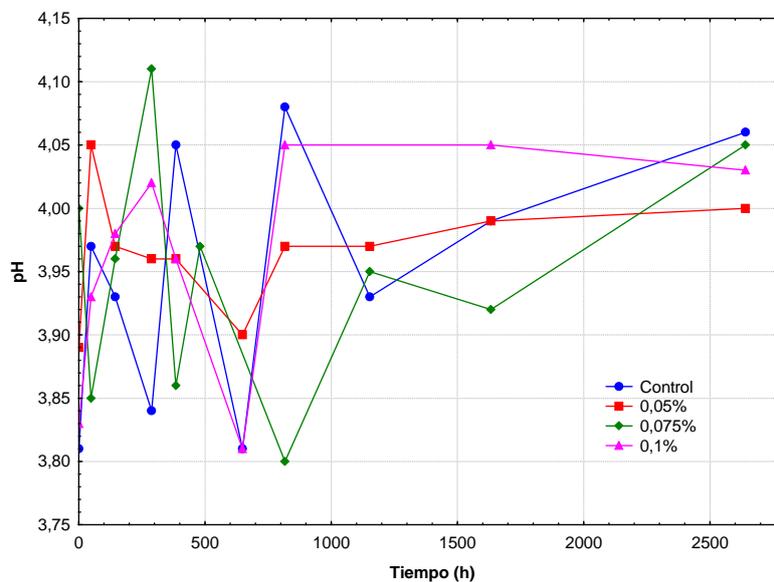


Figura 5.116. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Cambios en el pH en función del tiempo, según tratamientos.

La acidez libre en todos los tratamientos muestra comportamientos muy similares durante las primeras 500 h (Figura 5.117). Desde ese momento, la acidez libre aumenta en los tratamientos con 0,050% y, principalmente, con 0,075%, estando por encima del Control y 0,100% $ZnCl_2$. Este aumento en la acidez libre se debe a la acidez producida por el crecimiento de las BAL en los tratamientos con una proporción de $ZnCl_2$ de 0,050% y 0,075%. Estos cambios son destacables en el tratamiento con 0,075% dado que la acidez libre al final del envasado es de 10 g/L aproximadamente,

similar a los niveles que se suelen alcanzar al final de las fermentaciones de aceitunas verdes estilo sevillano (Garrido-Fernández y col., 1997). Este aumento no debe considerarse como un inconveniente porque la producción de esta acidez adicional representa una contribución extra a la seguridad del producto.

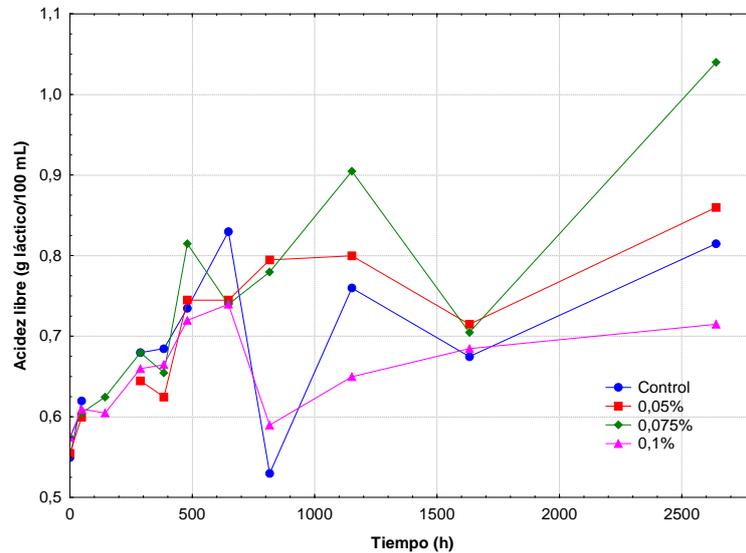


Figura 5.117. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Cambios en la acidez libre (g láctico/100 mL salmuera) en función del tiempo, según tratamientos.

En este tipo de presentaciones no existe tratamiento con “lejía” (cocido) por lo que la acidez combinada se debe solo a la presencia de sales orgánicas de los frutos o a los ácidos producidos durante la fermentación (láctico o málico). Inicialmente, la acidez combinada oscila entre 0,045 (Control) hasta 0,052 Eq/L (0,075% y 0,100%) (Figura 5.118). Al final de la fermentación, los valores varían desde 0,060 Eq/L (Control y 0,100%) hasta 0,066 Eq/L (0,050%). Los cambios, en general, son muy similares debido a que el ácido podría haber sido producido durante el tiempo que las BAL están presentes, aunque en algunos de ellos (Control y 0,100% $ZnCl_2$), no están presentes al final del proceso. Por lo tanto, el uso de $ZnCl_2$ como conservante en envasados de aceituna fresca Aloreña de Málaga no modifica sustancialmente los valores de acidez combinada.

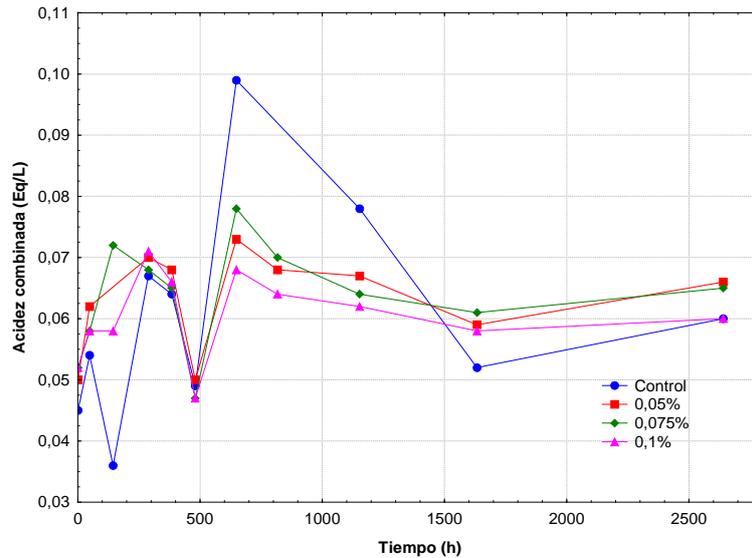


Figura 5.118. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Cambios en la acidez combinada (Eq/L) en función del tiempo, según tratamientos

5.4.2.1.2. Cambios en el contenido de azúcares y ácidos en salmuera

Al usar frutos frescos con solo 3 d de fermentación, es de esperar una gran presencia de azúcares en las salmueras. Todos los azúcares sufren un aumento de su concentración en salmuera después de envasar, dado que sus concentraciones en las aceitunas son aún elevadas a pesar de los 3 d de espera a que se someten habitualmente antes de procesarlos. A continuación, los azúcares en salmuera experimentan un rápido descenso durante las primeras 500 h. Las concentraciones medias frente al tiempo indican que el sustrato más abundante es la glucosa, que alcanza 10 g/L (Figura 5.119b), seguido por fructosa (~2,5 g/L) (Figura 5.119c), manitol (~1,1 g/L) (Figura 5.119d), y sacarosa (0,7 g/L) (Figura 5.119a). El único azúcar que se agota completamente al final del envasado es la sacarosa. En el caso del manitol, la concentración final que se detecta para el tratamiento con 0,100% de $ZnCl_2$, puede deberse a la inhibición de las BAL capaces de metabolizar este azúcar (Rute y col., 2002). Las tendencias de los consumos de sacarosa, glucosa y fructosa son similares, pero para el manitol es más progresivo. En todos los casos, las curvas del Control están por debajo de las obtenidas para los diferentes tratamientos con $ZnCl_2$, con solo ligeras diferencias entre ellos. El encontrar los niveles más bajos de azúcares totales en la salmuera del Control implica una mayor actividad microbiana en este tratamiento con respecto al resto de los ensayos con $ZnCl_2$,

con sólo pequeñas diferencias para las distintas concentraciones. Una tendencia similar en los azúcares se puede esperar de aceitunas envasadas a escala industrial ya que los recipientes utilizados son los mismos.

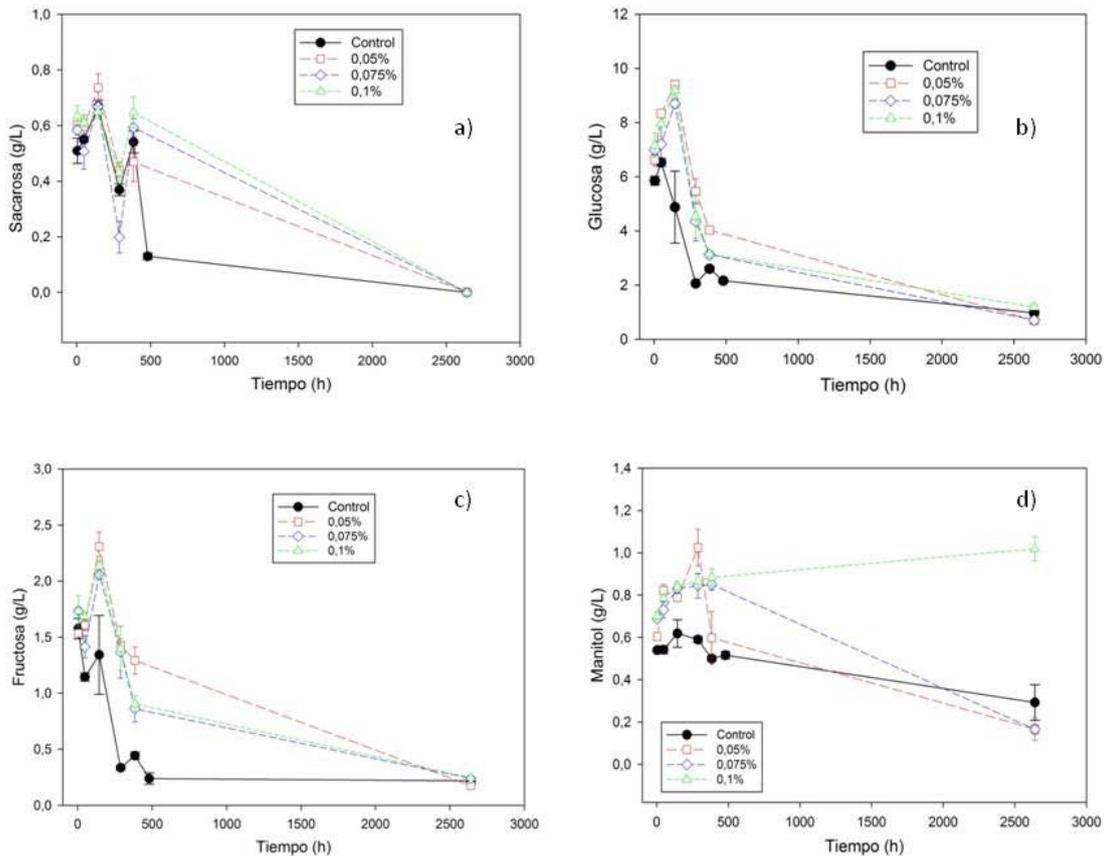


Figura 5.119. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl₂. Evolución de los diferentes azúcares en función del tiempo, según tratamientos, a) sacarosa; b) glucosa; c) fructosa; y d) manitol.

Para obtener una descripción general, se estudian las áreas bajo la curva de los azúcares totales frente al tiempo. El área del Control (~1950) es siempre significativamente menor que las obtenidas para los tratamientos con ZnCl₂. Dentro de estos, el área más baja corresponde al tratamiento 0,075% (~3500), debido al gran crecimiento de las BAL, seguido por el área de 0,100% (~3600), como se comentará más adelante. Aparentemente, el Control, con sorbato potásico, parece menos efectivo a la hora de disminuir la actividad microbiana, y consecuentemente el consumo de azúcares, que cualquiera de los tratamientos con ZnCl₂. En particular, la presencia de

0,050% ZnCl_2 (~3900) es capaz de reducir marcadamente la actividad microbiana (mayor área bajo curvas de azúcares) en aceituna fresca Aloreña de Málaga”, en comparación con el efecto del sorbato potásico.

Como se puede ver en la Tabla 5.48, el ácido acético aparece en niveles bajos al principio del estudio y oscila entre 0,17 g/L (0,075% ZnCl_2) y 0,22 g/L (0,050% ZnCl_2). Al final del envasado, sin embargo, su concentración aumenta variando entre 0,43 g/L (Control) y 1,46 g/L (0,075% ZnCl_2).

Como se ha indicado en la sección de materiales y métodos, en las salmueras se añade intencionadamente ácido láctico. Por lo tanto, su concentración inicial en las salmueras se mueve en un intervalo estrecho (Tabla 5.48), oscilando entre 1,10 g/L (0,075% ZnCl_2) y 1,41 g/L (Control). Los niveles de este ácido durante el proceso, particularmente en los tratamientos con una gran actividad por parte de las BAL, alcanzan 4,0 y 8,97 g/L en los tratamientos con 0,050% y 0,075% de ZnCl_2 , respectivamente. La producción de ácido láctico es muy evidente en el tratamiento con 0,075% ZnCl_2 , en el que el nivel de acidez obtenido puede ser comparable al que se alcanza en algunas fermentaciones de aceitunas verdes estilo español (Garrido-Fernández y col., 1997). El aumento del ácido láctico (que tiene un efecto relativamente limitado en el pH como se ha descrito anteriormente) no puede ser considerado negativo porque su producción refuerza el contenido en acidez y desciende la probabilidad de riesgos de alteraciones (Garrido-Fernández y col., 1997), aunque puede llegar a afectar a la textura.

En las salmueras iniciales de envasado también hay ácido cítrico, con lo que las concentraciones son bastante similares entre los tratamientos (Tabla 5.48) oscilando entre 3,33 g/L en el Control y 3,56 g/L en presencia de 0,050% de ZnCl_2 . Sin embargo, al final del proceso, su contenido es significativamente mayor. Por lo tanto, existe una solubilización desde la pulpa de la aceituna o una producción de ácido cítrico, lo que parece más probable porque dicho aumento es mayor en el Control y en los tratamientos con 0,050% y 0,075% de ZnCl_2 pero, por el contrario, menor con el 0,100% de ZnCl_2 . En cualquier caso, el diseño experimental no permite determinar el origen de este aumento.

El ácido ascórbico también se utiliza en las salmueras iniciales de este tipo de envasados como antioxidante. Al inicio, solo se detecta en las salmueras a bajas concentraciones, lo que implica que el efecto de este ácido está limitado a un corto periodo de tiempo. Estos resultados cuestionan la utilidad del ácido ascórbico como antioxidante en estas presentaciones comerciales (y posiblemente en cualquier otro producto de aceitunas de mesa) y coinciden con los resultados obtenidos previamente al comparar la efectividad del ácido ascórbico y el metabisulfito sódico en aceitunas de mesa colocadas directamente en salmuera (Arroyo-López y col., 2008a), en las que el ácido ascórbico muestra una actividad antioxidante mayor durante el primer periodo del envasado pero el metabisulfito sódico es más eficiente a largo plazo. Los antioxidantes se usan también para mitigar los marcas oscuras (“molestado”) después de la recolección de las aceitunas verdes, en cuyo caso los comportamientos son similares: el metabisulfito previene la formación del “molestado” más eficientemente que el ácido ascórbico y extiende su efecto incluso después de la fermentación (Segovia-Bravo y col., 2010).

Tabla 5.48. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Cambios en las concentraciones de ácidos orgánicos (g/L), según tratamientos.

Tratamiento	Ácido acético		Ácido láctico		Ácido cítrico		Ácido ascórbico
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial
Control	0,17 (0,02)	0,43 (0,28)	1,41 (0,04)	2,22 (0,64)	3,33 (0,24)	5,24 (0,11)	0,48 (0,53)
0,050%	0,22 (0,01)	1,46 (0,84)	1,15 (0,05)	4,00 (1,20)	3,56 (0,01)	5,30 (0,08)	0,01 (0,01)
0,075%	0,22 (0,01)	1,46 (1,70)	1,10 (0,01)	8,97 (3,39)	3,37 (0,26)	5,13 (0,01)	0,01 (0,01)
0,100%	0,17 (0,02)	0,56 (0,11)	1,31 (0,10)	1,26 (0,10)	3,38 (0,18)	4,62 (0,11)	0,05 (0,02)

Nota:* El ácido ascórbico se detecta esporádicamente al principio del envasado pero nunca al final. Desviaciones estándares entre paréntesis.

5.4.2.1.3. Color

En cuanto al índice de color se detectan diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5.120). Los valores más elevados, que aumentan con el tiempo, son

los obtenidos para el Control seguido de los del 0,075% de $ZnCl_2$ mientras que los tratamientos con 0,050% y 0,100% $ZnCl_2$ tienen los valores bajos e intermedios, respectivamente. En las aceitunas frescas, los valores altos de índice de color se asocian con las aceitunas más amarillentas. Entonces, de acuerdo con este parámetro, los frutos del Control y el tratamiento 0,075% $ZnCl_2$ tienen una tendencia progresiva a aproximarse a la apariencia de las aceitunas verdes estilo español fermentadas, que puede considerarse aceptable, mientras que los de 0,050% y 0,100% $ZnCl_2$, siguen una evolución opuesta y divergen con el tiempo. Es decir, los tratamientos con 0,050% y 0,100% $ZnCl_2$ tienden a un color marrón (desfavorable) con el tiempo. Puesto que los cambios en el índice de color no pueden ser relacionados claramente con los niveles de $ZnCl_2$, otros factores, tales como una posible oxidación de los fenoles podrían influir también en los cambios de este parámetro (Garrido Fernández y col., 1997).

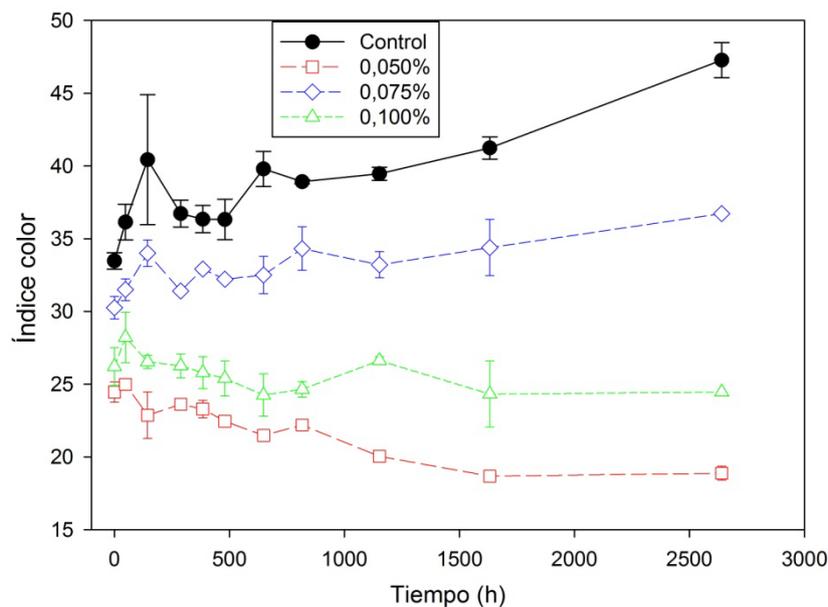


Figura 5.120. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Evolución del índice de color en función del tiempo, según tratamientos.

Con respecto a L^* (Figura 5.121), los cambios son muy similares a los observados para b^* . Al final de la vida de mercado, las aceitunas en todos los tratamientos tienen valores similares de L^* , a excepción del tratamiento con 0,075% $ZnCl_2$ con valores menores de este parámetro.

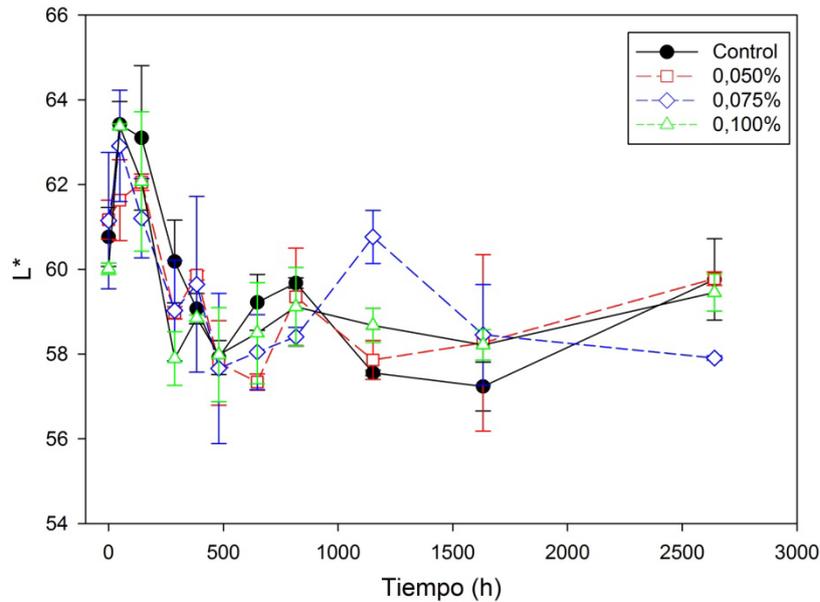


Figura 5.121. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl_2 . Evolución del parámetro L^* en función del tiempo, según tratamientos.

Hay un cambio progresivo en a^* desde valores negativos (color verde) hacia positivos (rojo) (Figura 5.122). Los cambios se ajustan a una cinética de formación de primer orden (Tabla 5.49). No hay diferencias significativas ni en la constante (P_0) ni en los cambios totales en a^* ; sin embargo, el tratamiento con 0,075% ZnCl_2 tiene la tasa más alta ($0,0031 \text{ h}^{-1}$) y toma el menor tiempo (223 h) para alcanzar la mitad del incremento máximo. Los cambios más rápidos en el tratamiento con esta concentración específica de ZnCl_2 pueden estar asociados con el efecto estimulante del Zn en la producción de ácido láctico y la consecuente mayor acidez libre y un pH más bajo, como ya se ha comentado anteriormente. Los cambios más lentos se observan en el Control. En general, la presencia de ZnCl_2 acelera un cambio en a^* , particularmente en el ensayo con 0,075% ZnCl_2 ; sin embargo, en 0,100% ZnCl_2 , se observa una disminución en la tasa de cambio (que se acerca a la del Control).

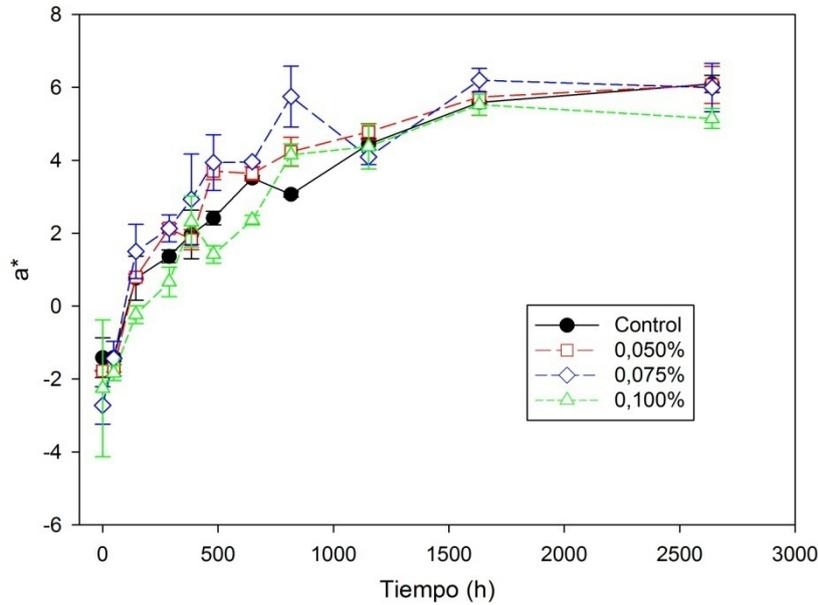


Figura 5.122. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Evolución del parámetro a^* en función del tiempo, según tratamientos.

Tabla 5.49. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Cambios, según tratamientos, en el parámetro de color a^* . Coeficientes deducidos tras el ajuste de los datos a una cinética de primer orden.

Coeficientes	Tratamientos			
	Control	0,050%	0,075%	0,100%
P_0	-1,3 (0,2)	-1,8 (0,3)	-2,4 (0,5)	-2,3 (0,4)
a	7,4 (0,4)	7,7 (0,3)	8,0 (0,6)	7,8 (0,6)
b (h^{-1})	0,0014 (0,0002)	0,0021 (0,0003)	0,0031 (0,0006)	0,0017 (0,0003)
t_{50} (h)	495	330	223	407

Nota: El ajuste es significativo para $p < 0,05$, con un error de ajuste no significativo. Los parámetros son significativo para $p < 0,05$. Desviaciones estándares entre paréntesis.

Los valores de b^* , cuyos cambios son muy similares a los observados para L^* , tienen un aumento inicial que puede ser asociado a un cambio hacia tonos amarillentos, seguido por un marcado descenso y un nuevo aumento al final del estudio (Figura 5.123). Las diferencias en este parámetro CIE entre los tratamientos son escasas, aunque al final del período, el Control muestra el valor más alto (color amarillento). Los cambios en este parámetro no se han podido ajustar a ningún modelo cinético.

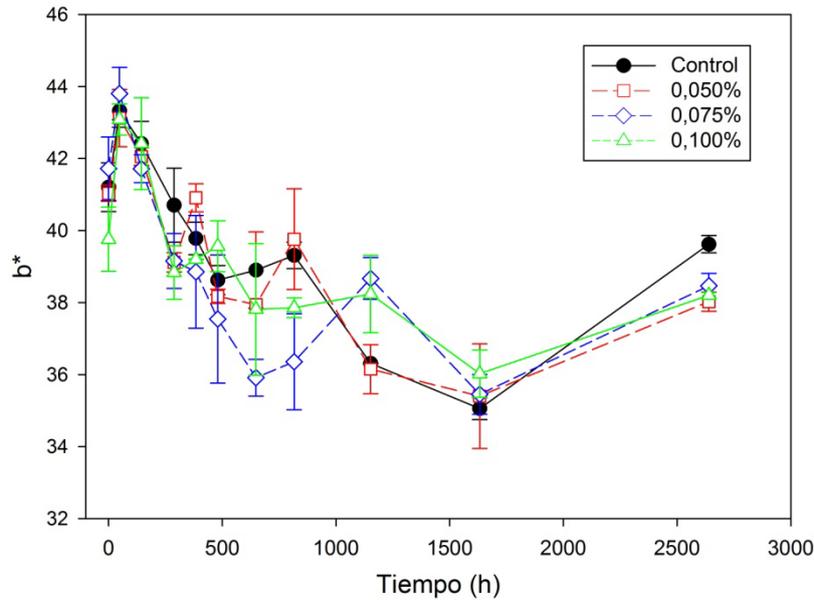


Figura 5.123. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl_2 . Evolución del parámetro b^* en función del tiempo, según tratamientos.

5.4.2.1.4. Textura instrumental

En lo que respecta a la textura, en la mayoría de los muestreos llevados a cabo, los datos del Control (Figura 5.124) están por debajo de los tratamientos que contienen diferentes concentraciones de ZnCl_2 . Es difícil evaluar las diferencias estadísticas basadas en estos datos, por lo que el estudio de los efectos se ha realizado calculando el área bajo las curvas correspondientes en función del tiempo (Figura 5.125). El área del Control es la más baja (significativa a $p < 0,05$) con respecto a los tratamientos con ZnCl_2 . Dentro de los tratamientos con ZnCl_2 , el área más alta corresponde a los que contienen 0,050% y 0,100% de ZnCl_2 , y la más baja se observa para 0,075% ZnCl_2 (Figura 5.125). Esta diferencia podría haber sido debido a la alta producción adicional de ácido láctico en el tratamiento con 0,075% de ZnCl_2 , debido a un aparente efecto estimulante de Zn sobre el crecimiento de las BAL, sin embargo, esta formación es relativamente baja en el Control, 0,050% y 0,100% ZnCl_2 . De hecho, el tratamiento con 0,075% ZnCl_2 tiene el pH más bajo, 3,75, y la mayor acidez, 1,05 g ácido láctico/100mL salmuera, mientras que en el resto de los tratamientos estos parámetros varían desde 4,01 hasta 4,15 y 0,72 a 0,87 g ácido láctico/100mL salmuera, respectivamente. Un medio más ácido podría haber causado una mayor degradación de

la textura de las aceitunas, como lo demuestra [Brenes y col. \(1994\)](#) en aceitunas verdes estilo español. En cualquier caso, siempre hay un aumento significativo de la textura con respecto al producto tradicional en los tratamientos que incorporan $ZnCl_2$ (Figura 5.125).

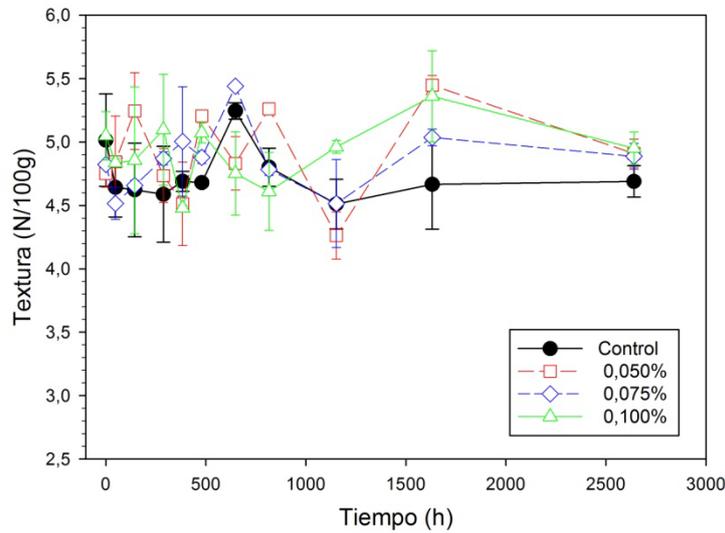


Figura 5.124. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Evolución de la textura instrumental en función del tiempo, según tratamientos.

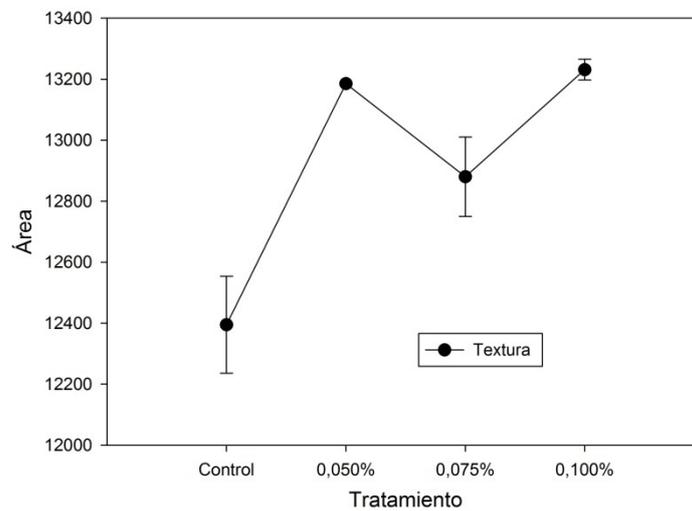


Figura 5.125. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Áreas bajo las curvas de textura instrumental, según tratamientos.

5.4.2.1.5. Contenido de Zn en pulpa

La incorporación de $ZnCl_2$ en las salmueras de envasado conduce a un claro aumento en el contenido de Zn en la pulpa de la aceituna fresca Aloreña de Málaga. La absorción de este mineral por la pulpa es bastante rápida al tratarse de frutos partidos, ya que a las 48 h se ha obtenido la máxima concentración (Tabla 5.50).

Tabla 5.50. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Concentración media de Zn (mg/100g de pulpa de aceituna) a las 48h y 2640h de la elaboración, según tratamientos.

Tratamientos	Pulpa	
	48 h	2640 h
Control	0,26 (0,02)	0,22 (0,01)
0,050%	9,7 (0,3)	10,5 (0,6)
0,075%	15,0 (0,7)	15,8 (0,4)
0,100%	20,0 (0,5)	19,6 (0,5)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

El contenido en Zn del Control puede ser considerado como el nivel usual en la aceituna fresca Aloreña de Málaga (partida y aliñada), y es bastante bajo: 0,22-0,26 mg/100g pulpa (Tabla 5.50). La Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para el Zn es actualmente de 10 mg/d ([Directiva \(CE\) nº 1925/2006](#)), por lo que la contribución de 100 g de este producto a la ingesta de Zn de los consumidores oscilaría entre el 2,22% y 2,60% de la IDR. Sin embargo, 100 g de pulpa de los tratamientos 0,050% y 0,075% $ZnCl_2$ (Tabla 5.50) aportaría de media el ~101% y ~154,03% de la IDR, respectivamente.

El Zn se acumula parcialmente en la pulpa (Tabla 5.50) como aparentemente ocurre con el Ca ([Garrido Fernández y col., 1997](#)). Sin embargo, el papel que juega el Zn en los tejidos de los frutos puede ser diferente del asignado al Ca. Se ha comprobado que el Ca incrementa la textura y reduce el ablandamiento de pepinillos ([McFeeters y Fleming, 1989](#); [Walter y col., 1996](#)). Sin embargo, ni el Zn ni el Mg son efectivos para inhibir dicho ablandamiento ([McFeeters y Fleming, 1989](#)). [Jiménez y col. \(1997\)](#) consideran que, en aceitunas de mesa, el Ca desplaza al Na de la estructura de las paredes celulares. Para estos autores la estabilización de dichas paredes puede lograrse

mediante varios mecanismos que coexisten: el primero, debido a la formación de complejos de coordinación (solo para el Ca); y el segundo, por uniones electroestáticas (Ca y Na). Al parecer, el efecto del Zn puede incluirse en este segundo caso.

5.4.2.1.6. Análisis sensorial

Una vez comprobado que el panel da valores consistentes, se procede al análisis de los datos correspondientes. No se detectan fermentaciones anormales en ninguno de los tratamientos con ZnCl₂. Por lo tanto, de acuerdo a la metodología de análisis sensorial descrita por IOOC (2010), todos los tratamientos pueden ser considerados productos comerciables. Los datos obtenidos del análisis sensorial se han usado para estudiar la relación entre los diferentes descriptores y los tratamientos.

En la Tabla 5.51 se muestran los datos medios de los diferentes descriptores para cada tratamiento. Para el estudio estadístico de los mismos, se ha procedido previamente a centrarlos por jueces. Las correlaciones entre las variables (incluyendo el contenido final en Zn) indican que hay una relación directa significativa ($p < 0,05$) entre el sabor salado y la fibrosidad ($r = 0,980$), significando que una elevada fibrosidad conduce a elevadas puntuaciones en el sabor salado. Por el contrario, la conexión entre el sabor amargo y el contenido en Zn es negativa. Esta observación es de interés porque muchos consumidores, excepto los de los países productores de aceitunas, pueden formular objeciones a la presencia habitual de un cierto sabor amargo residual en aceitunas de mesa hechas en casa, naturales o ecológicas. Entonces, el nuevo producto fortificado con Zn tendría, posiblemente, una buena aceptación. La importancia de las correlaciones sugiere la idoneidad de aplicar un análisis multivariante a los datos.

Tabla 5.51. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl₂. Valores medios de los diferentes descriptores sensoriales, según tratamientos.

Tratamiento	Ácido	Salado	Amargo	Textura	Fibrosidad	Crujiente
Control	4,8 (2,1)	5,4 (1,6)	6,1 (1,9)	7,0 (1,3)	7,0 (1,7)	7,2 (1,7)
0,05%	4,9 (2,3)	4,9 (1,8)	5,5 (1,9)	6,8 (1,3)	6,8 (2,1)	7,1 (2,0)
0,075%	5,3 (2,0)	5,2 (1,6)	5,4 (2,0)	6,9 (1,4)	9,8 (1,9)	7,1 (1,9)
0,10%	4,8 (2,2)	4,8 (1,9)	4,8 (2,1)	6,9 (1,9)	6,8 (2,4)	7,0 (2,0)

Nota: Desviaciones estándares entre paréntesis.

5.4.2.1.7. Análisis multivariante

Una primera aproximación se realiza mediante un análisis de agrupamiento o “clusters”. Cuando la agrupación se hace de acuerdo a los atributos (Figura 5.126a), hay una clara asociación entre las sensaciones cinestésicas (dureza, fibrosidad y crujiente) y algunas de las sensaciones gustativas (ácido y salado), pero la sensación de amargo queda claramente separada.

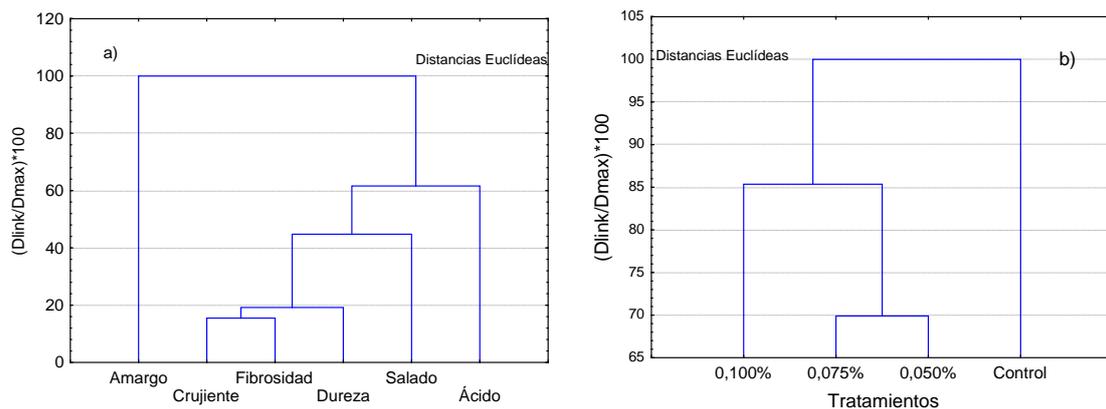


Figura 5.126. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Análisis de agrupamiento para a) descriptores, y b) tratamientos, usando las puntuaciones centradas de los descriptores sensoriales como variables.

El análisis de agrupamiento basado en los descriptores sensoriales, pero agrupados de acuerdo a los tratamientos, es coherente y de acuerdo con las proporciones de $ZnCl_2$ añadidas a las salmueras de envasado (Figura 5.126b), a pesar de que el contenido de Zn no está incluido como variable en el análisis. Las diferencias entre el Control y el resto de los tratamientos con $ZnCl_2$ son bastante claras. Por otra parte, los tratamientos con 0,050% $ZnCl_2$ quedan agrupados a una distancia bastante baja mientras el tratamiento que contienen 0,100% de $ZnCl_2$ se asigna a un grupo diferente, aunque no muy separado del anterior. Por lo tanto, las nuevas presentaciones conteniendo $ZnCl_2$ tienen características sensoriales diferentes al Control, teniendo cierta similitud para concentraciones de 0,050% y 0,075% $ZnCl_2$, mientras que la proporción de 0,100% da lugar a un producto ligeramente diferente de los anteriores y, asimismo, del control.

Al aplicar un ACP a las puntuaciones medias centradas de los atributos (excluyendo el contenido en Zn), considerando los tratamientos como casos, existen solo dos factores que explican el 72,1% y 18,4% del total de la varianza, respectivamente (Figura 5.127). La relación entre los atributos (Figura 5.127) muestra que el CP1 está relacionado negativamente con los sabores amargo y salado y las sensaciones cinestésicas (dureza, fibrosidad y crujiente), con una buena correlación entre ambos grupos (cercanía de los respectivos vectores) (Figura 5.127). Este CP1 podría ser renombrado como “propiedades relacionadas con la textura”, puesto que los frutos con mayor consistencia son también menos maduros y tienen un sabor más amargo. El CP2 está asociado negativamente con la acidez (Figura 5.127), indicando que el CP2 podría relacionarse a la “presencia de fermentación o actividad de bacterias del ácido láctico durante la vida de mercado”. Al introducir la concentración de Zn en la pulpa (Figura 5.127), la presencia de Zn se relaciona de manera opuesta con las propiedades cinestésicas (dureza, fibrosidad y crujiente) y las sensaciones de salado y amargo y algo más positivamente con la sensación de ácido, posiblemente por el efecto estimulante de dicha sal en la producción de acidez (Figura 5.127).

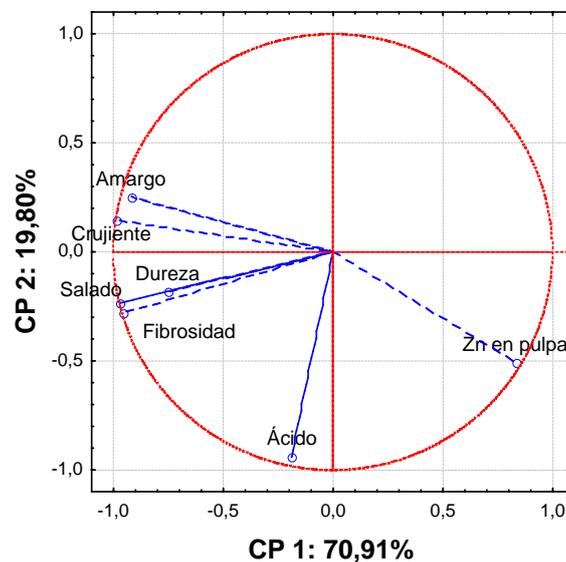


Figura 5.127. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. ACP: proyección de descriptores sensoriales y contenido de Zn en pulpa, en el plano formado por los dos primeros CPs.

La proyección de los tratamientos en el plano de los dos primeros CPs (obtenida sin la variable Zn) muestra que el ACP puede discriminar claramente los tratamientos (Figura 5.128). Además, la proyección relaciona los tratamientos con los atributos. El tratamiento con 0,075% ZnCl_2 está fuertemente asociado con el sabor ácido y valores medios para el resto de los descriptores. El Control, situado en el cuarto cuadrante, se caracteriza por valores bastante superiores a la media para los sabores salado y amargo, así como de las sensaciones cinestésicas (dureza, fibrosidad y crujiente) y baja acidez y contenido en Zn. Los tratamientos con 0,050% y 0,075% de ZnCl_2 están fuertemente asociados entre sí, tal como se veía ya también en el análisis de formación de grupos, y destacan por sus valores bajo en las puntuaciones cinestésicas y de sabores amargo y salado.

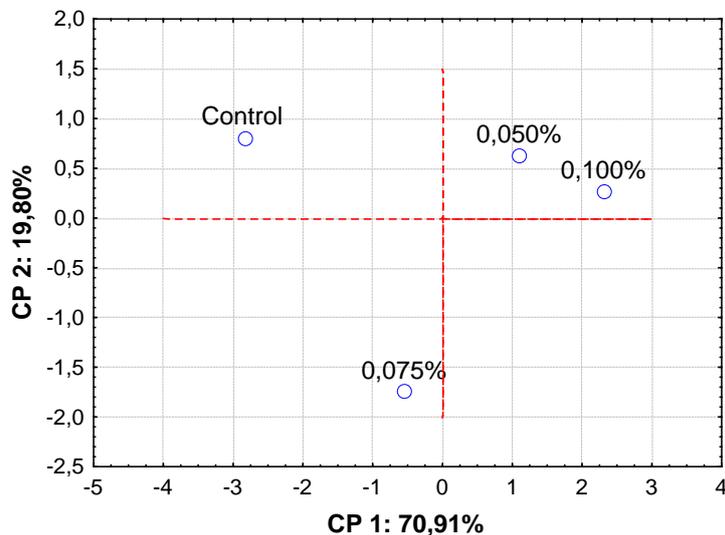


Figura 5.128. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl_2 . ACP basado en las puntuaciones de los descriptores sensoriales. Proyección de los casos en el plano formado por los dos primeros factores, según tratamientos.

5.4.2.2. Efecto sobre los microorganismos

Las poblaciones de enterobacterias se detectan solo al principio del envasado y descienden rápidamente en todos los tratamientos (Figura 5.129a). Solo se encuentran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos durante las primeras 48 h y ya no se detectan enterobacterias después de las 1152 h.

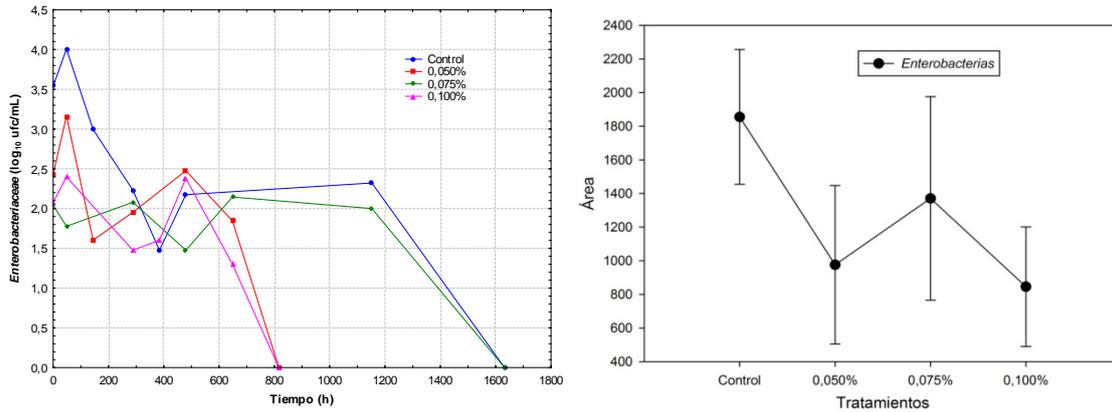


Figura 5.129. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl₂. a) Evolución de las poblaciones de enterobacterias en función del tiempo, según tratamientos; y b) área bajo la curva de crecimiento de enterobacterias, según tratamientos.

Las curvas de crecimiento no se relacionan con ningún modelo primario por lo que se procede al estudio de las áreas bajo las curvas. La presencia de ZnCl₂ en las salmueras provoca el descenso general de las poblaciones de enterobacterias, pero sin diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5.129b), debido a la variabilidad entre los replicados. Del estudio de la Figura 129b se deduce una tendencia a reducirse las poblaciones de este grupo de microorganismos cuando se añade ZnCl₂.

Las BAL están presentes casi desde el comienzo del envasado y sus poblaciones aumentan rápidamente durante los primeros días para alcanzar unos valores medios que oscilan entre ~4,0-7,0 log₁₀ ufc/mL (Figura 5.130a), mostrando también una gran variabilidad. Aparentemente, después de 1000 h, las poblaciones de BAL en los tratamientos con ZnCl₂ son mayores que en el Control.

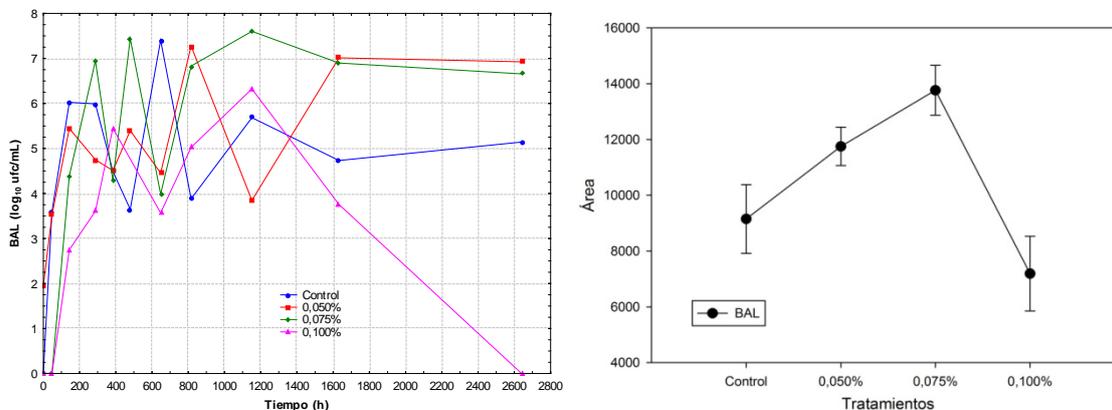


Figura 5.130. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl₂. a) Evolución de las poblaciones de BAL en función del tiempo, según tratamientos; y b) área bajo la curva de crecimiento de BALs.

Las curvas de crecimiento no se relacionan con ningún modelo primario por lo que se procede al estudio de las áreas bajo las curvas (Figura 5.130b), con objeto de obtener una visión global de su evolución. El efecto de concentraciones de 0,050% y 0,075% ZnCl_2 , sobre las poblaciones de BAL es favorable respecto al Control; sin embargo, en el caso de 0,100% ZnCl_2 existe un marcado descenso. Aparentemente, estimular el crecimiento o inhibición de las BAL depende de la concentración de ZnCl_2 utilizada.

Finalmente, las levaduras son los microorganismos más afectados por la presencia de ZnCl_2 en las salmueras de envasado (Figura 5.131a). Los recuentos y la población máxima en la experiencia Control son siempre mayores que en el tratamiento sin ZnCl_2 . Cabe destacarse que en el caso de 0,075% ZnCl_2 , sus recuentos finales son especialmente bajos. Así, el efecto de la presencia de esta sal es particularmente efectivo frente a las levaduras, que en este caso, ejerce una mejor inhibición que el sorbato potásico usado habitualmente por la industria (experiencia Control). Dicho efecto puede estar directamente relacionado con la propia acción del ZnCl_2 frente a dichos microorganismos y, asimismo, a la competencia del desarrollo de BAL, y de la consiguiente producción de ácido láctico, que la adición de dicha sal puede haber favorecido.

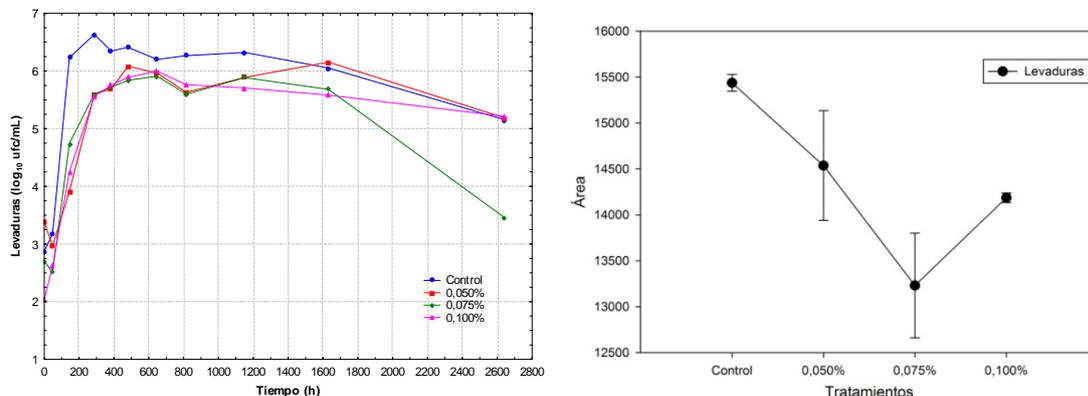


Figura 5.131. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con ZnCl_2 . a) Evolución de las poblaciones de levaduras en función del tiempo, según tratamientos; y b) área bajo la curva de crecimiento de las levaduras.

Al igual que en los casos anteriores, las curvas de crecimiento no se relacionan con ningún modelo primario por lo que se procede al estudio de las áreas bajo las curvas (Figura 5.131b). La adición de ZnCl_2 provoca un descenso marcado para las

concentraciones de 0,050% y 0,075% $ZnCl_2$, pero en el caso de 0,100% $ZnCl_2$ existe un aumento respecto a las concentraciones inferiores, aunque aún sigue siendo menor que la obtenida para el Control.

De los resultados de esta experiencia se deduce, en general, que ni la presencia de sorbato potásico ni el uso de $ZnCl_2$ en las proporciones empleadas son capaces de estabilizar completamente este tipo de presentación, debido al crecimiento de BAL y levaduras. Sin embargo, en las concentraciones usadas, el $ZnCl_2$ ha tenido un efecto conservante mucho mejor que el sorbato potásico a los niveles utilizados por las industrias actualmente.

Al caracterizar las poblaciones microbianas se observa que en el caso de las BAL, no hay presencia de estos microorganismos en uno de los replicados del Control ni en los dos replicados con 0,100% de $ZnCl_2$. En el resto de los tratamientos, se identifican las especies *Lactobacillus plantarum* (Control B, 0,050% $ZnCl_2$ B, y 0,075% $ZnCl_2$ B) y *Lactobacillus pentosus* (0,050% A y 0,075% A) (Tabla 5.52). Por lo tanto, aparentemente, no hay relación entre las especies identificadas y la concentraciones de $ZnCl_2$ en los tratamientos de procedencia.

Tabla 5.52. Envasado de aceituna fresca Aloreña de Málaga con $ZnCl_2$. Especies de BAL y levaduras aisladas, según tratamientos.

Tratamientos	BAL		Levaduras	
	Frecuencia (%)	Especies	Frecuencia (%)	Especies
<i>Control</i>				
A	Nd	N/A	100	<i>S. cerevisiae</i>
B	100	<i>L. plantarum</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>
<i>0,050% ZnCl₂</i>				
A	100	<i>L. pentosus</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>
B	100	<i>L. plantarum</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>
<i>0,075% ZnCl₂</i>				
A	100	<i>L. pentosus</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>
B	100	<i>L. plantarum</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>
<i>0,100% ZnCl₂</i>				
A	Nd	Nd	100	<i>S. cerevisiae</i>
B	Nd	Nd	100	<i>S. cerevisiae</i>

Nd: no detectado.

En cuanto a las levaduras, solo se identifica una especie (100% frecuencia) en todos los tratamientos: *S. cerevisiae*, ya descrita previamente en este tipo de presentaciones (Arroyo-López, 2007). Su presencia al final del proceso en los tratamientos con $ZnCl_2$ y sorbato potásico implica que, de todas las levaduras características de estas aceitunas, dicha especie es la más tolerante a ambos conservantes.

6. CONCLUSIONES

Primera. Los trabajos sobre la susceptibilidad y resistencia de diferentes microorganismos frente a las sales minerales indican que el NaCl y el CaCl₂ muestran un comportamiento similar y sus NIC y MIC son los más bajos, resultando ser, por tanto, las sales con mayores efectos inhibidores sobre el crecimiento de los mismos. Por su parte, los NIC y MIC del KCl son algo más elevados. Finalmente, los valores de los NIC y MIC del MgCl₂ son muy altos.

Segunda. Los resultados anteriores, sugieren que, en base exclusivamente a los efectos en la flora, el CaCl₂ y el KCl, en menor medida, podrían emplearse en sustitución del NaCl durante la fermentación o el envasado mientras que el uso más aconsejable del MgCl₂ sería su incorporación a los envasados para preparar productos enriquecidos en Mg.

Tercera. El estudio de los efectos de las mezclas de sales sobre los microorganismos simula las respuestas a unas condiciones de fermentación en las que, manteniéndose una cierta proporción de NaCl, se complementa la salmuera con otras sales, hasta un máximo del 9%. En relación con *S. cerevisiae*, los resultados indican que la incorporación adicional de KCl y MgCl₂, aumenta la tasa de crecimiento específico y reduce el periodo de latencia, estimulando, por tanto, su presencia. Los efectos son especialmente notables en el caso del MgCl₂, que, además, aumenta la población máxima, cosa que en una fermentación real no sería conveniente. Sin embargo, cuando se añade NaCl y CaCl₂ se produce una reducción del crecimiento, siendo los efectos del NaCl algo más acusados que los del CaCl₂, aunque globalmente muy parecidos.

Cuarta. De las investigaciones de los efectos de las diversas mezclas sobre *L. pentosus* se deduce, igualmente, que la adición de CaCl₂ (hasta un máximo del 9%) a una salmuera que ya contiene NaCl, aumenta la fase de latencia, reduce la tasa de crecimiento específico y la población máxima, lo que indica, en definitiva, que la incorporación de esta sal provoca una progresiva inhibición del desarrollo. Un porcentaje de KCl en torno al 2,5% incrementa la tasa de crecimiento específico de dicha bacteria, aunque, a partir de ese nivel, comienza ya a apreciarse un creciente efecto inhibidor. Cuando se añade MgCl₂ se reduce ligeramente la tasa de crecimiento y apenas se afecta la fase de latencia.

Quinta. El $ZnCl_2$ ha mostrado un marcado efecto inhibitor sobre numerosas especies de levaduras aisladas de aceitunas de mesa. Una concentración de 250 mg/L inhibe el crecimiento de todas ellas. El empleo más adecuado de esta sal sería, pues, en el envasado, ya que favorecería la conservación del producto y daría lugar al mismo tiempo a aceitunas enriquecidas en dicho nutriente.

Sexta. Los resultados de los estudios de las sales y de sus mezclas sobre los microorganismos no aconsejan el empleo de $MgCl_2$ en la fermentación; por ello, las experiencias con aceitunas se realizan solo con mezclas de NaCl, KCl y $CaCl_2$. La sustitución del NaCl por KCl o $CaCl_2$ no modifica sustancialmente la naturaleza de los procesos al estilo sevillano o de frutos colocados directamente en salmuera, aunque se han observado ciertas peculiaridades. La presencia de KCl provoca un ligero efecto favorable sobre el crecimiento de la totalidad de la flora y su contenido está relacionado con la sensación gustativa de salado. Sin embargo, el efecto del $CaCl_2$ es más destacado, especialmente en aceituna Gordal estilo sevillano, ya que reduce la velocidad de difusión de los azúcares, la producción de acidez y el crecimiento de la flora láctica, pero no afecta a la acidez total obtenida y da lugar a pH finales más bajos. La presencia de Ca en pulpa está principalmente ligada a la sensación de amargo.

Séptima. En los envasados se ha estudiado la sustitución parcial del NaCl por todas las sales, incluido el $MgCl_2$. Los cambios han sido relativamente limitados en cuanto a los efectos sobre la flora presente durante la vida de mercado estudiada. En general, el Na en pulpa está correlacionado con puntuaciones elevadas de las sensaciones gustativas de ácido y salado. La presencia de Ca en pulpa se ha relacionado con un incremento de la textura instrumental así como con los valores de amargo. El contenido en K se ha asociado a las sensaciones cenestésicas y puntuaciones bajas de acidez. Finalmente, el contenido de Mg en pulpa ha estado ligado con la acidez libre.

Octava. La adición de $ZnCl_2$ a los envasados ha favorecido la conservación de la aceituna Aloreña de Málaga, relacionándose con un incremento de la textura instrumental, bajos valores de pH y la sensación de ácido al tiempo que disminuye la de amargo. En aceituna verde estilo sevillano, el efecto conservante es menos destacado, aunque sin afectar a la estabilidad del producto. La presencia de dicho elemento en una concentración relativamente baja da lugar a las puntuaciones más elevadas de dureza, fibrosidad y crujiente mientras que las concentraciones elevadas se asocian a valores bajos de salado.

Novena. La sustitución del NaCl por otras sales de elementos nutrientes, o la incorporación del $ZnCl_2$ en los envasados, da lugar a aceitunas de mesa mucho más saludables, enriquecidas en los elementos añadidos y con niveles reducidos de Na. Los nuevos productos pueden aportar cantidades considerables de K, Ca, Mg o Zn a la dieta y contribuir de manera significativa a la ingesta diaria de los mismos con el consumo de solo un número reducido de aceitunas.

7. BIBLIOGRAFÍA



Acu-cell Nutrition, 2010. Calcium, magnesium. <http://www.acu-cell.com/acn.html>. Última visita octubre 2010.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), 2008. Estudio sobre el contenido de sodio en pan. Madrid.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), 2009. Plan de reducción del consumo de sal. Jornadas de debate. La Granja de San Ildelfonso, 19 y 20 Noviembre 2009.

Almeida, F.J., 1963. Acerca del melhoramiento da oliveira. *Bol. Da Junta Nacional do zeite*, Lisbon.

Arroyo López, F.N., Romero, C., Durán Quintana, M.C., López López, A., García García, P., Garrido Fernández, A., 2005. Kinetic study of the physicochemical and microbiological changes in seasoned olives during the shelf life period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5285-5292.

Arroyo López, F.N., 2007. *Conservación y envasado de aceitunas de mesa aliñadas de la variedad Manzanilla-Aloreña. Diseño de modelos matemáticos para el crecimiento e inactivación de las poblaciones de microorganismos*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

Arroyo López, F.N., Durán Quintana, M.C., Romero, C., Rodríguez Gómez, F., Garrido Fernández, A., 2007. Effect of storage process on the sugars, polyphenols, color, and microbiological changes in cracked Manzanilla-Aloreña table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7434-7444.

Arroyo-Lopez, F.N., Bautista-Gallego, J., Durán Quintana, M.C., Rodríguez Gómez, F., Romero-Barranco, C., Garrido-Fernández, A., 2008a. Improvement of the storage process for cracked table olives. *Journal of Food Engineering*, 89, 479-487.

Arroyo López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido Fernández, A., 2008b. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189-196.

Arroyo-Lopez, F.N., Bautista-Gallego, J., Chiesa, A., Durán Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2009a. Use of a D-optimal mixture design to estimate the effects of diverse chloride salts on the growth parameters of *Lactobacillus pentosus*. *Food Microbiology*, 26, 396-403.

Arroyo-López, F.N., Querol, A., Barrio, E., 2009b. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 663-669.

ASEMESA (Asociación de Exportadores e Industriales de Aceituna de Mesa), 2007. Asemesa analiza la evolución del sector durante los últimos años. *Mercacei* 50, 176-187.

B

Balatsouras, G.D., 1985. Taxonomic and physiological characteristics of the facultative rod type lactic acid bacteria isolated from fermenting green and black olives. *Grasas y aceites*, 36, 239-249.

Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 159-166.

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-299.

Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L., 1998. *El cultivo del olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 614 pp.

Beer-Borst, S., Costanza, M.C., Pechère-Bertschi, A., Morabia, A., 2009. Twelve-year trends and correlates of dietary salt intakes for the general adult population of Geneva, Switzerland. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 155-164.

Berner, L.A., McBean, L.D., Lofgren, P.A., 1990. Calcium and chronic disease prevention: challenges to the food industry. *Food Technology*, 44, 50-70.

Bibbins-Domingo K., Chertow G.M., Coxson P.G., Moran A., Lightwood J. M., Pletcher M.J., Goldman L., 2010. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 362, 590-599.

Bidlas, E., Lambert, R.J.W., 2008. Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 98-102.

Bleackley, M.R., Young, B.P., Lowen, C.J.R., MacGillivray, R.T.A., 2011. High density array screening to identify the genetic requirements for transition metal tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics*, 3, 95-205.

Borbolla y Alcalá, J.M.R. de la, Rejano Navarro, L., Nosti Vega, M., 1975. La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y Aceites*, 26, 153-60.

Borbolla y Alcalá, J.M.R. de la, Rejano Navarro, L., 1978. Sobre la preparación de las aceitunas estilo sevillano. La fermentación. I. *Grasas y Aceites*, 29, 281-91.

Bozariis, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M., Nychas, G.J., 2007. Effect of NaCl and KCl on the fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 796-805.

Brenes, M., García, P., Garrido, A., 1994. Influence of salts and pH on the firmness of olives in acidic conditions. *Journal of Food Quality*, 17, 335-346.

Buescher R.W., Hudson J.M., 1986. Bound cations in cucumber pickle mesocarp tissue as affected by brining and CaCl₂. *Journal of Food Science*, 51, 135-140.



Chavasti, V., Hudson, J.M., Torres, J.A., Daeschel, M.A., 1991. Evaluation of fermentative bacteria in a model low salt cucumber juice brine. *Journal of Food Science*, 56, 462-465.

Choi, S.Y., Beuchat, L.R., Perkins, L.M., Nakayama, T., 1994. Fermentation and sensory characteristics of kimchi containing potassium chloride as a partial replacement for sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 335-340.

Chorianopoulos, N.G., Boziaris, I.S., Stamatiou, A., Nychas, G.J.E., 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, 22, 117-124.

COI (Consejo Oleícola Internacional), 2004. *Trade Estándar Applying to Table Olives*. Document COI/OT/NC n°. 1, Madrid, Spain.

Columella, L.J.M. De Re Rustica. 42BC. Trad. Por Juan M^a Álvarez de Sotomayor. Editado por Sociedad Nestlé, A. E. P. A. Santander, 1979.

Commission of the European Communities, 2002. REGLAMENTO (CE) N° 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 10 de junio de 2002 relativo a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° 183/51.

Commission of the European Communities, 2006. REGLAMENTO (CE) N° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo del 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea N° L 404/26.

Commission of the European Communities, 2008. DIRECTIVA 2008/100/CE DE LA COMISIÓN de 28 de Octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones. Diario Oficial de la Unión Europea N° L 285/9.

Consumer Eroski, 2009. Alimentos elaborados: ¿Cuánta sal tienen? Por salud, menos sal. <http://revista.consumer.es/web/es/20060601/actualidad/analisis1/70490.php> Último acceso octubre 2010.

Conte, A., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A., 2007. Use of lemon extract to inhibit the growth of malolactic bacteria. *Journal of Food Protection*, 70, 114-118.

Cook N.C., Obarzanek E., Cutler J.A., Buring J.E., Rexrode K.M., Kumyika S.K., Appel L.J., Whelton P.K., 2009. Joint effects of sodium and potassium intake on subsequent cardiovascular disease: The trials of hypertension prevention follow-up study. *Archives of Internal Medicine*, 169, 32-40.

CSPI (Center Science Public Interest), 2008. CSPI claims sodium levels are still too high. http://members.ift.org/IFT/Pubs/Newsletters/weekly/nl_121008.htm#headlines3. Último acceso diciembre 2008.

D

Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Arroyo, F.N., Garrido-Fernández, A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*. 22, 521-528.

Doyle M.E., Glass K.A., 2010. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 44-56.

E

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S. rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.

F

FAO/WHO, 2002. Chapter 16, Zinc, in Human vitamins and mineral requirements. World Health Organization. Food and Health Organization of the United Nations. Rome.

Fernández Díez, M.J., de Castro Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., González Pellissó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M.I., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M.C., Sánchez Roldán, F., García García, P.,

de Castro, A., 1985. *Biología de la Aceituna de Mesa* CSIC, Madrid, Spain. CSIC, Ed. ISBN 84-00-06018-0.

Fleming, H.P., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., 1987. Effects of sodium chloride concentration on the firmness retention of cucumbers fermented and stored with calcium chloride. *Journal of Food Science*, 52, 653-657.

Fleming, H.P., Thompson, R.L., McFeeters, R.F., 1993. Firmness retention in pickled peppers as affected by calcium chloride, acetic acid, and pasteurization. *Journal of Food Science*, 58, 325-30.

Fleming, H.P., McFeeters, R.F., 2001. Differential glucose and fructose utilization during cucumber juice fermentation. *Journal of Food Science*, 66, 162-166.

Florenzano, G., Margheri, M.C., Pelasi, E., 1973. Recherches sur la microflora des olives, pates gringos et sur l'activité lipolitique d'espèces predominantes. *Inf. Oleicoles Internacionales*. 60101, 145-151.

Flores N.C., VanLeeuwen D., Pennock R.D., 2007. The effect of calcium on microbial quality and consistency of chile pepper (*Capsicum annum* cv. Mesilla cayenne) mash during fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1482-1487.



García, P., Brenes, M., Garrido-Fernández, A., 1994. Effects of pH and salts on the firmness of canned ripe olives. *Science des Aliments*, 14, 159-172.

García, P., Romero, C., Brenes, M., Garrido, A., 2002. "Validation of a Method for the Analysis of Iron and Manganese in Table Olives by Flame Atomic Absorption Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3654-3659.

García García, P., Durán Quintana, M.C., Brenes Balbuena, M., Garrido Fernández, A., 1992. Lactic fermentation during the storage of "Aloreña" cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 73, 324-330.

Garrido-Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M., 1997. *Table Olives. Production and Processing*. Chapman & Hall, London, UK.

González Cancho, F., 1960. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XVIII. Bacilos Gram-negativos no esporulados en las salmueras de aceitunas. *Grasas y Aceites*, 11, 125-31.

González Cancho, F., 1963. Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes estilo español. *Microbiología Española*, 16, 221-30.

González Cancho, F., Durán Quintana, M.C., 1981. Bacterias cocáceas del ácido láctico en el aderezo de aceitunas verdes. *Grasas y aceites*, 32, 373-9.

Guillou, A.A., Floros, J.D., Cousin, M.A., 1992. Calcium chloride and potassium sorbate reduce sodium chloride used during natural cucumber fermentation and storage. *Journal of Food Science*, 57, 1364-1368.

Guillou, A.A., Floros, J.D., 1993. Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage. *Journal of Food Science*, 58, 1381-1389.

H

He F.J., MacGregor G.A., 2008. Beneficial effects of potassium on human health. *Physiologia plantarum*, 133, 725-735.

Hibbert B., 2009. Chemometric analysis of sensory data. In: Brown SD, Tauler R, Walczak B, editors. *Comprehensive Chemometrics. Chemical and biochemical data analysis*. Amsterdam: Elsevier. p 377-424.

I

IOM (Institute Of Medicine), 2010. Strategies to reduce sodium intake in the United States. <http://www.iom.edu/~media/Files/Report%20Files/2010/Strategies-to-Reduce-Sodium-Intake-in-the-United-States/Strategies%20to%20Reduce%20Sodium%20Intake%202010%20%20Report%20Brief.pdf>. Último acceso marzo 2011.

IOOC (International Olive Oil Council), 2010. Sensory Analysis of Table Olives. COI/OT/Nº1/Rev 1 February 2010. Madrid: IOOC.

Izumi, H., & Watada, A. E., 1994. Calcium treatments affect storage quality of shredded carrots. *Journal of Food Science*, 59, 106-109.

J

Jacka, F., Overland, S., Stewart, R., Tell, G., Bjelland, I., Mykletun, A., 2009. Association between magnesium intake and depression and anxiety in community-dwelling adults: The Hordaland health study. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 43, 45-52.

Jackson, J.E., 1991. A user's guide to principal components. New York, USA: Wiley.

Jiménez, A., Guillen, R., Sánchez, C., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. M., 1995. Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruits during "Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2240-2246.

Jiménez A., Heredia A., Guillén R., Fernández-Bolaños J., 1997. Correlation between soaking conditions, cations content of cell wall, and olive firmness during "Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1653-1658.

Johanningsmeier S., McFeeters R.F., Fleming H.P., Thompson R.L., 2007. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter culture on fermentation of cabbage with reduced salt concentrations. *Journal of Food Science*, 72, M166-M172.

Jolliffe, I.T., 1986. *Principal component analysis*. New York, USA: Springer-Verlag.

Jones, R.P., Gadd, G., 1990. Ionic nutrition of yeasts-physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. *Enzymes and Microbial Technology*, 12, 402-416.

K

Kanavouras, A., Gazouli, M., Leonidas, T., Petrakis, C., 2005. Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, 56, 106-115.

Kowalski, B.R., Bender, C.F., 1972. Pattern recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of The American Chemical Society*, 94, 5632-5639.

L

Lambert, R.J.W., Lambert, R., 2003. A model for the efficacy of combined inhibitors. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 734-743.

Lambert, R.J.W., Pearson, J., 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 784-790.

Leiba, A., Vald A., Peleg, E., Shamiss, A., Grossman, E., 2005. Does dietary recall adequately assess sodium, potassium, and calcium intake in hypertensive patients? *Nutrition*, 21, 462-466.

López, A., García, P., Garrido, A., 2008. Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition. *Food Chemistry*, 106, 369-378.

López, F.N.A., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A., 2006. The use of a D-optimal design with one qualitative variable (acid type) to model the effects of temperature, NaCl, and acid concentration on *Lactobacillus pentosus* IGLAC01. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 913-926.

M

Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., De Angelis, M., Russi F., 2002. Sensory analysis of green table olives fermented in different saline solutions. *Acta Horticulturae*, 586, 617-620.

Marsilio, V, Russi, F, Iannucci, E, Sabatini, N., 2008. Effects of alkali neutralization with CO₂ on fermentation, chemical parameters and sensory characteristics of Spanish-style green olives. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 796-802.

McFeeters, R.F., Fleming, H.P., 1989. Inhibition of cucumber tissue softening in acid brines by multivalent cations: Inadequacy of the pectin “egg box” model to explain textural effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1053-1059.

McFeeters R.F., Pérez-Díaz I., 2010. Fermentation of cucumbers brined with calcium chloride instead of sodium chloride. *Journal of Food Science*, 75, C291-C296.

McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkosky, D.A., 1993. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. John Wiley & Sons, New York.

Medicine On Line. 2010. Potassium. Disponible en <http://www.medicineonline.com/topics/P/2/Potassium.html>. Ultimo acceso, Octubre 2010.

Ministerio de la Presidencia, 2001. Real Decreto 1230/2001 de 8 de Noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa. BOE 279/2001, 42587-42594. Madrid.

Montaño, A., Sánchez, A.H., Castro, A., 1993. Controlled fermentation of green table olives. *Journal of Food Science*, 58, 842-852.

Montaño, A., Sánchez, A.H., Casado, F.J., de Castro, A., Rejano, L., 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82, 297-302.

Moreno Baquero, J.M., 2011. Estudio del equilibrio de minerales nutrientes entre pulpa y/o jugo y salmuera de aceitunas de mesa. Máster en Estudios Avanzados en Química. Facultad de Química Universidad de Sevilla. Sevilla.

Mulè, R., Fodale, A.S., Bati, C.B., Tucci, A., 2000. Preliminary results of a new processing in order to obtain green table olives with low sodium content. *Industrie Alimentari*, 31, 844-847.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2002. Response surface methodology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc, New Yrk. Naewbanij, J.O., Stone, M.B., Chambers IV, E., 1990. Lactobacillus plantarum and Enterobacter cloacae growth in cucumber extracts containing various salts. *Journal of Food Science*, 55, 1634-1637.

N

Naewbanij, J.O., Stone, M.B., Fung, D.Y.C., 1986. Growth of *Lactobacillus plantarum* in cucumber extract containing various chloride salts. *Journal of Food Science*, 51, 1257-1259.

Naewbanij, J.O., Stone, M.B., Chambers, I.V., 1990. *Lactobacillus plantarum* and *Enterobacter cloacae* growth in cucumber extracts containing various salts. *Journal of Food Science*, 55, 1634-1637.

Ngo, T., Zhao, Y., 2007. Formation of zinc-chlorophyll derivative complexes in thermally processed green peas (*Pyrus communis* L.). *Journal of Food Science*, 72, C397-C404.

O

OCU (Organización de Consumidores y Usuarios), 2010. Menos sal, más salud. OCU-Salud 88. http://www.ocu.org/salud-y-bienestar/20100201/editorial-Attach_s480894.pdf Último acceso octubre 2010.

Office of Dietary Supplements (National Institute of Health), 2011. Dietary Supplement Facts Sheet. Zinc. <http://ods.od.nih.gov/> . Último acceso Enero 2011.

Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S., Baek, Y., 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3809-3814.

P

Package Facts, 2004. Market trends: Low sodium foods. <http://www.packagedfacts.com/Trends-Low-Sodium-1018657/> Último acceso Febrero 2011.

Pagani, M.A., Casamayor, A., Serrano, R., Atrian, S., Ariño, J., 2007. Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Molecular Microbiology*, 65, 521-537.

Panagou, E. Z., 2006. Greek dry-salted olives; monitoring the dry salting process and subsequent physicochemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C. *LWT Food Science and Technology*, 39, 322-329.

Panagou, E.Z., Katsaboxakis, C.Z., 2006. Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish method. *Food Microbiology*, 23, 199-204.

Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Nychas, G.J.E., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25, 348-358.

Panagou, E.Z., Hondrodinou, O., Mallouchos, A., Nychas, G.J.E., 2011. A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, 28, 1301-1307.

Papoff, C.M., Agabbio, M., Vodret, A., Farris, G.A., 1996. Influence of some biotechnological combinations on the sensory quality of “Manna” green table olives. *Industrie Alimentari*, 35, 375-381.

Papoff, C.M., Cappio-Borino, A., Farris, G.A., Abaggio, M., Vodret, A., 1997. The absorption of NaCl or KCl in Spanish style green olives during the first thirteen days of brine fermentation. *La Rivista Di Scienza dell' Alimentazione*, 26, 7-12.

Peleg, M., 1996. A model of microbial growth and decay in a closed habitat based on a combined Fermi's and the logistic equations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 225-230.

PennState Hershey Children Hospital, 2010. Magnesium. Disponible en <http://www.pennstatehershey.org/healthinfo/childrens/33/000313.htm>. Última visita, Octubre 2010.



Querol, A., Fleet, G., 2006. *Yeasts in food and beverages*. Springer-Verlag, Berlin (Germany).



Rafferty, K., Walters, G., Heaney, R.P., 2007. Calcium fortificants: Overview and strategies for improving calcium nutriture of the U.S. population. *Journal of Food Science*, 72, R152-R158.

Rao, M. S., Pintado, J., Stevens, W. F., Guyot, J. P., 2004. Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology*, 94, 331-337.

Reinivuo, H., Valsta, L.M., Laatikainen, T., Tuomilehto, J., Pietinen, P., 2006. Sodium in the Finish diet. II trends in dietary sodium intake and comparison between intake and 24h excretion of sodium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1160-1167.

Rejano, L., González-Cancho, F., Rodríguez-Borbolla, J.M., 1978. La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y aceites*, 29, 203-210.

Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2010. Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604-612.

Roy, S., Conway, W.S., Watada, A.E., Sams, C.E., Pooly, C.D., Wergin, W. P., 1994. Distribution of the anionic sites in the cell wall of apple fruit after calcium treatment. *Protoplasma*, 178, 156-167.

Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347, 333-335.

Ruiz Cruz, J., González Cancho, F., 1969. Metabolismo de levaduras aisladas de salmueras de aceitunas aderezadas al estilo español. I. Asimilación de los ácidos lácticos, acético y cítrico. *Grasas y Aceites*, 20, 6-11.

Rute, A., Ramos, A., Shearman, C., Gasson, M.J., Santos, H., 2002. Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG1363 and a mutant defective in lactate dehydrogenase. *Microbiology*, 148, 3467-3476.

S

Sahin I., Akbas H., 2001. Prevention of Softening in Cucumber Pickle and Determination of Applicable Amount of Calcium chloride (CaCl₂). *Gida*, 26, 333-338.

Sánchez Gómez, A.H., Rejano Navarro, L., Montañó Asquerino, A., 1985. "Determinaciones de color en las aceitunas verdes aderezadas de la variedad Manzanilla". *Grasas y Aceites*, 36, 258-261.

Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., 2010. Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts. *Food Chemistry*, 123, 741-746.

Simmonds, N.W., 1976. *Evolution of crop plants*, Logman, London New York.

Sleator, R.D., Hill, C., 2007. Food reformulation for improved health: a potential risk for microbial food safety? *Medical Hypothesis*, 69, 1323-1324.

Stamler J., 1997. The INTERSALT study: Background, methods, findings, and implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 626S-642S.

Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 137-159.

T

Taoukis, P. S., Labuza, T. P., Saguy, I. S., 1997. Kinetic of food deterioration and shelf-life prediction. In Valentas, K.J., Rotstein, E., Singh, R.P, *Handbook of Food Engineering Practice*; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 361-404.

Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsaboxakis, K.Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19, 605–615.

Tassou, C.C., Katsaboxakis, C.Z., Georget, D.M.R., Parker, M.L., Waldron, K.W., Smith, A.C. y Panagou, E.Z., 2007. Effect of calcium chloride on mechanical properties and microbial characteristics of cv. *Conservolea* naturally black olives fermented at different sodium chloride levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1123-1131.

Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450-3454.

Tsapatsaris, S., Kotzekidou, P., 2004. Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*. 95, 157-168.



US Food and Drug Administration, 2010. FDA issues statement on IOM sodium report. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2010/ucm209155.htm>. Último acceso Marzo 2010.

U.S. Food and Drug Administration, 2011. Listing of Food Additive Status. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm>. Último acceso 18 diciembre 2011.



Van Boekel, M.A.J.S., 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 139-159.

Vavilov N.I., 1951. Phytogeographic basis of plant breeding. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Bot.* 13, 1-366 (cited by Zohary, D. 1970. Centers of diversity and centers of origin, in *Genetic Resources in Plants*. Fraubel and Benet (eds.), I.B.P., Oxford, 1-554).

Viander, B., Mäki, M., Palva, A., 2003. Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 20, 391-395.

Villegas, R., Gao, Y.T., Dai, Q., Yang, G., Cai, H., Li, H., Zheng, W., Shu, X.O., 2009. Dietary calcium and magnesium intakes and the risk of type 2 diabetes: the Shanghai Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1059-1067.

W

Walker, G.M., 2004. Metals in Yeast fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 197-229.

Walter Jr. W.M., Fleming H.P., Thompson R.L., Fine T.I., 1996. Effect of sodium chloride concentration on calcium uptake into brined cucumbers. *Journal of Food Quality*, 19, 161-172.

Winer, B.J., 1962. *Statistical principles in experimental design*. New York: McGraw-Hill.

Y

Yamani M.I., Hammouth F.G.A., Humeid M.A., Robinson R.K., 1999. Production of fermented cucumbers and turnips with reduced levels of sodium chloride. *Tropical Science*, 39, 233-237.

Z

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombous, F.M., van't Riet, K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

8. ANEXO

De esta Tesis Doctoral se han publicado, hasta el momento, los siguientes artículos y registrado las siguientes patentes:

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Chiesa, A., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2008. Use of a D-optimal design with constrains to quantify the effects of the mixture of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 889-900.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2008. Individual Effects of Sodium, Potassium, Calcium, and Magnesium Chloride Salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* Growth. *Journal of Food Protection*, 71, 1412–1421.

Arroyo-López, F.N., **Bautista-Gallego, J.**, Chiesa, A., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2009. Use of a D-optimal mixture design to estimate the effects of diverse chloride salts on the growth parameters of *Lactobacillus pentosus*. *Food Microbiology*, 26, 396–403.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2010. Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. *Food Microbiology*, 27, 403-412.

Composiciones conservantes de aceitunas con actividad antifúngica. **Bautista Gallego J.**, Arroyo-López F.N., Garrido Fernández A., García García P., López López A., Rodríguez Gómez F. N° de solicitud: P201030491 (CSIC), España (2010).

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Garrido-Fernández, A., 2011. Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 120-129.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., 2011. Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 28, 1316-1325.

Rodríguez-Gómez, F., **Bautista-Gallego, J.**, Romero-Gil, V., Arroyo-López, F.N., Garrido-Fernández, A., García-García, P., 2012. Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 56-63.

Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2012. Modeling the inhibitory effects of zinc chloride on table olive related yeasts. *Food Control*, 23, 499-505.

Moreno-Baquero, J.M., **Bautista-Gallego, J.**, Garrido-Fernández, A., López-López, A. Mineral content and sensory characteristics of Gordal green table olives fermented in chloride salt mixtures. *Journal of Food Science*, Aceptado.

