

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE LA  
ACEITUNA VERDE (*Olea europaea sativa* Hoffg, Link) SEVILLANA,  
AL ESTILO ESPAÑOL, MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE UN  
CULTIVO DE *Lactobacillus plantarum*

TESIS

PRESENTADA POR:

**BACH. ROSMERI ANA MANCILLA JOAQUIN**

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TACNA – PERÚ

2 013

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

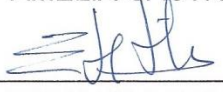
OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DE LA  
ACEITUNA VERDE (*Olea europaea sativa* Hoffg, Link) SEVILLANA,  
AL ESTILO ESPAÑOL, MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE UN  
CULTIVO DE *Lactobacillus plantarum*

Sustentada y aprobada el miércoles 25 de enero del 2012 siendo el jurado calificador

Jurados:

Presidente :   
Dra. LILIANA LANCHIPA BERGAMINI

Secretario :   
Mgr. AMELIA GASTRO GAMERO

Vocal :   
Mgr. ENRIQUE DE FLORIO RAMIREZ

ASESOR :   
Mgr LUÍS ALBERTO MARÍN ALIAGA

## DEDICATORIA

A mis padres, por su amor y apoyo  
incondicional

A mi esposo, por su paciencia y por estar  
siempre ahí apoyándome en todo lo que  
necesite.

A mis hijas Camila y Romina, quienes han  
sido mi mayor motivación para no rendirme  
en la culminación de mi tesis y así poder ser  
un ejemplo para ellas.

## **AGRADECIMIENTO**

De manera especial a las siguientes personas:

Al asesor de la presente tesis Ing. Luis Alberto Marín Aliaga

Al Sr Renato Casaretto De Feudis por su valiosa colaboración en la ejecución y  
desarrollo de la presente tesis.

Al Sr Juan Antonio Aguilar por su importante apoyo en la culminación de esta  
tesis.

Al Sr Dino Arredondo por su apoyo desinteresado por alcanzar los objetivos  
planificados en esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
CAPITULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 El olivo .....	3
1.1.1 Historia del olivo.....	3
1.1.2 Producción.....	4
1.1.3 Clasificación taxonómica .....	5
1.1.4 El fruto del olivo .....	6
1.1.5 Variedades de aceituna existentes en el Perú.....	8
1.1.6 Composición química de la aceituna .....	9
1.2 Procesamiento de la aceituna verde al estilo español .....	12
1.2.1 Principales insumos.....	12
1.2.1.1 Agua .....	12
1.2.1.2 Sal .....	12

1.2.1.3	Soda cáustica .....	13
1.2.1.4	Ácido acético .....	14
1.2.1.5	Ácido láctico.....	14
1.2.2	Principales operaciones en el procesamiento de la aceituna verde al estilo español .....	15
1.2.2.1	Recolección .....	15
1.2.2.2	Tratamiento con lejía .....	16
1.2.2.3	Lavados .....	17
1.2.2.4	Colocación en salmuera .....	18
1.2.2.5	Fermentación.....	19
1.2.3	Principales alteraciones microbianas en la fermentación de aceituna verde al estilo sevillano .....	25
1.3	Bacterias lácticas .....	27
1.3.1	Genero <i>Lactobacillus</i> .....	28
1.3.2	Características generales de los lactobacilos .....	29
1.3.3	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	30
1.3.4	Clasificación científica del <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	31
1.4	Papel de las bacterias lácticas en la fermentación de la aceituna de mesa .....	32

1.5	Utilización de cultivos lácticos en la fermentación de aceitunas .	33
1.6	Parámetros en la fermentación de aceitunas verdes al estilo español .....	35
1.6.1	Acidez Libre .....	35
1.6.2	Acidez combinada.....	36
1.6.3	pH .....	36
1.6.4	Fermentación controlada .....	37
1.6.5	Fermentación ácido-láctica .....	37
1.7	Metodología de superficie de respuesta (MSR) .....	37
1.7.1	Diseño Box-Behnken .....	38
1.7.2	Optimización .....	38
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....		40
2.1	Lugar de ejecución .....	40
2.2	Materia prima e insumos.....	40
2.2.1	Materia prima .....	40
2.2.2	Insumos .....	40
2.3	Materiales y Equipos.....	41
2.3.1	Materiales utilizados para el proceso.....	41

2.3.2	Equipos de laboratorio .....	42
2.3.3	Reactivos .....	43
2.3.4	Materiales de laboratorio .....	44
2.4	Metodología .....	45
2.4.1	Análisis de la materia prima .....	45
2.4.2	Análisis fisicoquímico de la salmuera en fermentación .....	46
2.4.3	Identificación y caracterización del cultivo láctico utilizado ...	47
2.4.4	Evaluación sensorial .....	49
2.5	Diseño experimental .....	50
2.5.1	Procedimiento activación del cultivo Láctico Liofilizado .....	50
2.5.2	Procesamiento de aceitunas con cultivo láctico.....	53
2.5.3	Diseño Experimental.....	56
2.5.4	Procesamiento y análisis estadístico de datos.....	59
CAPITULO III. HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES .....		61
3.1	Formulación de la hipótesis .....	61
3.1.1	Hipótesis específicas .....	61
3.2	Identificación de variables e indicadores .....	62
3.2.1	Variables.....	62

3.2.2	Indicadores .....	62
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....		63
4.1	Análisis de la materia prima.....	63
4.1.1	Índice de madurez .....	63
4.1.2	Tamaño de la aceituna .....	63
4.1.3	Relación pulpa- hueso .....	64
4.1.4	Determinación del pH .....	64
4.1.5	Azúcares Reductores.....	65
4.1.6	Análisis proximal a la aceituna.....	65
4.2	Análisis fisicoquímico de la salmuera .....	66
4.2.1	Evaluación del pH.....	68
4.2.2	Acidez titulable.....	76
4.2.3	Acidez combinada.....	84
4.3	Evaluación sensorial - efecto en la aceptabilidad del producto final .....	86
4.3.1	Sabor .....	88
4.3.2	Color .....	90
4.3.3	Textura.....	93

4.4	Identificación y caracterización del cultivo láctico .....	94
4.5	Optimización de los parámetros en estudio .....	96
4.6	Resultados de la evaluación del producto final.....	98
	CONCLUSIONES .....	103
	RECOMENDACIONES.....	104
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

## ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Características físico-químicas de la aceituna variedad sevillana.....	10
Cuadro 2. Composición química de la aceituna variedad Sevillana.....	11
Cuadro 3. Niveles de las variables independientes estudiadas en la determinación de los mejores parámetros de proceso.....	55
Cuadro 4. Delineamiento experimental factorial de Box Benken con tres variables y tres niveles para el proceso de fermentación de aceituna verde al estilo español.....	56
Cuadro 5. Calibrado de aceituna verde.....	61
Cuadro 6. Principales análisis realizados a la aceituna verde variedad sevillana.....	62
Cuadro 7. Composición proximal de la pulpa de aceituna verde.....	63
Cuadro 8. Resultados del análisis fisicoquímico de la fermentación de aceituna verde con cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	64

Cuadro 9.	Resultados de pH de los 15 ensayos y muestra testigo durante la fermentación de la aceituna verde al estilo español, con inoculación de un cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	66
Cuadro 10.	Resultados experimentales del desarrollo de la acidez expresado porcentaje de ácido láctico de los 15 ensayos y la muestra testigo durante la etapa de fermentación de la aceituna verde al estilo sevillano, con inoculación de un cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	78
Cuadro 11.	Resultado de la acidez combinada expresada en Normalidad a los veinte días de iniciada la fermentación.....	83
Cuadro 12.	Tratamientos según diseño experimental de Box-Benken y sus resultados experimentales para la evaluación sensorial.....	87
Cuadro 13.	Resultados de la caracterización del cultivo láctico para la identificación del <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	95
Cuadro 14.	Criterios y solución para la selección del tratamiento de mejores condiciones de fermentación con adición de cultivo láctico.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas.
Figura 1. Producción nacional de olivo (TM).....	4
Figura 2. El fruto del olivo.....	6
Figura 3. Evolución de la fermentación de la aceituna verde al estilo español.....	25
Figura 4. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	30
Figura 5. Activación del cultivo láctico liofilizado de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	50
Figura 6. Flujograma experimental en el procesamiento de la aceituna verde al estilo español con inoculación de cultivo láctico.....	54
Figura 7. Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 4 de pH de inoculación según el diseño experimental.....	68
Figura 8. Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 5,5 de pH de inoculación según el diseño experimental.....	68

Figura 9.	Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 7 de pH de inoculación según el diseño experimental.....	69
Figura 10.	Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de NaCl y pH inicial, a nivel constante de cultivo láctico=0,22g/Kg sobre el pH final.....	71
Figura 11.	Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de NaCl y cultivo láctico inicial, a nivel constante de pH inicial = 5,5 sobre el pH final.....	72
Figura 12.	Evolución de la acidez en tratamientos sin acidificación inicial (pH= 7).....	74
Figura 13.	Evolución de la acidez en tratamientos con acidificación inicial (pH= 5,5).....	76
Figura 14.	Evolución de la acidez en tratamientos con acidificación inicial (pH=4).....	77
Figura 15.	Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de Na Cl y el pH inicial, a nivel constante de concentración de cultivo láctico de 0,22g/Kg sobre la acidez desarrollada.....	78

Figura 16.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de concentración de NaCl y cultivo láctico, a nivel constante de pH inicial = 5,5 sobre la acidez desarrollada.....	80
Figura 17.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de concentración de pH inicial y cultivo láctico, a nivel constante de concentración de NaCl = 6°Be sobre la acidez desarrollada.....	81
Figura 18.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de concentración de NaCl y pH inicial sobre el sabor de las aceitunas verdes fermentadas a nivel constante de cultivo láctico 0,22 g/100 kg.....	89
Figura 19.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto del pH inicial y concentración de cultivo láctico a nivel constante de concentración de NaCl = 6°Be sobre el sabor de las aceitunas verdes fermentadas.....	90
Figura 20.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de NaCl y del pH inicial a un nivel de cultivo láctico de 0,22 g/100 kg, sobre el color de las aceitunas verdes fermentadas.....	92

Figura 21.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto del pH inicial y cultivo láctico sobre el color de las aceitunas verdes fermentadas, a un nivel constante de concentración de NaCl = 6°Be.....	93
Figura 22.	Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de NaCl y pH inicial sobre la textura de las aceitunas verdes fermentadas, a un nivel constante de cultivo = 0,22 g /100 kg.....	95
Figura 23.	Optimización por la metodología de la función deseada de la fermentación dirigida de la aceituna verde manteniendo fijo el nivel de concentración de cultivo en 0,136g/100kg.....	97
Figura 24.	Desarrollo comparativo de la acidez titulable entre la fermentación del tratamiento de mejores condiciones (salmuera 6 °Be; 132 g/100 kg de adición de cultivo láctico; pH inicial = 4) y la fermentación tradicional (salmuera 6 °Be).....	99
Figura 25.	Desarrollo comparativo del pH final entre la fermentación del tratamiento óptimo (salmuera 6,0 °Be; 132 g/100 kg de cultivo láctico; pH inicial = 4) y fermentación tradicional (salmuera 6 °Be).....	100

Figura 26. Flujo definitivo para el procesamiento de aceituna verde al estilo español en una fermentación por inoculación de cultivo láctico.....	101
---	-----

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.Especificaciones del cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	110
Anexo 2.Tanque de fermentación .....	111
Anexo 3.Ficha de análisis sensorial sabor .....	112
Anexo 4.Ficha de análisis sensorial color .....	113
Anexo 5.Ficha de análisis sensorial textura .....	114
Anexo 6.Fruto del olivo de la variedad sevillana utilizada en la investigación .....	115
Anexo 7.Preparación de la salmuera y conversión de °Bé a %.....	116
Anexo 8.Análisis estadístico para la evaluación de la variable respuesta pH final.....	117
Anexo 9.Análisis estadístico para la evaluación de la variable respuesta acidez desarrollada .....	118
Anexo 10.Análisis estadístico para la variable respuesta sabor .....	119
Anexo 11.Análisis estadístico para la variable respuesta color .....	120
Anexo 12. Análisis estadístico para la variable respuesta textura .....	121

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad principal optimizar los parámetros iniciales para la fermentación la aceituna verde al estilo español con inoculación de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*. Para la evaluación estadística se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MRS) con el modelo de Box-Benken; El diseño experimental fue de 15 tratamientos, los niveles de las variables independientes fueron: concentración de cloruro de sodio (4; 6 y 8 °Bé), pH inicial (4; 5,5 y 7) y concentración de cultivo láctico (0,132; 0,22 y 0,308 g/100 kg de aceituna). Los resultados obtenidos de las mejores condiciones operacionales fue de 6,32 °Bé de concentración de cloruro de sodio, 0,136 g/100 kg de concentración de cultivo láctico y 4 unidades de pH inicial de la salmuera, dichos parámetros reportan una acidez titulable de 0,848 %; un pH final de 3,76 unidades. Para la evaluación sensorial se utilizó la prueba Hedónica con calificación de escalas de intervalo 1 a 9 puntos dando como resultados en el atributo sabor fue de 5,367; color fue de 6,293 y textura fue de 5,660.

## **ABSTRACT**

This work had as main purpose to optimize the initial parameters for fermentation Green Olive Spanish with inoculation of a culture of *Lactobacillus plantarum*. For statistical evaluation the Response Surface Methodology (MRS) was used to model Box- Benken, The experimental design was 15 treatments , the levels of the independent variables were: concentration of sodium ( chloride 4; 6 and 8 °Bé ), initial pH (4; 5,5 and 7) and lactic culture concentration (0,132; 0.22 and 0,308 g/100 kg of olives ). The results of the best operating conditions of 6,32 °Bé concentration of sodium chloride concentration 0,136 g/100 kg of lactic culture and 4 units of the initial pH of the brine, these parameters reported 0.848 titratable acidity %, a final pH of 3,76 units. For the Hedonic sensory evaluation test was used with rating scales range 1-9 points giving as results in flavor attribute was 5,367; was 6,293 color and texture was 5,660.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la fermentación de aceitunas verdes al estilo español en Tacna siguen un patrón de elaboración tradicional. En dichas fermentaciones producto de partida se manipula de manera que permita el desarrollo en las salmueras de una microbiota espontánea no inoculada; esto hace que aparezcan con frecuencia variaciones indeseables en la calidad del producto final. Mediante éste trabajo se presenta una alternativa de proceso para controlar dichas fermentaciones utilizando cultivos lácticos.

Los investigadores del Instituto de la Grasa (Jiménez y Ruiz, 2004) han patentado un cultivo láctico, éste es un liofilizado de dos cepas de bacterias lácticas, el uso de cultivos lácticos en la fermentación de aceituna da como resultado una fermentación homogénea y la calidad del producto final es de excelentes características organolépticas, por ello los objetivos para el presente trabajo son:

Objetivo general:

Optimizar la fermentación de la aceituna verde en salmuera al estilo español, mediante la inoculación de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*.

Objetivos específicos:

- Determinar la concentración inicial de cloruro de sodio, nivel inicial de pH y concentración óptima de cultivo de *Lactobacillus plantarum* a través de la aceptabilidad sensorial y características fisicoquímicas.
- Evaluar la marcha de fermentación determinando la acidez libre y pH según las condiciones de diseño experimental.
- Caracterizar los análisis fisicoquímicos, sensoriales e identificación microbiológica del tratamiento optimizado.

## **CAPITULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 El olivo**

#### **1.1.1 Historia del olivo**

El olivo es una planta prehistórica, muchas leyendas a lo largo de la historia lo han colocado en Asia Menor, India y Europa. Lo que sí es cierto es que se puede considerar el área Mediterránea y sus alrededores como la región del olivo. Desde allí se extendió al Nuevo Mundo, llevado por los colonizadores españoles, en el siglo XV, fue introducido en las Antillas, Sudamérica y México posteriormente, posteriormente, llegó a California con los Padres Franciscanos al final del siglo XVIII. Emigrantes españoles e italianos, llevaron también el olivo a Australia y Sudáfrica (Fernández, 1982).

En el departamento de Tacna se tiene referencia de su cultivo por el año 1753 en el huerto de Santa Rosa de Para, la propagación fue en los pagos o cercados de la ciudad de Tacna, valle de Sama e Ite. En los años 1954 empieza la propagación por Magollo, Yarada y los Palos (Casilla, 1998).

### 1.1.2 Producción

Las principales zonas productoras de aceituna en el Perú se muestran en la figura 1, en éste se puede apreciar que las plantaciones de olivo se concentran en la costa sur del país.

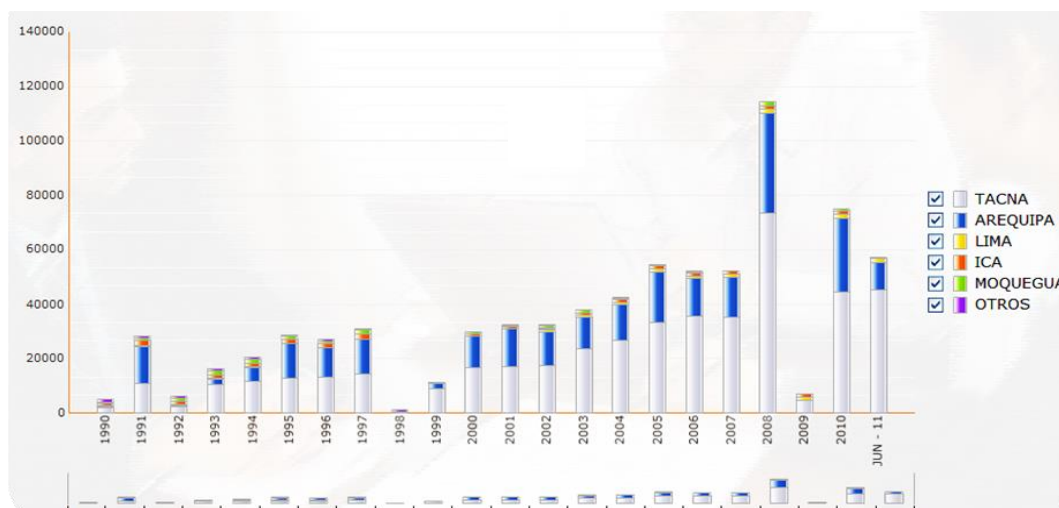


Figura 1. Producción nacional de olivo (TM)  
Fuente: Cilloniz (2011)

Como se puede observar en la figura 1, la producción de aceituna se concentra principalmente en el departamento de Tacna, ya que ésta abarca más del 68 % de la producción nacional, y en donde se registra el mayor rendimiento de olivo a nivel nacional (7,054 TM/ha), dada la eficiente conducción técnica del cultivo, aplicando buenas prácticas agrícolas como podas, fertilización, deshierbes, riego, tratamiento de plagas y para la obtención de una cosecha de aceitunas uniformes en tamaño y maduración.

En segundo lugar es Arequipa con un 26,6 % de la producción nacional y con un rendimiento de (6,072 TM/ha). Luego le siguen los departamentos de Ica, Lima, Moquegua y La Libertad. La cosecha de la aceituna es estacional, varía entre los meses de Marzo a Septiembre, siendo las variedades Ascolana, Liguria y sevillana las más cultivadas.

El 5% de la producción peruana de oliva se dedica al aceite. El 95% se procesa en forma de aceituna entera, la mayor parte como negra de maduración natural popularmente llamada “botija”.

### 1.1.3 Clasificación taxonómica

Según Strasburger, la clasificación del olivo es como sigue:

Reino	:	Eucariota
Subreino	:	Cormobionta
División (phylum)	:	Spermatophyta
Subdivisión	:	Magnoliophytina (angiospermae)
Clase	:	Magnolictae (Dicotyledoneae)
Subclase	:	Lamiiedae
Orden	:	Oleales (ligustrales)
Familia	:	Oleaceas
Género	:	Olea
Especie	:	<i>Olea europea</i>

#### 1.1.4 El fruto del olivo

El fruto del olivo es una drupa ovoide, redonda o curva con mesocarpio carnoso y piel que pasa del verde pálido al negro a medida que va madurando, con endocarpio o hueso duro y más o menos puntiagudo. La piel de color verde cambia de morado o negro cuando está madura, alcanzando un peso medio comprendido entre 1,5 a 12 gramos aproximadamente, sus dimensiones oscilan generalmente entre 2 y 3 cm de longitud y 1 a 2 cm de diámetro transversal, siendo su peso específico próximo a la unidad (Fernandez y Colbs, 1985). En la figura 2, se muestra el fruto del olivo.



Figura 2. El fruto del olivo (*Olea europaea sativa*, Hoffg, Link)  
Fuente: Elaboración propia (2008)

Según la variedad y como tal está constituido de cuatro partes.

- a) Epicarpio o bolsa: De consistencia membranosa, delgado, liso, brillante y de color primero verde y después variable según la variedad: violáceo, negro, etc. El epicarpio constituye la epidermis del fruto, representando el 1,5 a 3,5 % del peso total de la aceituna.
  
- b) Mesocarpio: Constituye del 65 al 83 % del peso total de la aceituna formado por células isodiamétricas que aumentan de tamaño a medida que madura el fruto. La pulpa es carnosos oleosa, más o menos gruesa, consistente y de color verdoso, tecnológicamente es la parte más importante.
  
- c) Endocarpio: Es la capa interna y leñosa que envuelve la semilla, se encuentra formado del 13 al 30 % del peso total de la aceituna. La forma del endocarpio reproduce con bastante fidelidad, la forma del fruto.
  
- d) Semilla: Se encuentra localizada en el interior del endocarpio, es fusiforme y consta del tegumento, del endospermo y del embrión. Generalmente es única de color blanco y de cotiledones de naturaleza oleaginosos.

### **1.1.5 Variedades de aceituna existentes en el Perú**

Según la Asociación Nacional de Productores y Exportadores de Aceituna Peruana (ANPEAP, 2000), denominan a la aceituna Sevillana como Aceituna Peruana “botija”, la cual es cultivada en el Perú en un 98% de la producción y el 2% de otras variedades.

a) Variedad Sevillana: Variedad peruana “botija” es la más antigua que existe en el país conocida también como “criolla” de Yauca e Ilo. Fue introducida por los españoles y la sola comprobación del desarrollo exuberante alcanzado por la planta, su longevidad y la producción de abundantes cosechas determinan que se trata de una variedad adaptada al medio ecológico de los valles de Huaral, Pisco, Bella Unión, Yauca, Ilo y Tacna. El fruto es de color grande, de color negro- morado intenso a la madurez, con base ancha y ápice curvado; es la mejor variedad para la preparación de aceitunas botija, machacada y seca por todos los métodos criollos. A ello se debe el hecho de su preferencia en la actualidad de su cultivo (Flores, 1961).

b) Otras variedades: Coratina, Ascolana, Leccino, Frantoio, Pendolino, Liguria, Cerignola, Empeltre (Farga). Introducidas principalmente de Italia y también del Valle de Huayco, Chile.

### **1.1.6 Composición química de la aceituna**

Tanto las características físicas como la composición química de la pulpa comestible, dependen de un cierto número de factores, entre los que destacan la variedad y el estado de madurez en la época de recolección. Como factores secundarios, pero suficientemente importantes, deben mencionarse igualmente la situación geográfica, calidad del suelo y tipo de cultivo, seco o regadío

Los principales constituyentes de la pulpa de la aceituna son el agua y el aceite, encontrándose en general que ambos componentes guardan entre sí una relación inversa para un mínimo grado de madurez. Siguen en importancia cuantitativa los hidratos de carbono, en especial los monosacáridos y oligosacáridos libres existentes en la pulpa. Se han identificado como azúcares y polioles mayoritarios, glucosa como componente principal; fructosa, manitol y sacarosa; y como azúcares minoritarios xilosa y ramnosa (Bolaños y Colbs, 1982). La fibra está constituida principalmente por celulosa, componente mayoritario, seguida por lignina y hemicelulosa. Las sustancias pécticas representan del 0,3% al 0,6% de la pulpa fresca, encontrándose principalmente ácido anhidro galacturónico, grupos carboxilos eterificados y acetilos (Fernández y Colbs, 1974, 1976).

Por su gran repercusión en los problemas de ablandamiento, se ha prestado durante los últimos años una especial atención a la presencia en el fruto de determinadas variedades de enzimas pectinolíticas, pectinesterasa, poligalacturonasa. La fracción proteica de la pulpa de aceitunas maduras oscila entre 1,5 % y 5%. Dependiendo de las variedades, desde el punto de vista de los aminoácidos constituyentes de éstas proteínas, se encuentran presentes la totalidad de aminoácidos comunes sin exceptuar los esenciales, de los cuales la arginina representa aproximadamente el 25%, seguido de leucina y valina. En términos generales, aquellos que presentan mayor proporción son: ácido aspártico, ácido glutámico y arginina. Los ácidos identificados son: ácido cítrico, málico y oxálico. El valor de pH del jugo celular varía según la variedad de 4,1 a 5,0 unidades (Fernández y Gonzales, 1986).

Cuadro 1. Características físico-químicas de la aceituna variedad Sevillana

Características	Aceituna verde	Aceituna madura
Densidad (kg/l)	1,14	1,07
Ph	4,80	5,00
Relación pulpa / hueso	6,00	8,00

Fuente: Marzano (1988)

El contenido de cenizas de la pulpa oscila entre 0,68% y 1,1%, donde el potasio es el elemento predominante, seguido del fósforo, calcio, magnesio y sodio.

Las características fisicoquímicas para la variedad Sevillana se muestra en el cuadro 1 y la composición química de la aceituna, variedad Sevillana que se produce en nuestro medio según Marzano1988, se muestra en el cuadro 2

Cuadro 2.Composición química de la aceituna variedad Sevillana

Contenido en 100 gramos de pulpa de aceituna fresca		
Componente	Aceituna verde (g)	Aceituna madura (g)
Humedad	71,83	67,54
Grasa	15,64	20,97
Proteínas(1)	1,50	1,57
Ceniza	2,28	2,36
Fibra	1,81	1,64
Carbohidratos(2)	8,60	7,36
Acidez(3)	0,74	1,08
Azúcares reductores	4,80	4,10
Taninos	2,11	1,64
Oleuropeína(4)	2,25	1,98

(1) Factor de conversión de proteínas 6,25; (2) por diferencia; (3) expresado en porcentaje de ácido cítrico; (4) Medición de absorbancia de 345 nm

Fuente: Marzano (1988)

## **1.2 Procesamiento de la aceituna verde al estilo español**

### **1.2.1 Principales insumos**

#### **1.2.1.1 Agua**

El agua utilizada en la industria alimentaria debe ser potabilizada con características de insípida, inodora y bacteriológicamente pura. En la potabilización del agua uno de los hechos más destacables de las propiedades del cloro es su gran eficiencia en dosis sumamente pequeñas. Su utilización está fundamentada en el efecto destructivo que ejerce sobre las diastasas necesarias e indispensables para la vida microbiana y su gran poder oxidante, favoreciendo la eliminación de materia orgánica. Para el procesamiento de aceitunas es necesario utilizar aguas blandas, es decir bajo contenido de carbonatos (calcio y magnesio) y además escaso contenido de hierro.

#### **1.2.1.2 Sal**

La sal actúa como preservante por su efecto osmótico y deshidratante, impide la actividad microbiana y diastásica, además actúa como elemento tóxico para una gran mayoría de microorganismos. La concentración salina necesaria para impedir el crecimiento microbiano depende del pH, del contenido acuoso, tipo de microorganismos, temperatura, composición química del sustrato y de la presencia de otras sustancias inhibidoras. La

concentración de sal en la fase acuosa es el aspecto más importante. Lo normal es que los microorganismos sean inhibidos por 3 a 10% de concentración de sal. Los bacilos mesófilos gram- negativos y los psicrófilos son inhibidos por soluciones de 4 a 10% de concentración salina (Banwart, 1982).

Debe evitarse la utilización de sal con gran contenido de calcio, magnesio y hierro. Los dos primeros originan sabores amargos y endurecimientos extremos de los tejidos de los productos, impidiendo su textura suave característica. El hierro puede ocasionar cambios de color.

#### **1.2.1.3 Soda cáustica**

Se presenta en su estado sólido, granulado y escamoso de color blanco. Debido a su tendencia de absorber humedad del ambiente conviene que el transporte y almacenamiento se realice en envases de material aislante y herméticamente cerrados. Ataca fuertemente al aluminio y al estaño, y es dañino para la piel. Su manipuleo debe hacerse con guantes de goma y si es posible con máscaras. El uso del hidróxido de sodio en alimentos incluye el lavado y pelado de productos vegetales, en el procesamiento de aceituna verde al estilo español, o para su transformación en aceituna negra.

#### **1.2.1.4 Ácido acético**

Es hidrosoluble y posee un  $pK$  de 4,76. Las principales razones para el uso del ácido acético en la preservación de los alimentos estriban en su bajo costo, su abundancia y su reducida toxicidad. El efecto inhibitor de éste ácido sobre los microorganismos es superior a lo que se podría obtener en base a su  $pH$  exclusivamente comparado con otros ácidos. El ácido acético es empleado desde hace cientos de años como ingrediente y condimento natural de la alimentación. Las prescripciones existentes en algunos países sobre vinagre y ácido acético se refieren a la diferencia entre vinagre de fermentación y ácido acético sintético. No existen diferencias toxicológicas entre el vinagre natural y el vinagre sintético (Lück, 1981).

#### **1.2.1.5 Ácido láctico**

Es un constituyente natural de varios alimentos y es formado por bacterias del ácido láctico. Según sea el sustrato y los microorganismos, el ácido láctico se cataloga como provisto de cualidades antimicrobianas muy buenas, regulares o malas (Banwart, 1982). En la industria de alimentos se usa para regular el  $pH$ , para extender la vida útil del producto, mantener y mejorar el color de alimentos, extender la vida útil del producto, mantener y mejorar el color de los alimentos.

## **1.2.2 Principales operaciones en el procesamiento de la aceituna verde al estilo español**

Los procedimientos para la elaboración industrial de la aceituna verde al estilo español varían considerablemente en cuanto a ciertos detalles, pero el proceso fundamental es esencialmente el mismo.

### **1.2.2.1 Recolección**

Las aceitunas del tipo verde, destinada a la preparación como estilo español, se recolectan cuando el fruto ha alcanzado un color verde-amarillo pajizo, y al cortarlo transversalmente alrededor de su circunferencia mayor libera limpiamente el hueso al someterlo a una ligera torsión con los dedos. Si la superficie del mismo presenta algo más que un ligero tinte rosado, aun cuando en determinadas variedades no afecte al color del producto final aderezado, indica claramente que se ha sobrepasado el óptimo de madurez con el consiguiente riesgo de encontrar deficiencias de textura en la elaboración (Fernández y Colbs, 1985).

La fruta en su mayoría se recoge a mano, siendo el mejor sistema el de ordeño, donde el obrero desde el suelo o desde escaleras apropiadas

al tamaño de los árboles, toma el fruto uno a uno y lo deposita en un recipiente apropiado que lleva colgado sobre el pecho.

### **1.2.2.2 Tratamiento con lejía**

La operación fundamental en el aderezo de aceitunas verdes, estilo español, es indudablemente el “cocido” de los frutos, esto es, su tratamiento con solución diluida de sosa cáustica. El principal objetivo del cocido es la eliminación del glucósido fenólico amargo oleuropeína. Este tratamiento con lejía ejerce una acción muy compleja sobre los frutos, siendo su consecuencia más importante favorecer el posterior desarrollo de una fermentación eminentemente láctica (Borbolla y Alcalá, 1979).

Es necesario que la penetración de la soda sea a una profundidad de  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  del espesor del pericarpio, de manera que se retenga una parte del sabor amargo y suficientes carbohidratos para la fermentación subsiguiente. El progreso de la lejía se observa con fenolftaleína que se aplica a la superficie de las aceitunas cortadas. La concentración de lejía varía de 1,8 % a 2,5%, esto dependiendo de la temperatura, madurez, textura y tamaño de la aceituna. La velocidad de penetración se incrementa con la temperatura; cuando supera los 28 °C tiende a ampollar y a reblandecer las aceitunas (Desrosier, 1986).

### **1.2.2.3 Lavados**

El lavado es la operación complementaria del “cocido”, siendo su principal objetivo la eliminación de parte de la lejía que permanece adherida a la superficie de los frutos y una parte al menos de la que penetró en su interior. Otro objetivo de gran importancia es la eliminación parcial del amargor característico, continuándose durante éste proceso la transformación de alguno de los componentes de las aceitunas, así como la eliminación de los originalmente solubles y de los solubilizados durante el cocido (Borbolla y Alcalá, 1978).

El lavado largo y enérgico elimina, las últimas trazas de amargor y casi toda la lejía, lo que facilita lo consecutivo de bajos valores de pH durante la fermentación. Sin embargo también se eliminan componentes solubles de las aceitunas como los azúcares y otras materias que son de gran importancia, en la fermentación posterior por los *Lactobacillus*. Cuando las aceitunas se lavan menos de lo conveniente, permanecen amargas durante mucho tiempo, quedando excesiva cantidad de lejía en los frutos lo que dificulta la consecución de valores de pH para una buena conservación (Cruess, 1978).

#### **1.2.2.4 Colocación en salmuera**

Una vez terminado el proceso de lavado se procede a la colocación de la salmuera. En uno y otro caso, por muy bien que se realice el escurrido, dada la gran masa de aceitunas, siempre habrá en el fondo acumulación de agua de lavado por decantación o porque fue arrastrada por la salmuera. Para evitar éste peligro, es necesario eliminar el 5% del volumen de la salmuera de dichos fondos a las 24 horas de añadida (Fernández Diez y Colbs, 1985).

La salmuera, en el momento de añadirse a las aceitunas únicamente está constituida por cloruro sódico. Sin embargo con mayor o menor rapidez, se transforma por causa de los fenómenos osmóticos, a un medio de cultivo rico a costa de los componentes que tiene el fruto. La velocidad de estas transformaciones dependerá de una serie de factores, como variedad de la aceituna empleada, tratamiento utilizado, proporción fruto/salmuera, concentración de la propia salmuera (Fernández Diez y Colbs, 1985).

La salmuera ejerce en el proceso de aderezo diversas funciones. Entre ellas: extracción de parte del jugo celular de las aceitunas y consiguiente transformación de las mismas en un verdadero medio de cultivo apto para

el desarrollo de los microorganismos de la fermentación; evita el crecimiento de gérmenes perjudiciales; contribuye al sabor y a la consistencia del fruto fermentado (Borbolla y Alcalá, 1975).

La concentración de la salmuera empleada tiene importancia excepcional. Salmueras de concentración elevada pueden producir arrugado de los frutos, y dificultar el buen crecimiento de los lactobacilos. En cambio si las salmueras no tienen la concentración adecuada pueden desarrollarse gérmenes perjudiciales y alterar la fermentación. Las concentraciones de sal utilizadas varían de acuerdo a la zona, desde 6 a 12 grados Baumé, algunas veces acidulada con ácido acético.

#### **1.2.2.5 Fermentación**

Las aceitunas fermentadas (españolas, griegas o sicilianas) se obtienen con la ayuda de la flora natural de las aceitunas que se componen de diversas bacterias, levaduras y mohos. La fermentación de las aceitunas es bastante similar a la del sauerkraut, excepto en que es más lenta, e implica un tratamiento con lejía (Jay, 1978).

La fermentación de aceituna por el método tradicional se divide en tres etapas bien definidas, que se caracteriza por un desarrollo diferente de la

población microbiana, consecuentemente por un cambio de las características fisicoquímicas de la salmuera (Fernández Diez y Colbs, 1985).

- a) Primera etapa: Considerada de fundamental importancia, porque en el transcurso de la misma, la salmuera añadida al inicio se convierte en un medio de cultivo apto para el desarrollo de los microorganismos (Gonzales Cancho, 1975).

Los bacilos Gram negativos se consideran los más característicos e importantes por el desarrollo que experimentan en ésta fase. En general se trata de gérmenes poco exigentes en sus necesidades nutritivas, por lo que pueden crecer en medios de cultivos relativamente sencillos y con elevado pH (Fernández Diez y Colbs, 1985).

La importancia que tienen los bacilos gram negativos en éste proceso fermentativo se puede basar en lo siguiente:

- Su presencia es constante en las dos primeras fases de la fermentación.

- Algunas especies forman anhídrido carbónico e hidrógeno en su metabolismo, pueden producir la alteración conocida con el nombre de “alambrado”.

Entre las bacterias cocáceas, los géneros que pueden tener mayor incidencia en éste proceso fermentativo corresponden a *Pediococcus* y *Leuconostoc*, bacterias lácticas tolerantes a cantidades relativamente pequeñas de ácido láctico. Su presencia en la fermentación se puede considerar normal, y juntamente con los bacilos gram negativos, descienden el pH de la salmuera a valores adecuados para el posterior desarrollo de los *Lactobacillus*. El género más representativo es el *Leuconostoc*, principalmente el *L. mesenteroide*, que es una bacteria heterofermentativa (Muller, 1981).

Las bacterias heterofermentativas originan como producto de la fermentación un 50% de ácido láctico, un 30% de ácido acético o etanol y un 17% de CO<sub>2</sub>. Como las especies heterofermentativas no sintetizan ni aldolasa ni triosa fosfato isomerasa, no pueden llevar a cabo la degradación preliminar de los azúcares siguiendo la recta de la fructosabifosfato, como hacen las bacterias homofermentativas. Esta primera etapa concluye cuando comienza el fuerte desarrollo de los lactobacilos.

- b) Segunda etapa: El segundo periodo comprende la completa desaparición de los bacilos gram negativos, la salmuera en condiciones normales de fermentación alcanza valores de pH alrededor de 4,5 unidades (De la Borbolla y Alcalá y Gonzales Cancho, 1975).

Las bacterias lácticas Cocáceas, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, que pueden desarrollarse al principio de ésta fase, disminuyen también debido a su competencia con los lactobacilos (Fernández Diez y Colbs, 1985).

El gran desarrollo de lactobacilos en ésta fase, incrementa la producción de ácido, ocasionando el descenso del pH, sin que exista una verdadera correlación entre éste descenso y la acidez producida debida a la salida de sales orgánicas de la aceituna a la salmuera, proceso que no se completa hasta los 20-25 días. Dentro de los lactobacilos que tienen mayor incidencia en la fermentación corresponde al *Lactobacillus plantarum*. El 95% corresponden a ésta especie, el 10% al *L. delbbreucki*, ambas especies lácticas homofermentativas (Fernández Diez Y Colbs, 1985).

b) Tercera etapa: En ésta fase de la fermentación continúan desarrollándose los lactobacilos en abundancia, siendo los únicos microorganismos que deben dominar en la población bacteriana. Como consecuencia de éste crecimiento, la acidez sigue aumentando más o menos rápidamente, hasta que cesa la producción de ácido por agotamiento de la materia fermentable. En ésta etapa se da por concluida la fermentación de aceituna, durante ésta fase el pH llega y se estabiliza a 4 unidades o menos (Fernández Diez y Colbs, 1985).

La temperatura, la concentración de sal y la exclusión de aire, son los principales factores que influyen en el curso de la fermentación especialmente las condiciones de anaerobiosis. La temperatura óptima de fermentación oscila entre 25 °C y 28°C, aunque a temperaturas de 15°C da lugar a una fermentación lenta con retraso apreciable en su iniciación, pero, que alcanza finalmente los mismos valores de acidez libre que los testigos mantenidos a 25° C. Para temperaturas tan bajas como 5-7°C, no se aprecia desarrollo después de un largo periodo de mantenimiento por más de 200 días (Fernández Diez y Colbs, 1985).

El control de la marcha de la fermentación se realiza la determinación, a intervalos regulares, de ciertas características químicas y fisicoquímicas como son:

- \* Acidez libre y pH, como máximos exponentes de la marcha de la fermentación.

- \* Acidez combinada, por su estrecha correlación con las anteriores características y por información que suministra sobre la forma en que se han realizado las operaciones de cocido y lavados.

- \* Azúcares reductores, al principio por su indicación del grado de acidez que se puede alcanzar y al final para saber si ha terminado la fermentación.

- \* Concentración de sal, por su influencia en la marcha de la fermentación, al incidir en el desarrollo de los Lactobacilos y en la inhibición de ciertas alteraciones en la cuarta fase.

En la figura 3 se muestra la marcha de la fermentación de aceituna verde al estilo español evaluando el pH y la acidez libre expresada en porcentaje de ácido láctico, ya que éstos son los

indicadores de la marcha de la fermentación. También se observa la curva de la concentración salina y sus respectivos remontajes, por la importancia que tiene en el desarrollo de los lactobacilos.

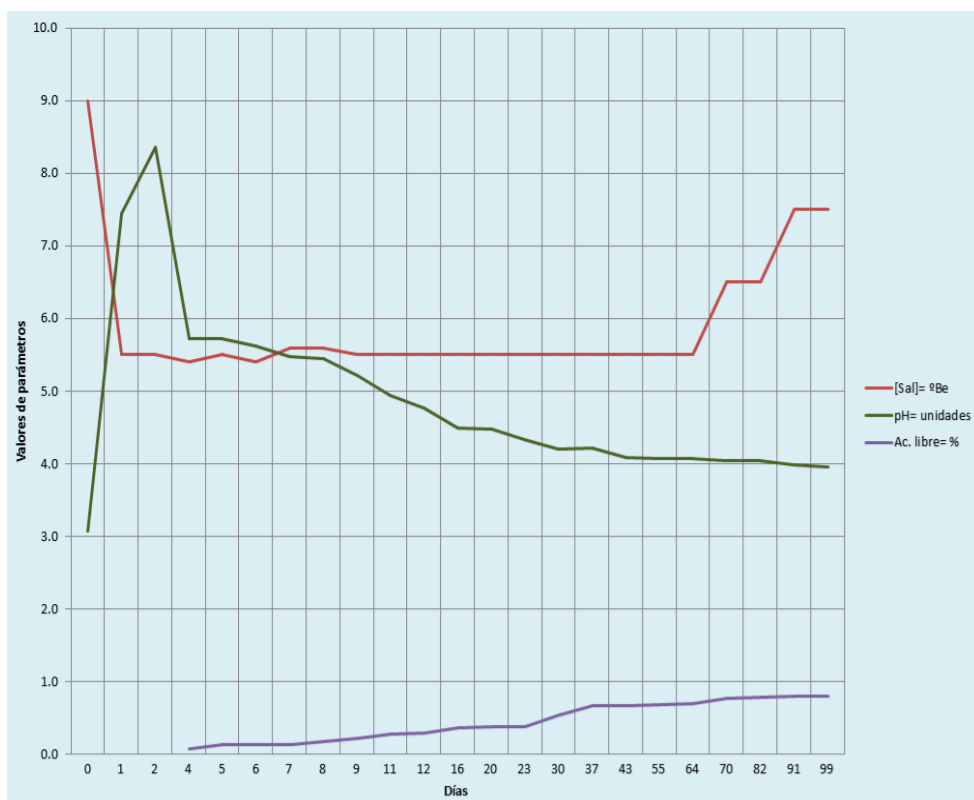


Figura 3. Evolución de la fermentación de la aceituna verde al estilo español  
Fuente: Miranda (2010)

### 1.2.3 Principales alteraciones microbianas en la fermentación de aceituna verde al estilo sevillano

El proceso de fermentación de aceitunas verdes es típicamente fermentativo, si este no sigue su curso normal se pueden desarrollar otros microorganismos que provoquen ciertas alteraciones.

- a) Alambrado: Conocido también como “fish eye”. Su característica principal es la formación de fisuras directamente bajo la piel de aceituna. Se trata de una fermentación característica de la primera fase debida a la acción de los bacilos gram-negativos productores de anhídrido carbónico e hidrogeno, tenemos a los géneros Enterobacter, Citrobacter, Klebsiela, Escherrichia y Aeromonas (West y Colbs, 1941)
- b) Fermentaciones pútridas: La característica principal de esta alteración es el olor desagradable que presenta la salmuera y el sabor que adquieren las aceitunas, que recuerda al de la materia orgánica en descomposición. Esta fermentación se produce, por el desarrollo de bacterias de forma bacilar que pertenecen al género Clostridium. Son microorganismos que forman endosporas, anaerobios estrictos, por lo que su desarrollo tiene lugar en el fondo de los fermentadores.
- c) Fermentaciones butíricas: Esta alteración se produce con frecuencia durante las dos primeras fases de fermentación donde los azucres y las demás materias fermentables son muy

abundantes. La característica de ésta fermentación es un olor a manteca rancia, a medida que avanza la alteración, el olor se asemeja a las fermentaciones pútridas. Esta fermentación se debe a la presencia de diferentes especies del genero Clostridium.

- d) Zapatería: Se caracteriza ésta fermentación porque comunica a la aceituna un sabor y olor desagradable. Los responsables de ésta alteración se deben generalmente a bacterias que pertenecen a los géneros Clostridium y Propionibacterium.

Las especies de microorganismos del genero Clostridium y Propionibacterium causantes de las alteraciones pútridas, butíricas y zapatería son: Clostridium sporógenes, Clostridium lituseburens, Clostridium limosum, Clostridium aerofoetidum, Clostridium nauseum, Propionibacterium jensenii, Propionibacterium acidi-propionioi, Propionibacterium s.p. (Gonzales Cancho y colaboradores, 1973, 1980).

### **1.3 Bacterias lácticas**

Normalmente se les considera como un grupo de bacterias que se caracterizan por una gran producción de ácido láctico. La proporción

elevada de ácido láctico en los productos de fermentación anaerobia de los azúcares transforman lactosa en ácido láctico, es el principal carácter bioquímico que justifica la integración dentro de un mismo grupo de bacterias que presentan grandes diferencias en su morfología (Orla-Jansen citado por Alais - 1995).

Algunas bacterias lácticas atraviesan el tracto intestinal a pesar de la acidez gástrica y la toxicidad de la bilis, esto es fundamental para poder ofrecer cualquier beneficio biológico a nuestro cuerpo. Las bacterias lácticas se han empleado para fermentar o crear cultivos de alimentos durante al menos 4 milenios. Su uso más corriente se ha aplicado en todo el mundo a los productos lácteos, como el yogurt, el queso, la mantequilla, la crema de leche y a los vegetales fermentados como las aceitunas, encurtidos, sauerkraut, etc. El microorganismo encargado de la fermentación de aceitunas es el *Lactobacillus plantarum* (Alais, 1995).

### **1.3.1 Genero Lactobacillus**

Los lactobacilos, según los productos de fermentación de azúcar, se dividen en dos grupos.

a) Homofermentativo: Convierte completamente el azúcar fermentado

en ácido láctico. Para la degradación de los azúcares utiliza la ruta de Embden –Meyerhof de la glucólisis en la fermentación del ácido láctico, la vía en su totalidad es Homoláctica porque el único producto final que se forma es ácido láctico, no existe producción de CO<sub>2</sub>.

b) Heterofermentativo: Este grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen principalmente el ácido láctico y además cantidades importantes de otros productos como bióxido de carbono, etanol, ácido acético, diacetilo, etc. Para la degradación de los azúcares utiliza la ruta de las pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos.

### **1.3.2 Características generales de los lactobacilos**

Los lactobacilos son barra-formados, gram-positivo, catalasa negativa fermentante, su metabolismo es aerotolerante, su crecimiento óptimo se alcanza en condiciones microaerófilas o anaeróbicas, resiste bien a pH ácidos (hasta pH de 3,5). Son rectos, aunque pueden presentar formas espirales o cocobacilares bajo ciertas condiciones. Los lactobacilos se clasifican como bacterias del ácido láctico, y derivan casi toda su energía de la conversión de la glucosa al lactato durante la fermentación homoláctica. En este 85-90% de proceso del azúcar utilizado se convierte al ácido láctico. Tienen un tiempo de generación el extenderse a partir de

25 minutos a varios cientos de minutos, y crecen óptimos entre las temperaturas de 30 y 40 grados centígrados, aunque las tensiones termofílicas pueden ser cómodas en las temperaturas de hasta 45 grados centígrados. También se asocian comúnmente al aparato gastrointestinal de animales y de seres humanos.

### **1.3.3 Lactobacillus plantarum**

El *Lactobacillus plantarum* es un miembro extenso del género lactobacilo, encontrado comúnmente en el sauerkraut, las salmueras, las aceitunas curadas en salmuera, etc. Este microorganismo es homofermentativo que no forma gas. Son bacilos cortos inmóviles, miden  $0,8 - 1,0 \times 3 - 8 \mu$  y se encuentran aislados o en cadenas cortas. Son gram-positivos, muy resistentes a la sal común, que solo se inhibe a una concentración superior al 12%, crece en  $15^\circ\text{C}$  pero no en  $45^\circ\text{C}$ , Su temperatura óptima se encuentra entre  $28^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ . Durante la fermentación produce ambos isómeros del ácido láctico (D y L) (Müller, 1981). La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el desarrollo de bacterias dañinas para la salud. Algunas especies de *Lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogur y otros alimentos fermentados como la aceituna. En la figura 4, se muestra al *L. plantarum*.



Figura 4. *Lactobacillus plantarum*  
Fuente: Pro-microbe (2009)

#### 1.3.4 Clasificación científica del *Lactobacillus plantarum*

Según Bergey 1923, la clasificación científica del *Lactobacillus plantarum* es la siguiente:

- Reino : Bacterias
- División : Firmicutes
- Clase : Bacilos
- Orden : Lactobacillales
- Familia : Lactobacillaceae
- Género : Lactobacillus
- Especie : *Lactobacillus plantarum*

#### **1.4 Papel de las bacterias lácticas en la fermentación de la aceituna de mesa**

Las bacterias lácticas en la fermentación de aceitunas son ventajosas. Sin embargo, en la actualidad, todos los tipos de procesos fermentativos de aceituna de mesa son todavía espontáneos. En general el control de las condiciones fisicoquímicas es a veces suficiente para conseguir un producto adecuado. El alcance de crecimiento de bacterias lácticas, sin embargo, depende de las condiciones de fermentación y las restricciones impuestas por la composición de la aceituna.

Afortunadamente, las bacterias lácticas y especialmente el *Lactobacillus plantarum*, pueden crecer y producir ácido láctico hasta en 8%(w/v) de NaCl, resisten pH y acidez (Noureddine, 1998).

La tolerancia a estas condiciones se representa en la inhibición de bacterias gram-negativas y otros organismos anaerobios que pueden ocasionar alteración fétida en la salmuera. Las bacterias lácticas juegan un papel importante produciendo el ácido necesario para el almacenaje óptimo del producto y, comúnmente éste microorganismo termina la fermentación.

### **1.5 Utilización de cultivos lácticos en la fermentación de aceitunas**

En distintos procesos fermentativos se incluyen como una etapa fundamental de los mismos, la inoculación de la materia prima con cultivos iniciadores de organismos idóneos para dirigir la fermentación. (Fernández Diez y Colbs, 1985).

En una fermentación espontánea modelo, las bacterias lácticas, los lactobacilos, llegan a ser la flora predominante al final del proceso, pero el desarrollo de una fermentación de éste tipo es imposible de predecir debido a una serie de factores internos y externos como: el tipo de fruto, porque condiciona la disponibilidad de nutrientes necesarios, el proceso utilizado, la climatología, tanto durante el crecimiento del fruto como durante la fermentación, y la flora bacteriana presente inicialmente en el fruto. Todos estos factores permiten asegurar que el uso del cultivo, si bien no estrictamente necesario en las condiciones de fermentación va a permitir “conducir”, pasando de ésta manera a ser un proceso espontáneo e incontrolado a ser un proceso dirigido y controlable (Roig y Hernández, 1991).

En una fermentación por inoculación de *Lactobacillus plantarum* se acorta la primera y segunda fase de fermentación natural, siendo ésta

eminentemente láctica de inicio a fin, disminuyendo el riesgo de que se produzcan alteraciones. Para determinar las condiciones óptimas, Ruiz Barba y Rufino Jiménez Días en un trabajo de investigación realizado en el Departamento de Biotecnología de los Alimentos, instituto de la grasa (Sevilla, 2001), para la implantación correcta del cultivo iniciador recomiendan evaluar las variables como el pH inicial de las salmueras y el ácido utilizado para bajarlo, la concentración de cloruro de sodio de las mismas, la concentración del inóculo.

La cantidad necesaria para garantizar una población inicial mínima de lactobacilos, al comienzo de la fermentación de la aceituna es superior a  $10^6$  cel/ml de salmuera. El momento idóneo de adición es después de añadir las aceitunas al fermentador o incluso un día o dos en caso de que no se añada un suplemento nutritivo (Roig y Hernández, 1991).

Las condiciones fisicoquímicas iniciales de las salmueras de fermentación constituyen un conjunto de variables muy importantes a tener en cuenta para una implantación correcta del cultivo iniciador. Puesto que la fermentación de aceitunas verdes al estilo español es un proceso abierto en el que no se puede esterilizar el material de partida (Ruiz y Jiménez, 2001).

Entre las ventajas que pueden obtenerse mediante el uso de microorganismos, cabe destacar las siguientes: obtener un producto uniforme, reduce el tiempo de fermentación, disminuir la concentración salina y asegura una fermentación láctica de principio a fin reduciendo la probabilidad de que se manifieste una fermentación indeseable. Entre los inconvenientes de su uso cabe destacar el ligero incremento del costo y el mayor control que debe tenerse sobre el proceso, a fin de garantizar la correcta utilización del cultivo (Roig y Hernández, 1991).

## **1.6 Parámetros en la fermentación de aceitunas verdes al estilo español**

### **1.6.1 Acidez Libre**

Es un concepto que indica el contenido de ácidos grasos orgánicos libres de combinación con la soda residual presente en la salmuera, siempre que se haya establecido el equilibrio aceituna -salmuera en una muestra de aceituna. La acidez libre se expresa en función al ácido predominante, en éste caso la fermentación de aceitunas es eminentemente láctica. Según Heid y Joslyn (1967) un ácido es una sustancia capaz de ceder iones hidrogeno ( $H^+$ ) en soluciones acuosas.

### **1.6.2 Acidez combinada**

Es un concepto que indica la cantidad de iones  $H^+$  combinado con los iones  $OH^-$  provenientes de la soda residual. La acidez combinada suministra información sobre la forma en que se han realizado las operaciones de cocido y lavados. Se deben manejar valores inferiores de 0,140 N de acidez combinada.

### **1.6.3 pH**

El pH es el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno, es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. La escala de pH típicamente va de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7 (el valor del exponente de la concentración es mayor, porque hay más iones en la disolución) y alcalinas las que tienen pH mayores a 7. El  $pH = 7$  indica la neutralidad de la disolución (cuando el disolvente es agua). El pH es un factor que determinan la supervivencia y el crecimiento de microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución. Como el efecto de algunos otros factores depende en parte del pH, es a veces difícil separar el efecto del pH por sí mismo y el de otros factores influidos por el pH. La determinación del pH es uno de los procedimientos analíticos más importantes y más usados en ciencias tanto como química, bioquímica.

#### **1.6.4 Fermentación controlada**

La fermentación controlada consiste en no esperar a que la microbiota natural contamine los alimentos y se multiplique en ellos, sino en añadir cultivos controlados. A este grupo de microorganismos se les conoce técnicamente como microorganismos “estárter”. Exentos de patógenos y de microorganismos extraños que perjudiquen a este proceso biológico natural. De esta forma se consigue un producto homogéneo, seguro y estable (Rodríguez, 2005).

#### **1.6.5 Fermentación ácido-láctica**

La fermentación ácido láctica es aquella que se lleva a cabo por las bacterias ácido lácticas cuya actividad se desarrolla en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), y se manifiesta en la transformación de los azúcares presentes en el vegetal, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. (Castillo, 2004).

### **1.7 Metodología de superficie de respuesta (MSR)**

Es una técnica que ha sido aplicada con éxito en trabajos científicos de análisis y en la optimización de procesos alimenticios, y consiste en un

grupo de procedimientos matemáticos y estadísticos que son usados para estudiar la relación entre una o más respuestas (variable dependiente) y un número de factores (variables independiente). Usando esta técnica para los ensayos experimentales, es posible estimar los efectos principales de las variables en la respuesta o variable dependiente. (Catarina, 2008).

#### **1.7.1 Diseño Box-Behnken**

Estos diseños se forman combinando factoriales  $2k$  con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser más eficientes en términos del número de corridas requerido. Además, son rotables (o casi rotables) y hace la estimación de los coeficiente de primer y segundo orden más eficiente. (Catarina, 2008).

#### **1.7.2 Optimización**

Los métodos de optimización dependen de la relación o modelo entre los factores y la respuesta; si es una relación definida en forma mecánica se tienen métodos analíticos, si está definida casuísticamente se tienen métodos estadísticos. En el caso que la función sea casuística (aproximada) se aplican los métodos de optimización estadística tales como el gráfico convencional, el gráfico mejorado, la función deseada y el

procedimiento de respuesta de superficie extendida. El método de la función deseada es una técnica analítica desarrollada para la optimización de sistemas de múltiples factores y múltiples respuestas. Cada respuesta ( $y_n$ ) se estandariza en funciones deseadas  $d_n$  del tipo:

$$d_n = h_n(y_n)$$

y el valor de  $d_n$  incrementa de 0 (mínimo) a 1 (máximo) cuando la respuesta asociada se aumenta. Un alto valor de  $d$  indica las mejores funciones deseadas del sistema, lo que se traduce en soluciones óptimas de dicho sistema (Aguirre ,2005).

## **CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Lugar de ejecución**

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones de la Empresa Olivícola SILPAY, ubicada en la ciudad de Tacna. Los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales, se desarrollaron en los Laboratorios de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **2.2 Materia prima e insumos**

#### **2.2.1 Materia prima**

Fueron utilizadas aceitunas verde de la variedad Sevillana (*Olea europea* sativa Hoffg, Link) con madurez óptima para el procesamiento de aceituna verde al estilo español, procedentes de La Yarada.

#### **2.2.2 Insumos**

Los insumos utilizados para el procesamiento de aceituna verde al estilo español, mediante una fermentación por inoculación de *Lactobacillus* fueron los siguientes:

- Cultivo láctico: Cultivo EPSA: 1000520102EP, liofilizado de cepa mixta de *Lactobacillus plantarum* RJL2 y *Lactobacillus plantarum* RJL3. Las especificaciones del cultivo láctico utilizado se muestra en el anexo 1.
- Agua: Se utilizó agua potable de la red pública, el cual se almacenó en tanques de fibra de vidrio, luego se cloró con 80 ml de clorex comercial por cada 1000 l de agua.
- Sal: Se utilizó sal industrial en grano, producida por EMSAL con un 99% de pureza.
- Soda cáustica: Se utilizó soda en microperlas, producida por Solvay (Francia) con un 99% de pureza.
- Ácido acético: Se usó el ácido acético glacial de 99% de pureza, producida por Dan química (Ecuador).
- Cloro: Se utilizó la marca Clorox que tiene 5% de cloro activo.

## **2.3 Materiales y Equipos**

### **2.3.1 Materiales utilizados para el proceso**

- Tanques de fibra de vidrio: Se utilizó tanques de 70 kg de capacidad, son tanques cerrados con una tapa provista de una rejilla con abertura en la parte superior en el centro que sirve para

realizar los requeridos de salmuera y la evacuación de los gases producidos por la misma fermentación (ver anexo 2, figura a).

- Tanques de preparación de soluciones: Son tanques abiertos de fibra de vidrio de 500 litros de capacidad, se utiliza para la preparación de soluciones de soda y salmuera (ver anexo 2, figura b).
- Bomba de agua: Se utiliza para el manejo de soluciones como la soda, agua, salmuera. Modelo FMI- 1L serie 87123555 potencia 0,5 HP, caudal 100 l/min (ver anexo 2, figura c)).
- Balanza: Balanza electrónica (ver anexo 2, figura d)).

### **2.3.2 Equipos de laboratorio**

- Balanza analítica; marca METLER AS 150± 0,1 mg de sensibilidad.
- Centrífuga analítica; Marca Fanem, Hungary, tipo LSZ-49 ILZ, 3000pm, 0,4 Kw.
- Cocina eléctrica (themolynetype) 2200-USA
- Estufa; marca Memmert, rango de temperatura 0-20 °C.
- Equipo extractor de grasa Soxhlet, de seis hornillas, LABINE.
- pH-metro digital; marca Corning PS-32 rango 0,00-14 unidades, fabricación canadiense.

- Densímetro de 0 a 10° Baumé; marca Ambrus N° 3114, fabricación chilena
- Mufla; marca Thermolyne Type 1500, rango de temperatura 0-1200 °C
- Autoclave con termómetro y manómetro, WS2-84-64, serie 1411
- Incubadora; marca MEMMERT, Temperatura de 0-70 °C
- Baño María; marca J.P.Slecta SA. Temperatura 0-100 °C
- Refrigeradora; marca Faeda, de ¼ Hp, termostato doble función.
- Contador de colonias
- Jarra de anaerobiosis
- Espectrofotómetro UV

### **2.3.3 Reactivos**

- Éter de petróleo
- Sulfato de potasio
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido sodio
- Ácido bórico
- Indicadores fenolftaleína, rojo de metilo y azul de bromotimol.
- Ácido acético glacial

- Agua peptonada
- Agar rogosa SL (CONAN)
- Agar patata
- Agar VRBA
- Agua destilada

\* Todos los reactivos usados fueron de pureza analítica

#### **2.3.4 Materiales de laboratorio**

- Picetas de agua destilada
- Pipetas volumétricas de 0,5 – 10 ml
- Probetas de 50 ml – 200 ml
- Termómetro de mercurio de -15° C a 150 °C
- Tubos de ensayo
- Baguetas
- Papel filtro
- Mechero de alcohol
- Mechero Bunsen
- Material para evaluación sensorial
- Vasos precipitados
- Placas Petri
- Láminas portaobjeto

## **2.4 Metodología**

### **2.4.1 Análisis de la materia prima**

Se realizó análisis físicos y químicos a la aceituna verde (*Olea europaea* sativa Hoffg, Link) variedad Sevillana.

- Índice de Madurez (Según NTP 209.098:2005)
- Tamaño de la aceituna, (Norma de Codex Alimentarius, 1981)
- Relación pulpa – hueso (Método de Loussert y Brousse)
- Determinación del pH, Método potenciométrico. (Federación Internacional de Producteurs de Jus de Fruits, 1968)
- Análisis proximal a la aceituna

El análisis proximal se realizó en muestras por duplicado, siendo los siguientes:

- Humedad: Se determinó en estufa a 105 °C hasta peso constante (método por pérdida de peso) A.O.A.C. 1981.
- Proteínas: Fueron evaluadas por el método de micro destilador Kjendahl de la A.O.A.C. (1981), utilizando el factor 6,25.

- Materia grasa: La determinación se realizó por el método Soxhlet, según las recomendaciones del método de la A.O.A.C. (1981).
- Cenizas: Método por calcinación según las recomendaciones del método de la A.O.A.C. (1981).
- Carbohidratos: Método por diferencia, restando de 100 el contenido de humedad, proteína, grasas y cenizas) A.O.A.C, 1981.

#### **2.4.2 Análisis fisicoquímico de la salmuera en fermentación**

Durante el proceso de fermentación se realizaron los siguientes análisis para evaluar la marcha de la fermentación.

- Evaluación del pH, Método potenciométrico. (Federación Internacional de Producteurs de Jus de Fruits, 1968)
- Acidez Libre, Método por titulación con hidróxido de sodio 0,1 N. (Federación Internacional de Producteurs de Jus de Fruits, 1968).
- Determinación de la acidez combinada (Valoración potenciométrica)
- Determinación de azúcares reductores (Método de Somogy-Nelson)
- Determinación de NaCl de la salmuera (Método densimétrico)

### **2.4.3 Identificación y caracterización del cultivo láctico utilizado**

Al final del proceso de fermentación se tomó una muestra de salmuera del tanque en el que se obtuvo los mejores resultados de fermentación de acuerdo a la investigación y se procedió a realizar una siembra en placa utilizando como medio de cultivo al Agar Rogosa. Se seleccionó las placas que presentaban un recuento de de 30 a 300 colonias con características, típicas del *Lactobacillus*, según el método de recuento (Moreno, B y Col., 2000).

Se aislaron colonias y se procedió a realizar la identificación y caracterización de la especie *Lactobacillus plantarum*.

- Morfología y tinción por el método de Gram; se seleccionó una colonia característica de lactobacilos y se realizó un frotis en un portaobjeto y se procedió a teñirlas en primer lugar con violeta de genciana (durante tres minutos) y posteriormente se trató con solución de yodo (durante tres minutos). A continuación se decoloró con alcohol-acetona (tres partes de alcohol y una de acetona) se procedió a lavar con agua para luego agregar fuccina básica o safranina (durante un minuto). Una vez fijada la muestra se observó al microscopio.

- Prueba de la catalasa; se emulsiona una colonia en 0,5ml de una solución al 1% de tween 80 en un tubo con tapa rosca, se procedió a añadir 0,5 ml de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes y se tapa. Esta prueba se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa dando agua y oxígeno, manifestándose éste último por la aparición de burbujas. Resultado negativo a ésta prueba por la ausencia de producción de burbujas.
- Tolerancia al cloruro de sodio; la tolerancia de las bacterias a la sal, se evaluó en caldo MRS suplementado con 7 y 10 % de cloruro de sodio, respectivamente. El medio preparado y previamente esterilizado en autoclave, se incubó durante 4 días a 32 °C.
- Tolerancia a pH de 3,9; el crecimiento del cultivo a pH 3,9 se evaluó en caldo MRS cuyo pH se ajustó a 3,9 con ácido clorhídrico 1 N. El medio preparado y previamente esterilizado en autoclave, se incubó durante 5 días a 32 °C.
- Prueba de fermentación y asimilación de la glucosa, maltosa manitol, galactosa, lactosa y sacarosa; se realizó con el medio base de fermentación de azúcares. Se incubó las muestras a 32 °C

durante cuatro días. Para evaluar la producción de CO<sub>2</sub> a partir de la asimilación de azúcares, se procedió introduciendo campanas de Durham en tubos conteniendo el medio; también se pudo observar mediante una cinta de pH el descenso del mismo debido al consumo de los carbohidratos.

#### **2.4.4 Evaluación sensorial**

La evaluación sensorial se realizó a los 90 días de iniciada la fermentación, cuando las variables respuesta acidez libre y pH se estabilizaron, es cuando se da por finalizada la fermentación. Se realiza la evaluación sensorial para observar la diferencia significativa entre cada tratamiento.

Se evaluaron el color, sabor y textura del producto terminado. Para ello se sirvió pequeñas porciones de aceituna fermentada y fueron evaluados por panelistas seleccionados con conocimientos en el procesamiento de aceituna verde al estilo español, se aplicó el test Hedónico, respectivamente, de 1 a 9 puntos. Los resultados fueron analizados con el programa Statistica 5.0. Los formatos empleados para evaluar el color, sabor y textura, se muestran en los Anexos 3, 4 y 5 respectivamente.

## **2.5 Diseño experimental**

### **2.5.1 Procedimiento activación del cultivo Láctico Liofilizado**

- a) Salmuera madre: Para la activación del cultivo láctico liofilizado se utilizó como medio una salmuera madre en la primera etapa de fermentación (6 días) siendo este un medio rico en azúcares y nutrientes necesarios para la activación del cultivo liofilizado para ser utilizado en la investigación
  
- b) Estandarización: Se procedió a estandarizar la salmuera madre a niveles de concentración de cloruro de sodio de 6 °Bé y a un pH de 5,5 unidades, utilizando el ácido acético glacial de 99 % de pureza.
  
- c) Acondicionamiento en frascos: Una vez estandarizada la salmuera con las características fisicoquímicas deseadas es que se procede al acondicionamiento en frascos de vidrio utilizando 30 frascos según el diseño experimental con sus respectivas repeticiones, al cual le añadimos 500 ml de salmuera a cada frasco.
  
- d) Pasteurizado: Se procede a la pasteurización sometiendo a los frascos a una temperatura de 80 °C durante 15 minutos.

- e) Enfriado: enfriamos los frascos conteniendo la salmuera a 28 °C para luego proceder a la adición del cultivo láctico liofilizado previamente pesado en una balanza analítica a cada uno de los frascos codificados de acuerdo al delineamiento experimental, siendo los niveles de 0,132, 0,22 y 0,308 (g/100 Kg de muestra de aceituna).
  
- f) Incubado: Según las especificaciones del cultivo, el incubado se realizó en una incubadora a una temperatura constante de 28 °C durante 6 horas.
  
- g) Inoculación en tanques de fermentación: Una vez activado el cultivo láctico liofilizado se procede con mucho cuidado de no contaminar el cultivo a la inoculación en los tanques de aceituna en estudio previamente acondicionados según el diseño experimental.

En la figura 5 se muestra el flujo de activación del cultivo Lactico liofilizado del *Lactobacillus plantarum*

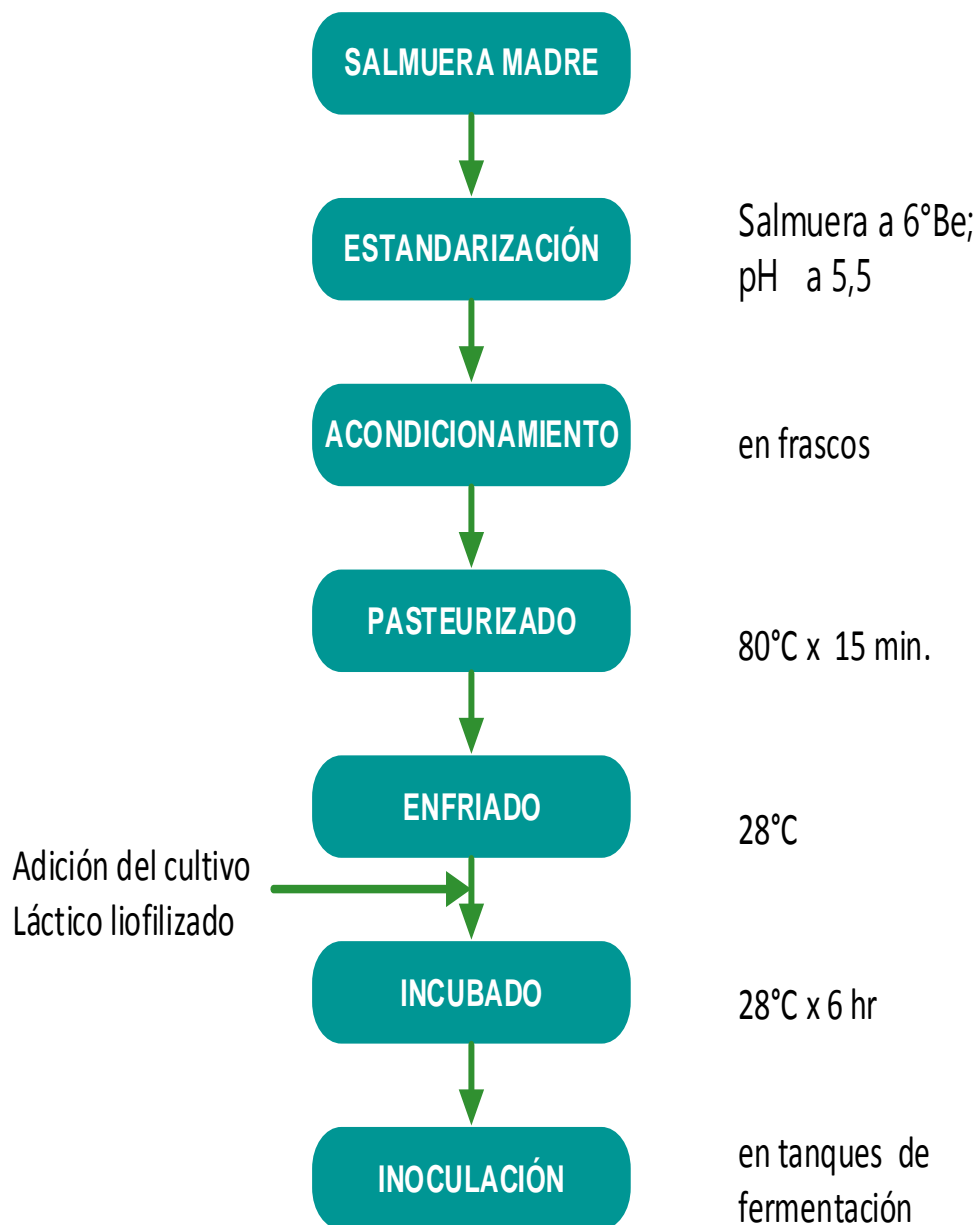


Figura 5. Activación del cultivo Láctico Liofilizado de *Lactobacillus plantarum*  
Fuente: Elaboración propia (2008).

### **2.5.2 Procesamiento de aceitunas con cultivo láctico**

Para el procesamiento de aceituna verde al estilo Español se siguió el flujo del diseño experimental mostrado en la Figura 6, el cual consistió de las siguientes operaciones.

- a) **Materia prima:** Para la realización de la investigación se utilizó aceituna verde variedad Sevillana (*Olea europaea sativa*, Hoffg, Link), procedente de la Yarada, los frutos se cosecharon antes del envero, cuando éste alcanzó una coloración verde amarillo pajizo (NTP 209.098:2006) y, al cortarlo transversalmente alrededor de su circunferencia mayor, ésta libera limpiamente el hueso al someterlo a una ligera torsión con los dedos. En el anexo 6 se muestra al fruto del olivo variedad sevillana.
  
- b) **Recolección:** La recolección se realizó a mano, por el método de ordeño, colocando los frutos en capachos de fibra de vidrio de 5-8 kg de capacidad, y luego son colocadas en jabas plásticas ranuradas de 24-26 kg de capacidad aproximada.
  
- c) **Recepción y clasificación:** Una vez que llegó la aceituna del campo, se procedió a pasarla por una máquina clasificadora con la finalidad de

tener un tamaño de muestra estándar. Se utilizó el calibre 160-200 unidades por kilogramo de aceituna.

- d) Pesado: Una vez obtenida la muestra de aceituna de tamaño estándar, se procedió a pesar en una balanza electrónica. Cada uno de los experimentos tiene un peso de 70 kg netos de aceituna.
- e) Acondicionamiento: Las muestras ya pesadas se acondicionaron en sus respectivos tanques de procesamiento.
- f) Tratamiento alcalino: Después que la aceituna fue puesta en los tanques, previamente lavados y acondicionados, se añadió la solución de NaOH al 2%, se esperó a que penetre en la aceituna a una profundidad de  $\frac{3}{4}$  partes de la pulpa; la penetración se controló visualmente realizando un corte longitudinal tangencial al hueso de la aceituna.
- g) Lavados: Los lavados se realizaron con agua potable previamente clorada, éstos fueron enérgicos con la finalidad de eliminar la soda adherida a la superficie de los frutos y una parte al menos de la que

penetro en su interior. Se realizaron 2 lavados; L1: lavado corto de 4 a 6 horas y seguidamente el L2: lavado prolongado de 12 a 14 horas.

- h) Dosificación de salmuera: Después del último lavado se colocó la salmuera preparada en los respectivos tanques. De acuerdo al delineamiento experimental los niveles de concentración de cloruro de sodio fueron: 4°Be, 6°Be y 8°Be. En el anexo 7, se muestra la conversión de grados Bé a Porcentaje % en la preparación de la solución de salmuera utilizada en la investigación.
- i) Eliminación de fondos alcalinos: Se elimina el 5% V/V del volumen total de la salmuera al segundo día de colocada la misma
- j) Ajuste de pH: Se procedió a ajustar el pH de la salmuera con ácido acético de uso industrial. De acuerdo al delineamiento experimental los niveles de pH son: 4; 5,5 y 7.
- k) Dosificación de cultivo: La aceituna tratada anteriormente se inoculó con el cultivo láctico activado. En la figura 5 se puede observar el flujo de activación del cultivo láctico. De acuerdo al delineamiento experimental para la concentración de cultivo se tomaron 3 niveles

expresado en (g/100 kg de aceituna): 0,132; 0,22 y 0,308 que corresponden al recuento en placa de  $3,5 \times 10^3$ ;  $24 \times 10^3$  y  $43 \times 10^3$  ufc/ml respectivamente.

- l) Fermentación: La fermentación de aceitunas es una etapa muy importante en las cuales se debe de controlar el pH y acidez libre, a fin de hacer un seguimiento de la evolución de la fermentación en cada uno de los tratamientos. A los 30 días de fermentación se realizó una recirculación de la salmuera y a la vez la corrección de la misma, incrementando la concentración de NaCl para llevar de nuevo a los niveles establecidos según el diseño. Se realizó un seguimiento de la fermentación durante 3 meses.

### **2.5.3 Diseño Experimental**

Para estudiar los efectos de la concentración NaCl (°Be), pH de inoculación y concentración de cultivo (g/100 kg de aceituna) fue utilizado el diseño de Box- Benken. Las variables fueron establecidas con tres niveles codificados como -1, 0, +1. Los valores reales y amplitudes entre niveles de cada variable que se muestran en el cuadro 3, fueron establecidos en base del marco teórico del presente trabajo.



Figura 6. Flujograma experimental en el procesamiento de aceituna verde al estilo español con inoculación de cultivo láctico.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

Cuadro 3. Niveles de las variables independientes estudiadas en la determinación de los mejores parámetros de proceso

VARIABLES	Niveles de Variables		
	-1	0	+1
X1: Concentración de NaCl (°Bé)	4	6	8
X2: pH inicial	4	5,5	7
X3: Concentración de inóculo (g/ 100 Kg aceituna)	0,132	0,22	0,308

Fuente: Elaboración propia (2008)

El diseño estadístico requiere de un mínimo de 15 tratamientos: 12 factoriales (combinaciones entre los niveles -1, 0,+1) y 3 centrales (las tres variables en el nivel 0). Los puntos centrales de los niveles sirven para estimar el error experimental y determinar la precisión de la ecuación polinomial. En el cuadro 4 se presentan los valores codificados del delineamiento experimental central rotacional para 3 variables independientes y 3 niveles de variación. Las variables de respuesta (Y) o variables dependientes estudiadas fueron el pH, acidez titulable, azúcares reductores, porcentaje de aceituna con defectos de fermentación y análisis sensorial.

Cuadro 4. Delineamiento experimental factorial de Box Benken con tres variables y tres niveles para el proceso de fermentación de aceituna verde al estilo español

Ensayo	X1	X2	X3
	Concentración de NaCl (°Bé)		Concentración de inóculo (g/100kg de aceituna)
1	-1 (4,00)	-1 (4,00)	0 (0,220)
2	+1(8,00)	-1 (4,00)	0 (0,220)
3	-1 (4,00)	+1(7,00)	0 (0,220)
4	+1(8,00)	+1(7,00)	0 (0,220)
5	-1 (4,00)	0 (5,50)	-1 (0,132)
6	+1(8,00)	0 (5,50)	-1 (0,132)
7	-1 (4,00)	0 (5,50)	+1(0,308)
8	+1(8,00)	0 (5,50)	+1(0,308)
9	0 (6,00)	-1 (4,00)	-1 (0,132)
10	0 (6,00)	+1(7,00)	-1 (0,132)
11	0 (6,00)	-1 (4,00)	+1(0,308)
12	0 (6,00)	+1(7,00)	+1(0,308)
13	0 (6,00)	0 (5,50)	0 (0,220)
14	0 (6,00)	0 (5,50)	0 (0,220)
15	0 (6,00)	0 (5,50)	0 (0,220)

Fuente: Elaboración propia (2008)

#### 2.5.4 Procesamiento y análisis estadístico de datos

Para el análisis de los efectos combinados de las variables independiente ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) en las respuestas evaluadas ( $Y_i$ ), se empleó la metodología de superficie de respuesta, obtenida mediante el Software Statística 5.0 para windows. El promedio de los datos de cada uno de los

15 experimentos para la variable respuesta fueron tratados por el análisis de regresión múltiple, para desarrollar un modelo matemático de primer o segundo orden conteniendo términos lineales, cuadráticos y de interacción. El efecto significativo del modelo fue tratado por análisis de varianza. En ella se observó el grado de significación de la regresión y de la falta de ajuste al 95 % de confianza, con la ayuda de la prueba de F, y el análisis del coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El modelo para ser considerado predictivo para describir determinada característica en la región analizada debe presentar regresión significativa al nivel del 95% de confianza, falta de ajuste no significativo en el mismo nivel de confianza y alto valor  $R^2$  (más próximo de 1 a 100).

Debe indicarse que de acuerdo a lo manifestado por Montgomery (1991), para que la regresión sea no solamente estadísticamente significativa, si no también útil con fines predictivos, el valor  $F_c$ , es decir la razón  $QM \text{ modelo} / QM \text{ residuo}$  debe ser mucho mayor que el valor  $F_t$ . Para la obtención de la máxima respuesta de las variables dependientes  $Y_i$ ), y para la optimización Múltiple de Respuestas, utilizó el Software DesignExpert 7.1 para Windows.

## **CAPITULO III. HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES**

### **3.1 Formulación de la hipótesis**

Es posible optimizar la fermentación de la aceituna verde en salmuera al estilo español, mediante la inoculación de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*

#### **3.1.1 Hipótesis específicas**

- Es posible determinar los parámetros óptimos de concentración inicial de cloruro de sodio, nivel inicial de pH y concentración óptima de cultivo de *Lactobacillus plantarum* a través de la aceptabilidad sensorial y características fisicoquímicas.
- Es posible evaluar la marcha de fermentación determinando la acidez libre y pH según las condiciones de diseño experimental.
- Es posible la caracterización fisicoquímica, sensorial e identificación microbiológica del tratamiento optimizado.

## **3.2 Identificación de variables e indicadores**

### **3.2.1 Variables**

#### a) Variables independientes

- Concentración de NaCl (°Bé), niveles: 4; 6 y 8.
- pH inicial de la salmuera, niveles: 4,0; 5,5; y 7,0
- Concentración de Inóculo (g/100 kg aceituna), niveles: 0,132; 0,220 y 0,308.

#### b) Variables dependientes

- Acidez titulable, expresado en % de ácido láctico.
- pH final de la fermentación.
- Atributos sensoriales (color, sabor y textura).

### **3.2.2 Indicadores**

Según la NTP 209.098:2006 de la ACEITUNA DE MESA

- Acidez: NTP203.070:1977.INDECOPI, por Titulometría.
- pH: NTP 203.070:1977. INDECOPI, por Potenciometría.
- Sal en salmuera (cloruro de sodio): AOAC 921.27 (método general norma CODEX.), por Potenciometría.
- Determinación de la concentración de sal en la salmuera con el método densimétrico en grados Baumé.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **4.1 Análisis de la materia prima**

A continuación se detallan los análisis realizados a la materia prima.

#### **4.1.1 Índice de madurez**

El índice de madurez adecuado de la aceituna para el desarrollo de la investigación se determinó en campo de manera visual, cuando éste alcanza una coloración verde amarillo pajizo (NTP 209.098:2006). En el anexo 6, se muestra la aceituna verde utilizada en la investigación.

#### **4.1.2 Tamaño de la aceituna**

El tamaño de las aceitunas, fue determinado por la NORMA TÉCNICA PERUANA NTP 209.098:2006, para la Aceituna de Mesa, en la que se usó el calibre 160/200 aceitunas por kg, obteniéndose un promedio de 180 aceitunas por Kg, se utilizó éste calibre ya las aceitunas de éste calibre son aquellas que tienen más problemas por defecto de fermentación conocido como fish eye, ver el cuadro 5, calibrado de aceituna verde.

Cuadro 5. Calibrado de aceituna verde

Calibre (unidades/kilogramo)
120 - 160
160 - 200
200 - 240
240 - 280
280 - 320

Fuente: Norma Técnica Perua 209.098:2006

#### 4.1.3 Relación pulpa- hueso

La relación pulpa-hueso para la muestra seleccionada de aceituna verde calibre 160/200, con un promedio de 180 unidades de aceituna por kilogramo, fue 5,25; la pulpa representó un promedio de 84% y el hueso 16% del total de una aceituna.

#### 4.1.4 Determinación del pH

Se determinó el pH de la pulpa de la aceituna, extrayendo el jugo celular y luego midiéndolo con un pH-metro digital, obteniéndose un valor de 4,55, observándose que es ligeramente ácido, ya que la aceituna contiene en la pulpa diferentes ácidos como el cítrico, málico y oxálico en concentraciones menores al 1% del peso de la pulpa (Fernández y Gonzales, 1985); el valor del pH del jugo celular varía dentro del intervalo 4,1-5,4, según la variedad y grado de madurez.

#### 4.1.5 Azúcares Reductores

Se determinó el porcentaje de azúcares reductores en la pulpa de aceituna, tomando una muestra del total de aceituna cosechada, para dicho análisis se utilizó el método de Somogy-Nelson, resultando un promedio de 5,1 g /100g de pulpa, éstos compuestos son los que dan origen a la fermentación. Todos éstos resultados fisicoquímicos pueden verse en el cuadro 6.

Cuadro 6. Principales análisis realizados a la aceituna verde variedad Sevillana

Análisis	Resultado
Índice de madurez	Color verde amarillo pajizo
Tamaño de la aceituna	180 aceitunas/ kg
Relación pulpa-hueso	84 pulpa/16 hueso
Determinación del pH	4,55
Azúcares reductores	5,10%

Fuente: Elaboración propia (2008)

#### 4.1.6 Análisis proximal a la aceituna

En el cuadro 7, se muestra la composición proximal de la aceituna verde variedad Sevillana. Según el análisis proximal realizado a la

aceituna verde, se puede observar que los componentes mayoritarios son el contenido de humedad y materia grasa de 71 y 16,24%, respectivamente, otro componente de mayor importancia destaca la presencia de carbohidratos en un 9,09 %, ya que éstos van a dar origen a la fermentación láctica de la aceituna.

Cuadro 7. Composición proximal de la pulpa de aceituna verde

Componentes	Contenido promedio en %
Humedad	71,00
Proteínas	1,36
Materia Grasa	16,24
Cenizas	2,31
Carbohidratos	9,09
Total	100,00

Fuente: Elaboración propia (2008)

#### 4.2 Análisis fisicoquímico de la salmuera

Los resultados experimentales obtenidos en la fermentación de aceituna verde con inoculación de cultivo láctico evaluados a través de las propiedades fisicoquímicas son mostrados en el cuadro 8.

Cuadro 8. Resultados del análisis fisicoquímico de la fermentación de aceituna verde con cultivo de *Lactobacillus plantarum*.

Ensayo	Variables Independientes			Variables dependientes	
	X 1	X 2	X 3	Y 1	Y 2
1	4	4,0	0,220	0,848	3,92
2	8	4,0	0,220	0,788	3,97
3	4	7,0	0,220	0,565	4,20
4	8	7,0	0,220	0,545	4,27
5	4	5,5	0,132	0,678	4,09
6	8	5,5	0,132	0,588	4,04
7	4	5,5	0,308	0,538	4,20
8	8	5,5	0,308	0,598	4,05
9	6	4,0	0,132	0,808	3,76
10	6	7,0	0,132	0,665	4,04
11	6	4,0	0,308	0,815	3,83
12	6	7,0	0,308	0,665	4,10
13	6	5,5	0,220	0,805	4,03
14	6	5,5	0,220	0,831	4,05
15	6	5,5	0,220	0,808	4,00

X1 = Concentración de salmuera Bé)

X2 = pH inicial

X3 = Cultivo láctico

Y 1 = Acidez titulable

Y 2 = pH final

Fuente: Elaboración propia (2008).

#### 4.2.1 Evaluación del pH

El pH es considerado como el máximo exponente de la marcha de la fermentación, se evaluó cada cinco días hasta el final del estudio que duró tres meses. Este análisis se ha llevado a cabo con la finalidad de evaluar el desarrollo de la fermentación y la forma cómo influye las condiciones iniciales de concentración de NaCl, acidificación de la salmuera y la inoculación de un cultivo láctico en la fermentación de aceituna verde al estilo español. Los resultados experimentales para ésta variable dependiente pH, se muestran en el cuadro 9.

Para una mejor observación de la evolución de las curvas del pH de los tratamientos, estas se agruparon en tres grupos según el nivel de pH inicial de acuerdo al delineamiento experimental (4, 5,5, y 7 de pH). En la figura 7 se agruparon a los tratamientos con pH inicial igual a 4 unidades que corresponden a los tratamientos (T1, T2, T9, T11), en ésta figura se puede observar que en los primeros días de fermentación, hay un ligero incremento del pH, esto se debe a la salida de la lejía residual presente en la pulpa de la aceituna (Barranco, 1994), para luego descender paulatinamente. También se observa que la muestra T9 alcanza los valores más bajos de pH de los 15 tratamientos en estudio que es de 3,76 de pH, las condiciones iniciales de éste tratamiento son: 6 Bé de

concentración de cloruro de sodio, 4 de pH de inoculación y 0,132 g/100 kg de aceituna.

Cuadro 9. Resultados de pH de los 15 ensayos y muestra testigo durante la fermentación de la aceituna verde al estilo español, con inoculación de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*.

T	DÍAS DE FERMENTACIÓN												
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	90
1	4,00	4,66	4,37	4,22	4,18	4,17	4,18	4,15	4,00	4,00	4,00	3,92	3,92
2	4,00	4,70	4,36	4,32	4,31	4,25	4,24	4,20	4,12	4,09	4,09	4,00	3,97
3	7,00	4,88	4,48	4,4	4,37	4,37	4,30	4,29	4,22	4,20	4,20	4,20	4,20
4	7,00	4,80	4,53	4,52	4,35	4,30	4,30	4,29	4,28	4,28	4,28	4,27	4,27
5	5,50	4,90	4,46	4,4	4,38	4,35	4,29	4,20	4,16	4,14	4,12	4,10	4,09
6	5,50	4,72	4,40	4,35	4,30	4,24	4,18	4,17	4,10	4,10	4,06	4,04	4,04
7	5,50	4,84	4,47	4,41	4,37	4,30	4,31	4,24	4,24	4,21	4,20	4,20	4,20
8	5,50	4,78	4,54	4,53	4,37	4,29	4,24	4,24	4,24	4,17	4,17	4,08	4,05
9	4,00	4,66	4,24	4,2	4,18	4,09	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	3,87	3,76
10	7,00	4,82	4,39	4,38	4,31	4,22	4,18	4,17	4,12	4,10	4,08	4,04	4,04
11	4,00	4,66	4,24	4,22	4,18	4,12	4,11	4,00	4,00	4,00	4,00	3,86	3,83
12	7,00	4,78	4,40	4,32	4,22	4,11	4,10	4,10	4,10	4,10	4,10	4,10	4,10
13	5,50	4,78	4,44	4,35	4,25	4,19	4,15	4,11	4,10	4,10	4,06	4,03	4,03
14	5,50	4,77	4,44	4,35	4,24	4,20	4,15	4,10	4,10	4,10	4,08	4,05	4,05
15	5,50	4,77	4,45	4,36	4,25	4,20	4,15	4,10	4,10	4,10	4,10	4,00	4,00
Testigo	7,00	5,08	4,59	4,53	4,50	4,42	4,37	4,30	4,26	4,23	4,20	4,00	4,00

Fuente: Elaboración propia (2008)

En la figura 8 se agruparon a los tratamientos con pH inicial =5,5 que corresponden a los tratamientos (T5,T6,T7,T8,T13,T14,T15)y en la Figura 9 se agruparon a los tratamientos con pH inicial =7 que corresponden a los tratamientos(T3,T4,T10,T12).

Los resultados demuestran que en todas las muestras donde se acidifico la salmuera con pH de 4 Y 5,5 el descenso del pH es rápido durante los primeros 10 días de fermentación alcanzando valores inferiores a 4,5 ; esto se debe a que en una fermentación con inoculación de un cultivo láctico y dando las condiciones de concentración de sal y pH adecuado para el desarrollo de los lactobacilos es que prácticamente se elimina la primera y segunda fase de fermentación, desarrollándose una fermentación eminentemente láctica de inicio a fin (Jiménez y Ruiz, 2004), continuando con un descenso rápido hasta los 30 días haciéndose más lenta hasta los 60 días y manteniéndose constante hasta los 90 días donde se da por concluida la fermentación. También se puede observar que en la figura 9 el descenso del pH de hace ligeramente lento debido a que las condiciones de inoculación con pH igual a 7 unidades no favorecen el desarrollo del *Lactobacillus plantarum*

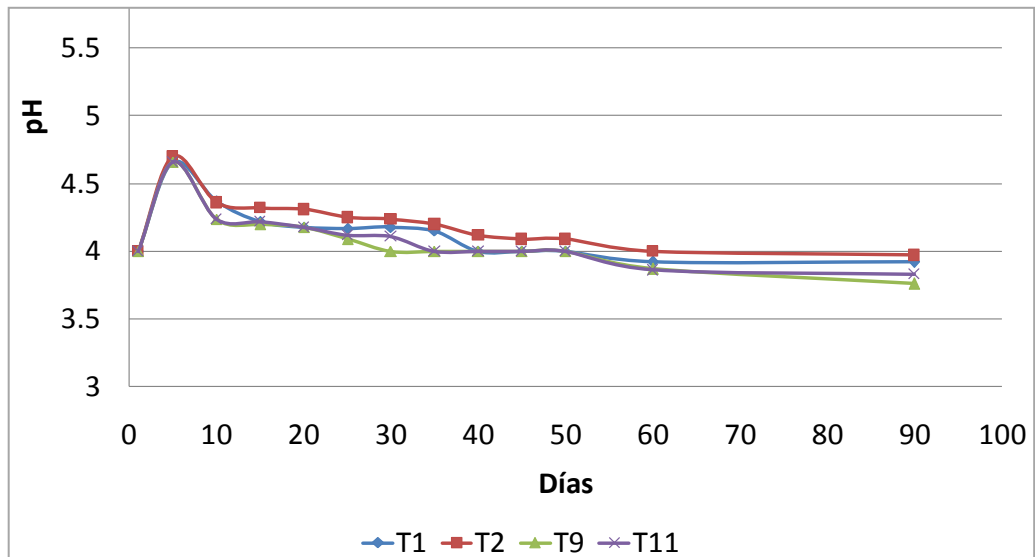


Figura 7. Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 4 de pH de inoculación.

Fuente: Elaboración propia (2010)

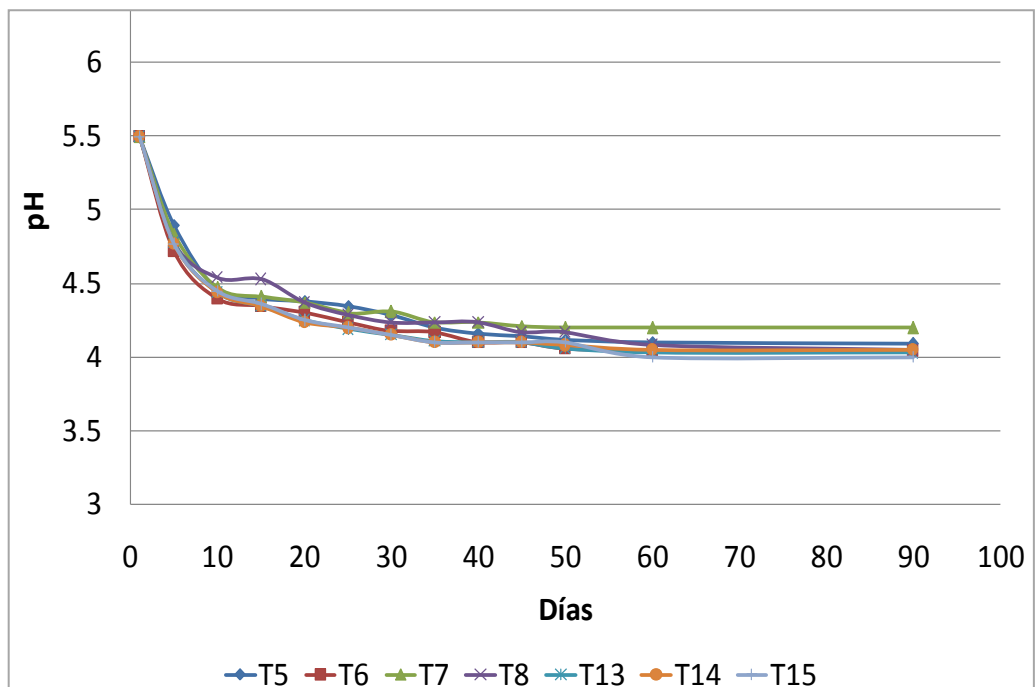


Figura 8. Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 5,5 de pH de inoculación

Fuente: Elaboración propia (2010)

Los valores correspondientes a los coeficientes del modelo de regresión completo para la variable respuesta pH final, son mostrados en el anexo 8a. Los análisis de varianza (ANVA) para el modelo completo de la variable respuesta pH final, según el diseño factorial Box-Benken, son presentados en el anexo 8b.

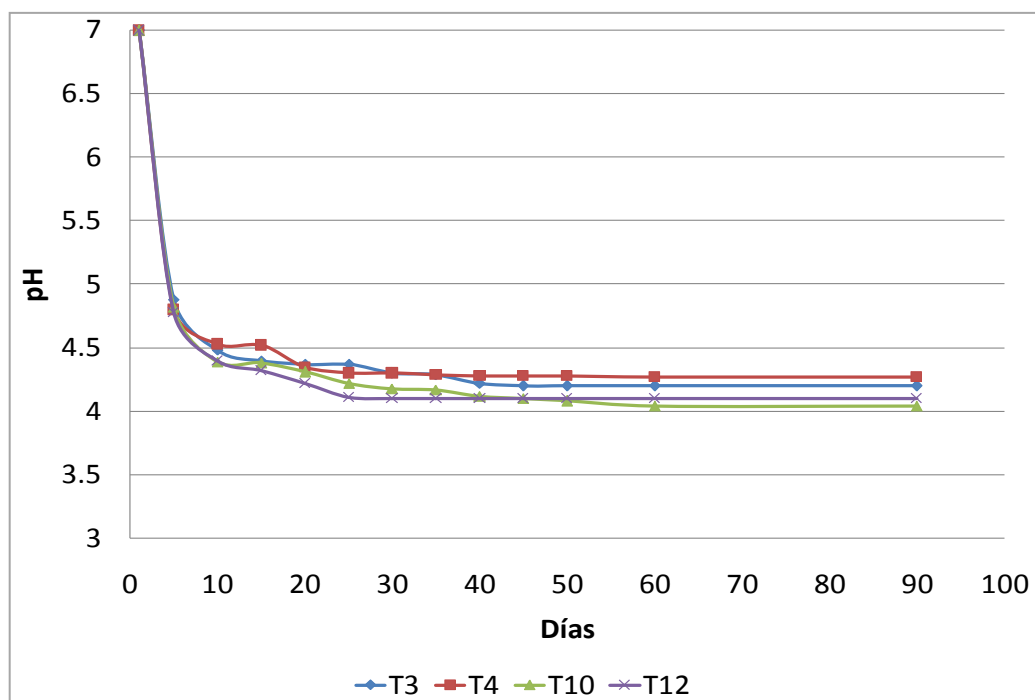


Figura 9. Evolución de la curva de pH en los tratamientos a nivel 7 de pH de inoculación

Fuente: Elaboración propia (2010)

El análisis de varianza presentada en el anexo 8b (ANVA) para el modelo de regresión completo para la variable dependiente pH final, mostró un coeficiente de determinación de 0,9441; y un coeficiente de variación de 0,0132. El modelo presenta además regresión altamente

significativa  $F_c = 9,38$  vs  $F_t = 4,77$  para una probabilidad  $\leq 0,05$ . Además presenta falta de ajuste no significativa  $F_c = 6,80$  vs  $F_t = 19,16$ ; por lo que esta ecuación puede usarse con fines de predicción de valores en la región estudiada y construcción del respectivo diagrama de superficie de respuesta.

En la figura 10, se presenta el diagrama de superficie de respuesta correspondiente al modelo completo para la variable respuesta pH final, que muestra el efecto de la concentración de NaCl y pH inicial a nivel constante de cultivo láctico= 0,22 g/kg, donde cabe destacar los diferentes valores de pH al final de la fermentación obtenidos por cada nivel de pH inicial; esto demuestra la importancia de este factor (pH inicial) al momento de preparar y acondicionar el proceso fermentativo, por el contrario los niveles de salmuera considerados en la investigación no ocasionan un cambio muy significativo en el resultado del pH obtenido al final del proceso de fermentación, demostrando así su escasa importancia como factor que afecte el descenso del pH en la fermentación de la aceituna verde con adición de cultivo láctico a nivel de planta piloto.

Por ello se puede afirmar que un acondicionamiento del pH inicial con valores inferiores a 5,5 es suficiente para conseguir al final del

proceso fermentativo un producto que alcance niveles de pH iguales o inferiores a 4,0 que es lo recomendado para dirigir una adecuada conservación de la aceituna verde al estilo español, tal como lo afirma (Ruiz y Jiménez, 2001) en un trabajo de investigación en fermentación de aceituna con inoculación de cultivos lácticos, realizado por el Instituto de la Grasa.

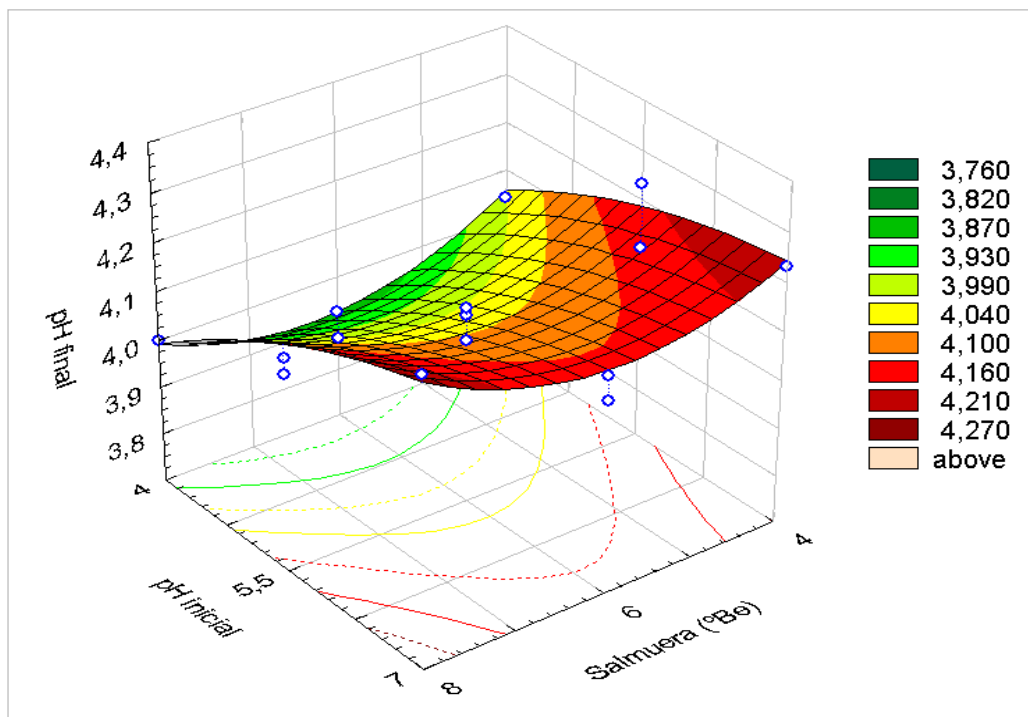


Figura 10: Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de NaCl y pH inicial, a nivel constante de cultivo láctico = 0,22 g/Kg sobre el pH final.

Fuente: Elaboración propia (2008)

La figura 11, muestra el diagrama de superficie de respuesta correspondiente al modelo completo, que muestra el efecto de la

concentración de NaCl y cultivo láctico, a nivel constante de pH inicial = 5,5. Donde se observa que se puede obtener valores de pH inferiores a 4 unidades manteniendo un rango de concentración de NaCl de 4,3 a 7 unidades, con una baja concentración de cultivo láctico comprendido entre 0,132 y 0,162 g/Kg. Esta figura 9 muestra que solo es necesario mínimas cantidades de cultivo para conseguir el pH final deseado de fermentación.

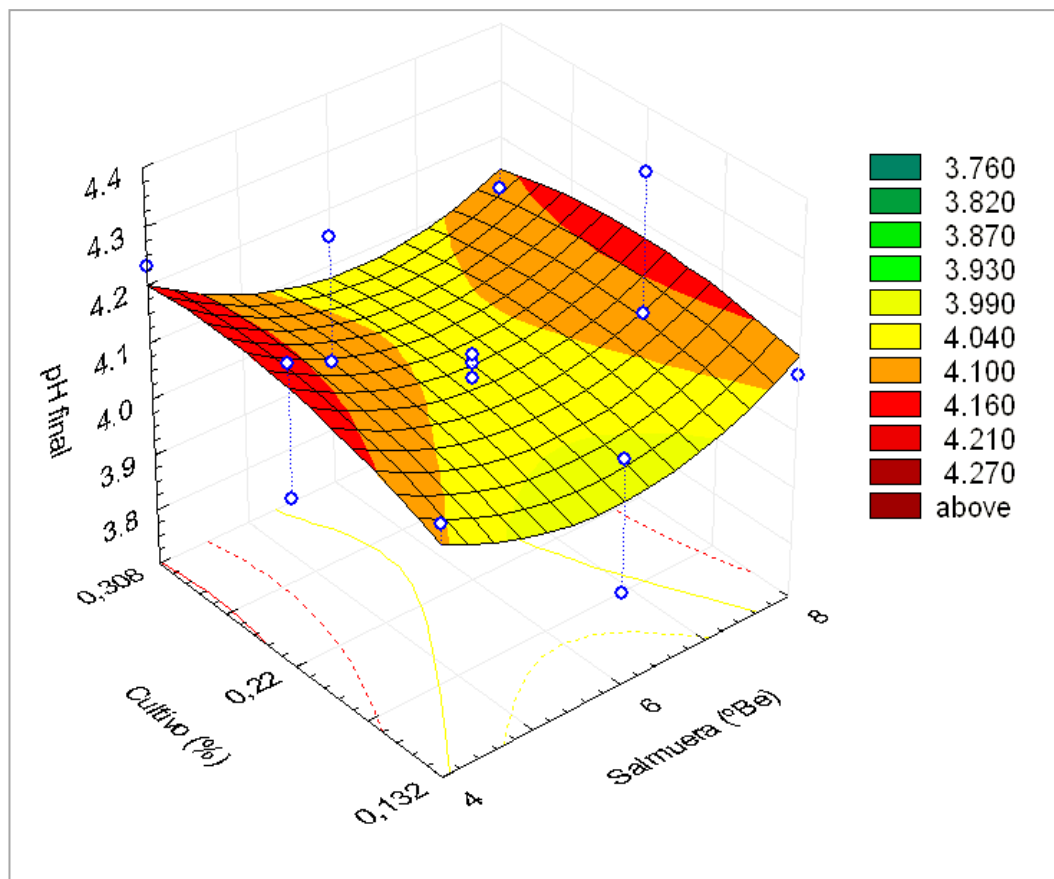


Figura 11. Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de NaCl y cultivo láctico inicial, a nivel constante de pH inicial = 5,5; sobre el pH final. Fuente: Elaboración propia (2008)

#### **4.2.2 Acidez titulable**

La acidez titulable es el porcentaje de peso de los ácidos contenidos en el producto. Se determinó mediante titulación con solución de hidróxido de sodio 0,2N, utilizando indicador fenolftaleína al 1%. La técnica consiste en neutralizar los iones hidrógeno libres del ácido con una solución de hidróxido de sodio (Meyer y Colbs, 1987).

En el cuadro 10, se muestra el resultado de la acidez al final del proceso de fermentación de la aceituna verde. Se puede obtener las diferentes curvas de evolución de la acidez expresada en porcentaje de ácido láctico para cada uno de los tratamientos. Para una mejor observación de cada una de las curvas de evolución de la acidez libre, de igual manera que en las gráficas del pH se separaron en tres graficas según el diseño experimental. En la figura 12 se agrupo a los tratamientos sin acidificación inicial de la salmuera que corresponde a los tratamientos (T3, T4, T10, T12). En la figura 13 se agrupo a los tratamientos con acidificación inicial (pH = 5,5) con acidez titulable de 0,05%, que corresponde a los tratamientos (T5, T6, T7, T8, T13, T14, T15) y en la figura 14 se agrupo a los tratamientos con acidificación inicial de pH 4, con acidez titulable de 0,1% que corresponden a los tratamientos (T1, T2, T9, T11).

Mediante las gráficas se puede observar que en todas las muestras el desarrollo de la acidez es rápido durante los primeros días de fermentación continuando este incremento hasta los 60 días, notándose una diferencia en relación a las muestras donde hubo acidificación inicial de la salmuera, donde el desarrollo de la acidez se hace mucho más rápido y pronunciado llegando a disminuir la velocidad a los 60 días y continuando muy lentamente en algunas muestras hasta los 90 días.

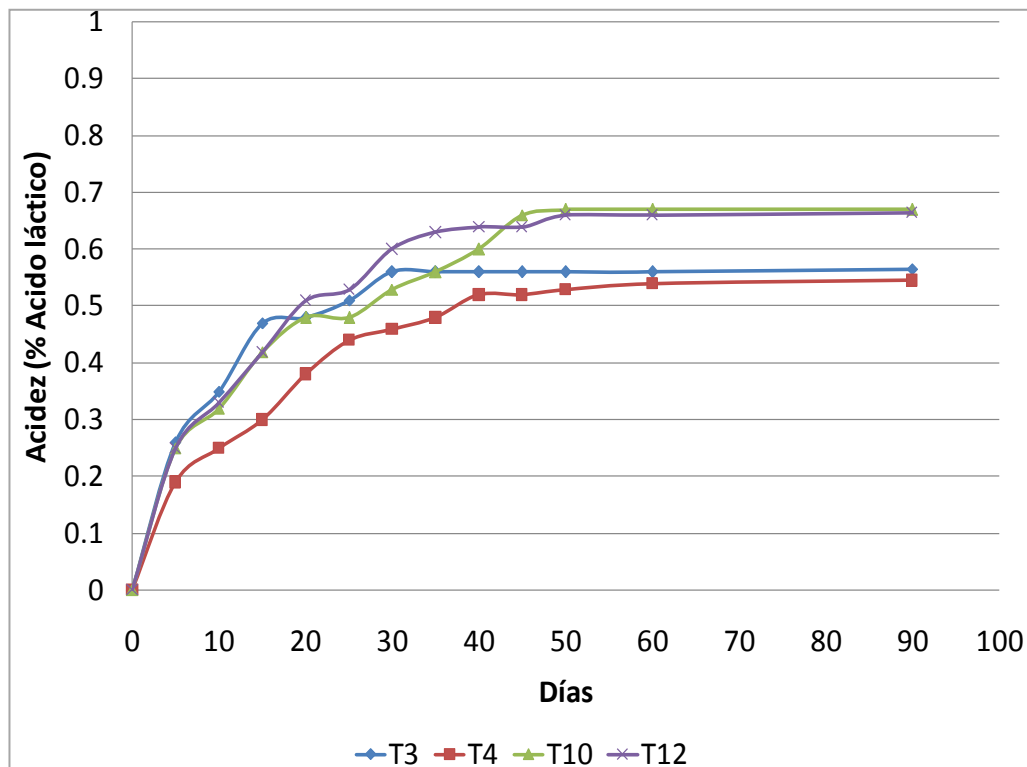


Figura 12. Evolución de la acidez en tratamientos sin acidificación inicial (pH= 7)  
Fuente: Elaboración propia (2010)

Cuadro 10. Resultados experimentales del desarrollo de la acidez expresado en porcentaje de ácido láctico de los 15 ensayos y muestra testigo durante la fermentación de la aceituna verde al estilo español, con inoculación de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*.

T	Días de fermentación													acidez desarrollada
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	90	
1	0,12	0,35	0,49	0,57	0,66	0,74	0,79	0,81	0,88	0,96	0,96	0,96	0,968	0,848
2	0,12	0,35	0,48	0,51	0,59	0,62	0,64	0,7	0,73	0,83	0,85	0,90	0,908	0,788
3	0	0,26	0,35	0,47	0,48	0,51	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,565	0,565
4	0	0,19	0,25	0,3	0,38	0,44	0,46	0,48	0,52	0,52	0,53	0,54	0,545	0,545
5	0,05	0,25	0,35	0,4	0,45	0,45	0,46	0,5	0,52	0,56	0,68	0,70	0,728	0,678
6	0,05	0,25	0,32	0,36	0,43	0,44	0,46	0,51	0,52	0,58	0,6	0,63	0,638	0,588
7	0,05	0,26	0,35	0,4	0,43	0,45	0,47	0,52	0,52	0,57	0,58	0,58	0,588	0,538
8	0,05	0,23	0,26	0,36	0,43	0,52	0,55	0,57	0,57	0,64	0,64	0,64	0,648	0,598
9	0,12	0,3	0,4	0,6	0,64	0,7	0,76	0,79	0,81	0,88	0,91	0,92	0,928	0,808
10	0	0,25	0,32	0,42	0,48	0,48	0,53	0,56	0,6	0,66	0,67	0,67	0,67	0,665
11	0,12	0,28	0,42	0,61	0,63	0,69	0,71	0,72	0,83	0,89	0,89	0,92	0,94	0,815
12	0	0,25	0,33	0,42	0,51	0,53	0,6	0,63	0,64	0,64	0,66	0,66	0,665	0,665
13	0,05	0,28	0,35	0,39	0,44	0,49	0,51	0,56	0,57	0,70	0,80	0,84	0,855	0,805
14	0,05	0,28	0,35	0,39	0,43	0,49	0,51	0,55	0,56	0,72	0,82	0,85	0,881	0,831
15	0,05	0,28	0,35	0,39	0,43	0,49	0,51	0,56	0,56	0,70	0,80	0,85	0,858	0,808
<b>Testigo</b>	0	0,11	0,23	0,26	0,35	0,43	0,46	0,5	0,53	0,57	0,58	0,64	0,67	0,670

Fuente: Elaboración propia (2008)

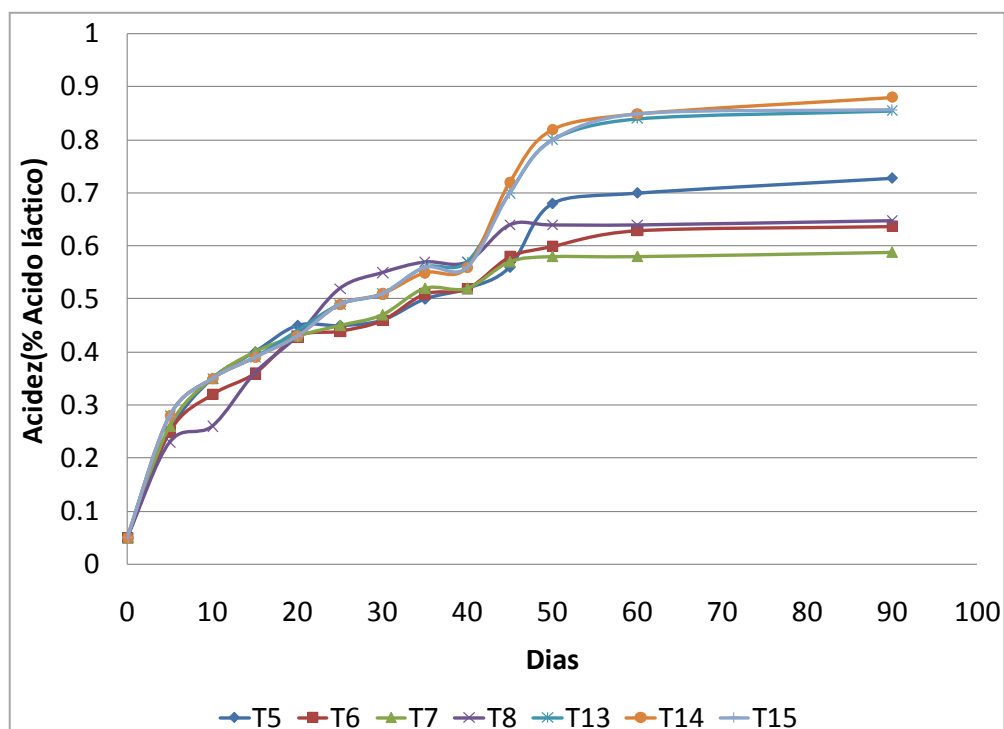


Figura 13. Evolución de la acidez en tratamientos con acidificación inicial (pH= 5,5). Fuente: Elaboración propia (2010)

El modelo completo y el grado de significación de las variables independientes acidez final, son mostrados en el anexo 9a. Los análisis de varianza (ANVA) para el modelo completo, son presentados en anexo 9b. El análisis de varianza (ANVA), muestra un coeficiente de determinación de 0,948 y un coeficiente de variación de 6,3 %. El modelo presenta además regresión altamente significativa  $F_c = 10,134$  vs  $F_t = 4,77$  para una probabilidad  $\leq 0,05$ . Además presenta falta de ajuste no significativa  $F_c = 4,770$  vs  $F_t = 19,160$ ; por lo que esta ecuación puede usarse con fines de predicción de valores en la región estudiada

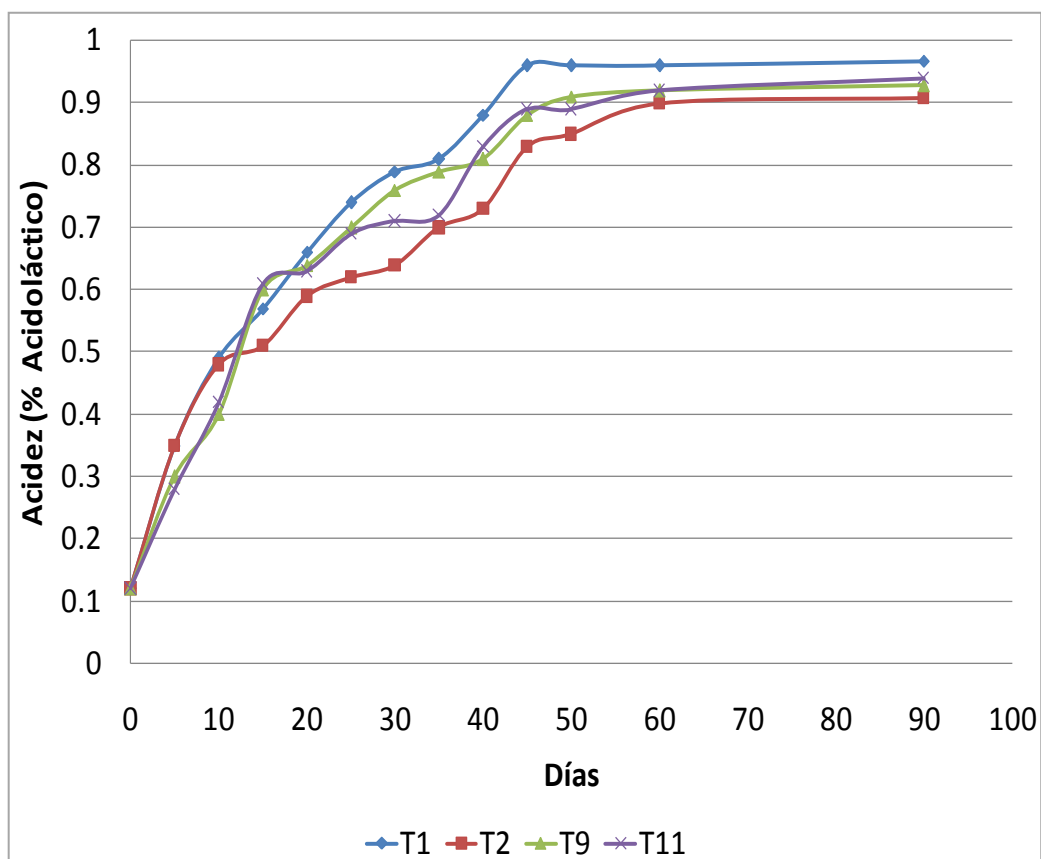


Figura 14. Evolución de la acidez en tratamientos con acidificación inicial (pH= 4).  
Fuente: Elaboración propia (2010).

La región de combinación binaria entre las variables concentración de NaCl (X1) y pH inicial(X2) puede ser observada a través del diagrama de superficie de respuesta construida a través del modelo matemático empírico que explica la relación entre la acidez total de la salmuera al final de la fermentación y su variabilidad debido a los diferentes niveles de concentración de NaCl, pH inicial de fermentación y concentración de cultivo de lactobacilos presentada en la figura 15.

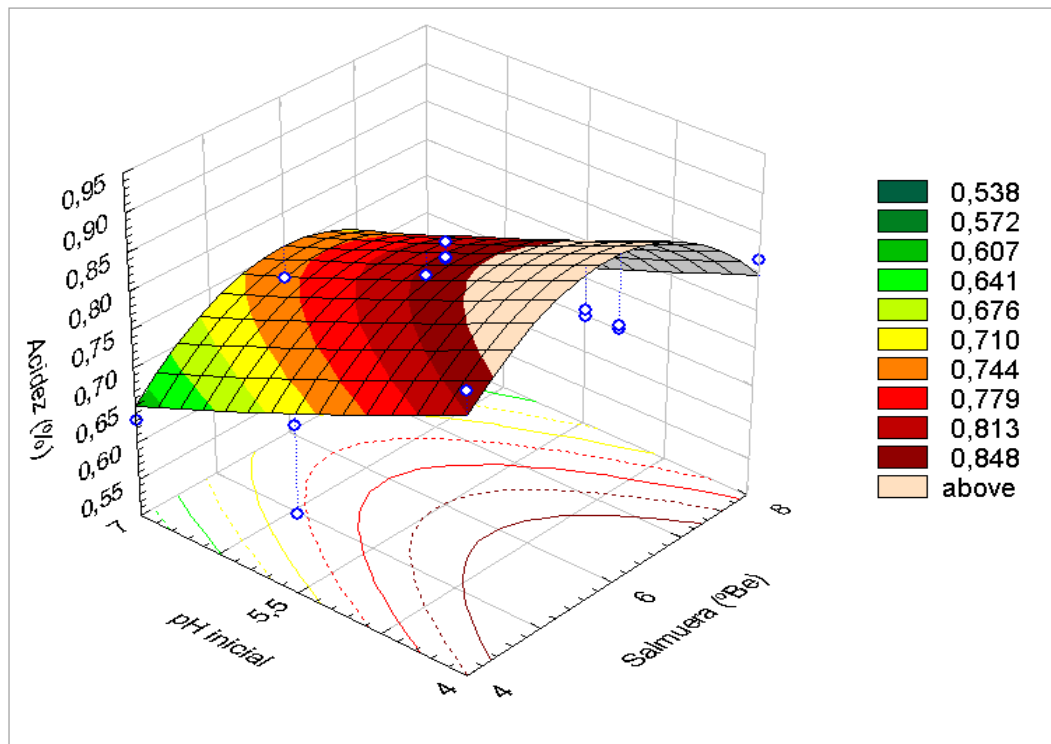


Figura 15. Diagrama de superficie de respuesta para el efecto de concentración de NaCl y el pH inicial, a nivel constante de concentración de cultivo láctico = 0,22 g/Kg sobre la acidez desarrollada.

Fuente: Elaboración propia (2008).

La figura 15 muestra las regiones de contorno para la variable dependiente acidez desarrollada, obtenidas por el modelo matemático, fijándose la variable X3 en el nivel codificado 0 (cultivo láctico 0,22 g/ 100 Kg). Es importante el pH al inicio de la fermentación y su efecto en la producción final de la acidez, tal es así que en la figura se puede observar que a mayores niveles de pH menor es la acidez desarrollada, puesto que para obtener una acidez superior al 0,7% es necesario el acondicionamiento de la salmuera desde el punto de vista del pH a

niveles comprendidos entre 4,0 y 5,5 unidades para dirigir y dar las condiciones necesarias para el desarrollo de los lactobacilos y de ésta manera no permitir que se den condiciones desfavorables para el desarrollo de microorganismos perjudiciales que alteren el proceso fermentativo.

Para una adecuada inoculación de cultivo láctico es necesario la corrección de pH inicial con ácido acético en un rango comprendido de 4,5 y 6,5 y concentración de sal hasta 4% (Jimenez y Ruiz, 2001). Por el contrario según los resultados obtenidos en los tratamientos, nos indica que los niveles de salmuera utilizadas en la investigación no ocasionan un cambio muy significativo en la acidez final, demostrando así su escasa importancia como factor que afecte el desarrollo de la acidez en la fermentación de la aceituna verde con adición de cultivo láctico.

Asimismo la figura 16, establece una presencia importante de los niveles centrales de las variables concentración de NaCl (X1) y concentración de cultivo láctico (X3) en la producción de la acidez final.

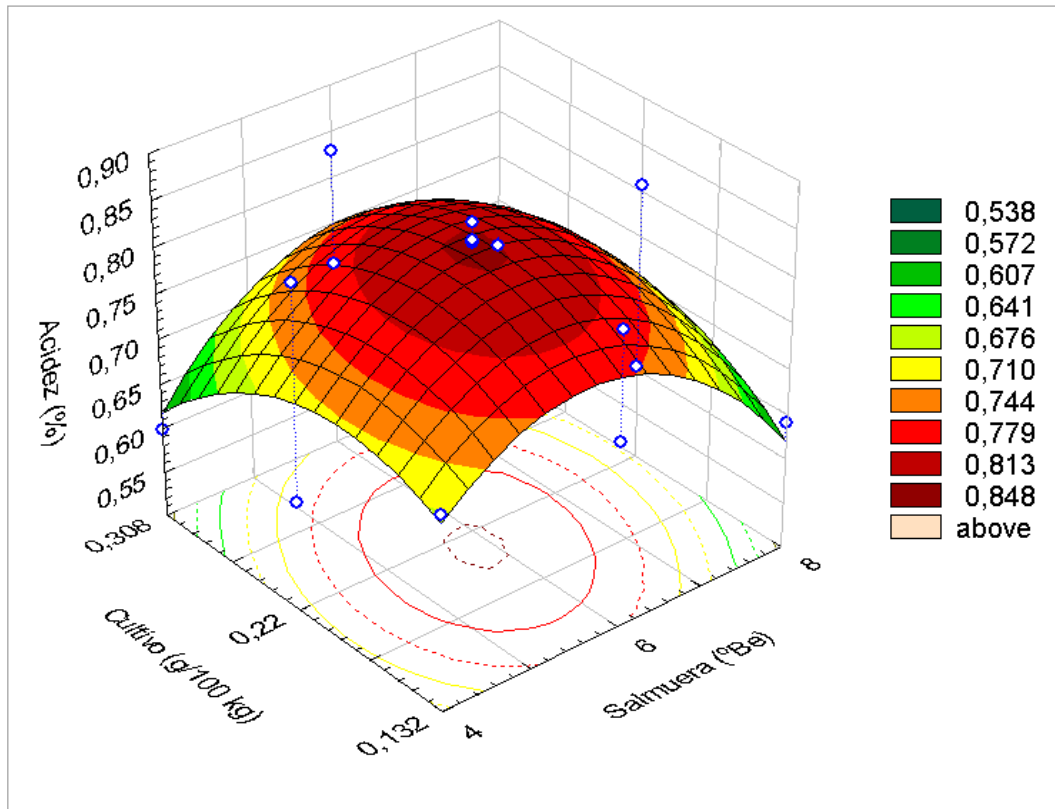


Figura 16. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de concentración de NaCl y cultivo láctico, a nivel constante de pH inicial = 5,5 sobre la acidez desarrollada.

Fuente: Elaboración propia (2008).

La figura 17, muestra el importante efecto del pH inicial de la salmuera con respecto a la acidez final desarrollada, tal es así que a niveles más bajos de pH inicial, mayor es la producción de ácido y esto se debe a que al acidificar el medio a pH inferiores a 6 unidades, se crean las condiciones necesarias para el óptimo desarrollo de las bacterias lácticas dando inicio a un rápido proceso fermentativo, alcanzando niveles máximos cuando se combinan con el nivel medio de cultivo láctico.

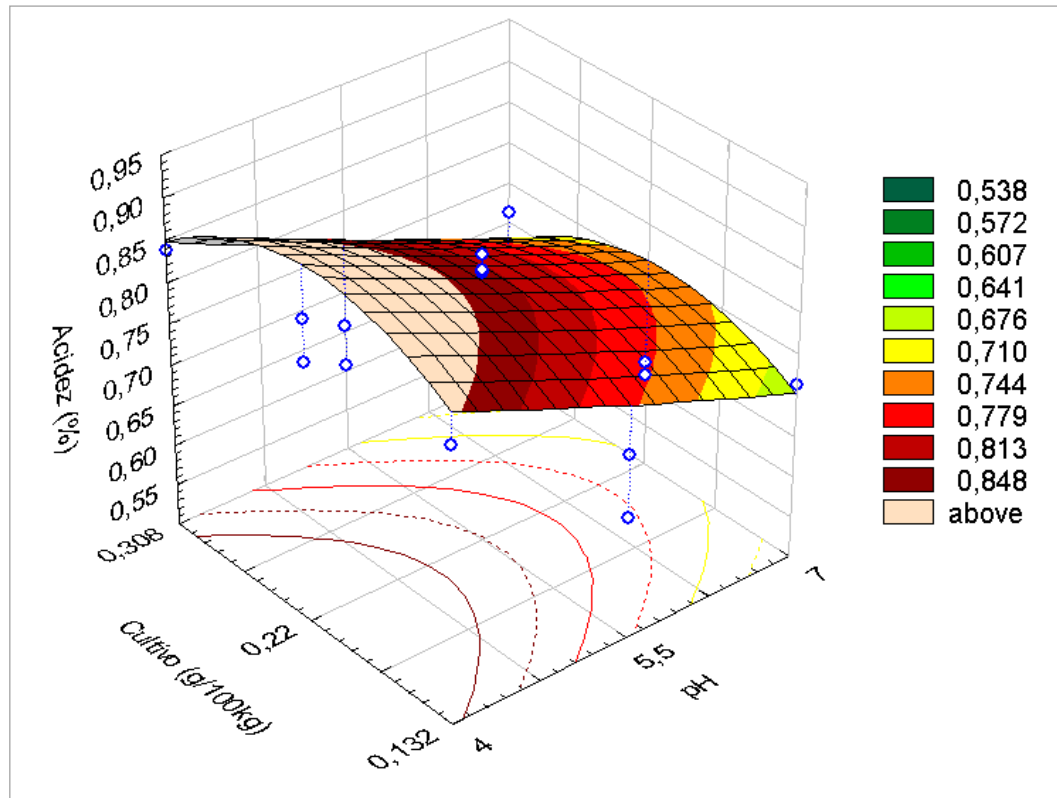


Figura 17. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de concentración de pH inicial y cultivo láctico, a nivel constante de concentración de NaCl = 6°Be sobre la acidez desarrollada.

Fuente: Elaboración propia (2008).

#### 4.2.3 Acidez combinada

La acidez combinada se determinó por valoración potenciométrica de la salmuera con una solución de ácido clorhídrico 2N, hasta pH 2,6. La acidez combinada suministra la información sobre la forma en que se han realizado las operaciones de cocido y lavados. Su presencia en cantidades progresivamente crecientes hace que el pH no descienda rápidamente durante las primeras fases de la fermentación; el equilibrio se establece aproximadamente a los 20 días, donde el valor de la acidez

combinada permanece constante y se puede determinar la acidez necesaria para alcanzar un pH adecuado de conservación por la correlación existente entre la acidez combinada, acidez libre y el valor del pH (Borbolla y Alcalá y Rejano Navarro, 1998).

Con una acidez combinada de 0,14N, siempre que la fermentación transcurra de manera normal se podrá alcanzar con relativa facilidad un pH de 4 unidades o menos; no es así cuando las cifras de acidez combinada son superiores a 0,14 N, para los que será difícil llegar a éste valor, pudiendo permanecer las aceitunas a valores altos de pH y por tanto en condiciones propicias para cualquier alteración. El resultado obtenido de la acidez combinada en las muestras investigadas se muestran en el cuadro 11, en el cual se puede observar que la acidez combinada obtenida en cada una de las muestras es inferior a 0,14 N; obteniéndose valores máximos de 0,076 N y mínimo de 0,072N, éstos valores nos indican que las operaciones de cocido y de lavado han sido las adecuadas en todas las muestras, el cual no influirá en el normal desarrollo de la fermentación láctica para dicha investigación.

Cuadro 11. Resultado de la acidez combinada expresada en Normalidad a los veinte días de iniciada la fermentación.

Muestra	Acidez combinada
1	0,076
2	0,075
3	0,073
4	0,073
5	0,074
6	0,073
7	0,072
8	0,076
9	0,074
10	0,076
11	0,076
12	0,073
13	0,074
14	0,072
15	0,073

Fuente: Elaboración propia (2008)

#### **4.3 Evaluación sensorial - efecto en la aceptabilidad del producto**

##### **final**

En el cuadro 12, se presentan los ensayos y sus promedios de respuestas obtenidos para estudiar el efecto de la concentración de NaCl, pH inicial y concentración de cultivo láctico en los atributos sensoriales de la aceituna verde fermentada a escala piloto.

Cada uno de los experimentos fue evaluado organolépticamente por un grupo de 5 panelistas semi entrenados, mediante una ficha de evaluación sensorial. En los diferentes ensayos se utilizó la prueba Hedónica con calificación de escalas de intervalo 1 a 9 puntos. En ésta, cada panelista dentro de la ficha de cata anotó en una escala ordinaria desde 1 (me desagrada muchísimo) hasta 9 (me agrada muchísimo).

Cuadro 12. Tratamientos según diseño experimental de Box- Benken y sus resultados experimentales en la evaluación sensorial.

T	X 1 Concentración de salmuera (Bé)	X 2 pH inicial	X 3 Cultivo láctico	Y 4 Sabor	Y 5 Textura	Y 6 Color
1	4	4	0,22	6,38	5,8	6,32
2	8	4	0,22	6,0	6,0	6,04
3	4	7	0,22	7,5	5,4	5,33
4	8	7	0,22	6,6	5,4	5,33
5	4	5,5	0,132	5,88	5,2	5,6
6	8	5,5	0,132	5,75	5,8	6,5
7	4	5,5	0,308	5,38	6,0	6,17
8	8	5,5	0,308	5,5	6,2	5,67
9	6	4	0,132	5,25	5,8	6,11
10	6	7	0,132	6,5	6,0	5,7
11	6	4	0,308	6,0	6,1	6,15
12	6	7	0,308	6,0	5,2	5,6
13	6	5,5	0,22	6,25	5,52	6,05
14	6	5,5	0,22	6,13	5,0	6,1
15	6	5,5	0,22	6,0	5,55	6,0

Fuente: Elaboración propia (2008)

### 4.3.1 Sabor

El modelo completo y el grado de significación de las variables independientes, son mostrados en el anexo 10a. Los análisis de varianza (ANVA) para el modelo completo, son presentados en anexo 10b. El análisis de varianza (ANVA), muestra un coeficiente de determinación de 0,9094 y un alto coeficiente de variación de 4,58.

El modelo presenta además regresión significativa donde el  $F_c = 5,577$  vs  $F_t = 4,770$  para una probabilidad  $\leq 0,05$ . Además presenta falta de ajuste no significativa  $F_c = 7,603$  vs  $F_t = 19,160$ ; por lo que esta ecuación puede usarse con fines de predicción de valores en la región estudiada. La región de combinación binaria entre las variables independientes concentración de NaCl(X1) y pH inicial(X2) de fermentación para la variable dependiente sabor a nivel constante de cultivo láctico de 0,22 g/100 Kg; puede ser observada a través de la figura 18 el diagrama de superficie de respuesta obtenida por el modelo matemático completo. De acuerdo con la figura existe una región de máxima respuesta con valor de escala hedónica en sabor mayor de 7,3; la cual comprende un nivel de 4 °Be para la concentración de NaCl y un nivel de 7 para el pH inicial de fermentación.

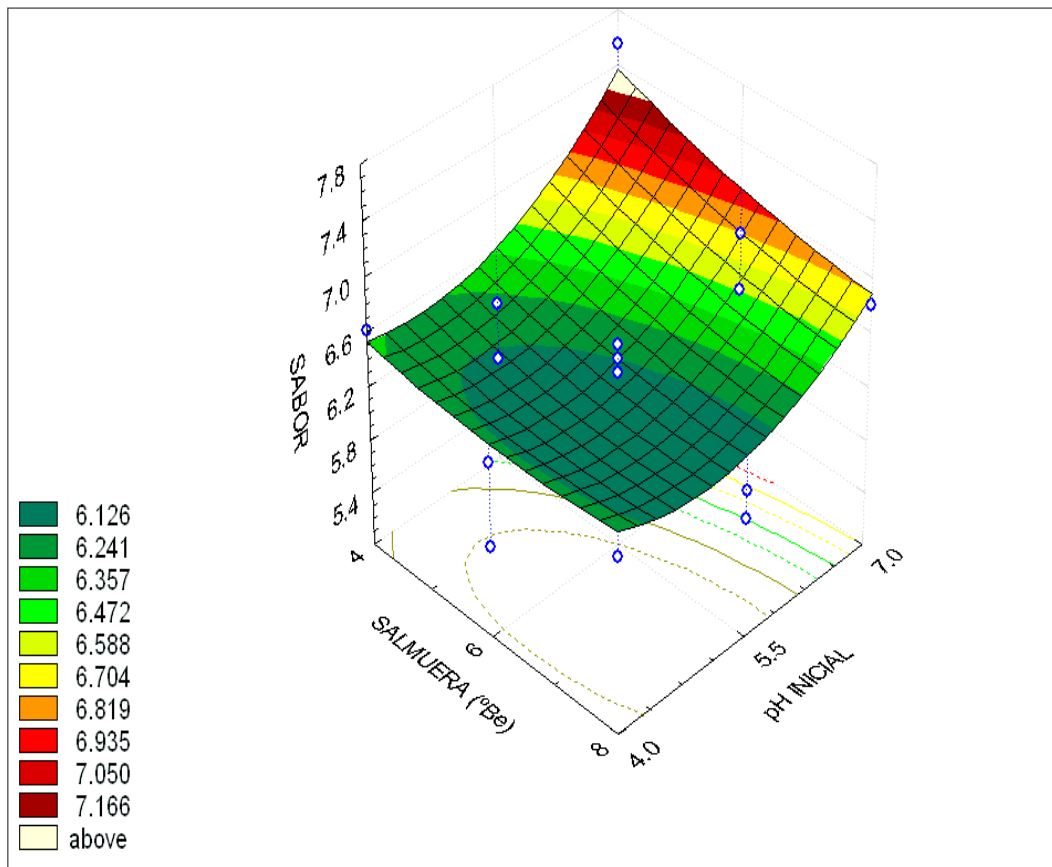


Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de NaCl y pH inicial sobre el sabor de las aceitunas verdes fermentadas a nivel constante de cultivo láctico de 0,22 g/100 kg.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

La figura 19, muestra el efecto importante del pH inicial en el sabor final de la aceituna verde fermentada con cultivo láctico donde se observa que el mayor valor se registra a niveles altos de pH inicial, es decir que para conseguir un sabor calificado como “gusta algo” no se hace necesario acetificar la salmuera.

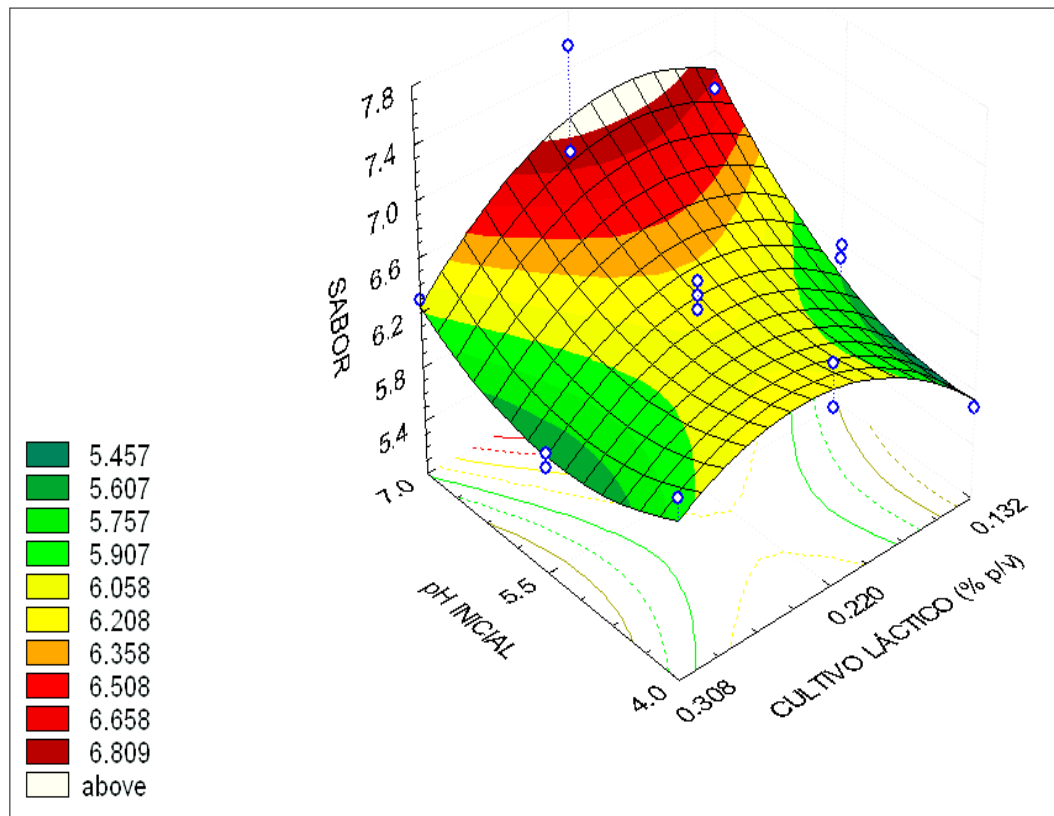


Figura 19. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto del pH inicial y concentración de cultivo láctico a nivel constante de concentración de NaCl= 6°Be sobre el sabor de las aceitunas verdes fermentadas.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

#### 4.3.2 Color

El modelo completo y el grado de significación de las variables independientes, son mostrados en el anexo 11a. El análisis de varianza (ANVA) para el modelo completo, son presentados en anexo 11b. El análisis de varianza (ANVA), muestra un coeficiente de determinación de 0,9212 y un alto coeficiente de variación de 2,79. El modelo presenta además regresión significativa donde el  $F_c$  6,49 vs  $F_t = 4,770$  para una

probabilidad  $\leq 0,05$ . Además presenta falta de ajuste no significativa  $F_c = 17,50$  vs  $F_t = 19,160$ ; por lo que esta ecuación puede usarse con fines de predicción de valores en la región estudiada.

La región de combinación binaria entre las variables concentración de NaCl (X1) y pH inicial (X2) puede ser observada a través de curvas de nivel presentadas en la figura 20. La figura muestra las regiones de contorno de superficie de respuesta para la variable dependiente Color, obtenidas por el modelo matemático, fijándose la variable concentración de cultivo láctico (X3) en el nivel codificado 0 (cultivo láctico 0,22 g/ 100 Kg). Este nivel fue escogido para demostrar el importante efecto que el pH inicial tiene en las diferentes variaciones del color de la aceituna fermentada con cultivo láctico al final del proceso fermentativo, en donde queda demostrada la importancia de preparar una solución acidulada que alcance un pH inferior a 5 unidades para poder obtener al final un producto con buena aceptación del atributo color con un valor esperado según escala hedónica de 6 (“me gusta”).

La región de combinación binaria entre las variables pH inicial (X2) y concentración de cultivo láctico (X3) puede ser observada a través de curvas de nivel presentadas en la figura 21. La figura muestra las regiones

de contorno de superficie de respuesta para la variable dependiente Color, obtenidas por el modelo matemático completo fijándose la variable concentración de NaCl (X1) en el nivel codificado 0 (salmuera 6 °Be).

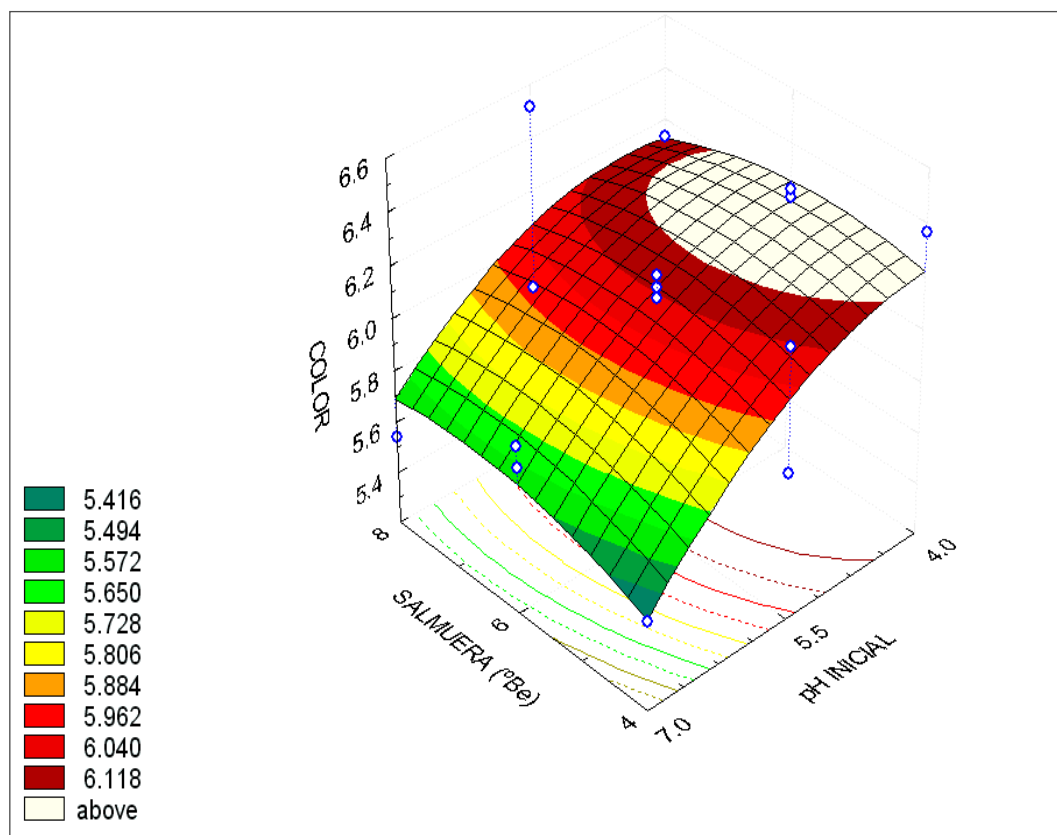


Figura 20. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de NaCl y del pH inicial a un nivel de cultivo láctico de 0,22 g/100 Kg, sobre el color de las aceitunas verdes fermentadas.

Fuente: Elaboración propia (2008)

Este nivel fue escogido para demostrar que el pH sigue siendo el factor que mas afecta el color en comparación con el efecto del cultivo láctico.

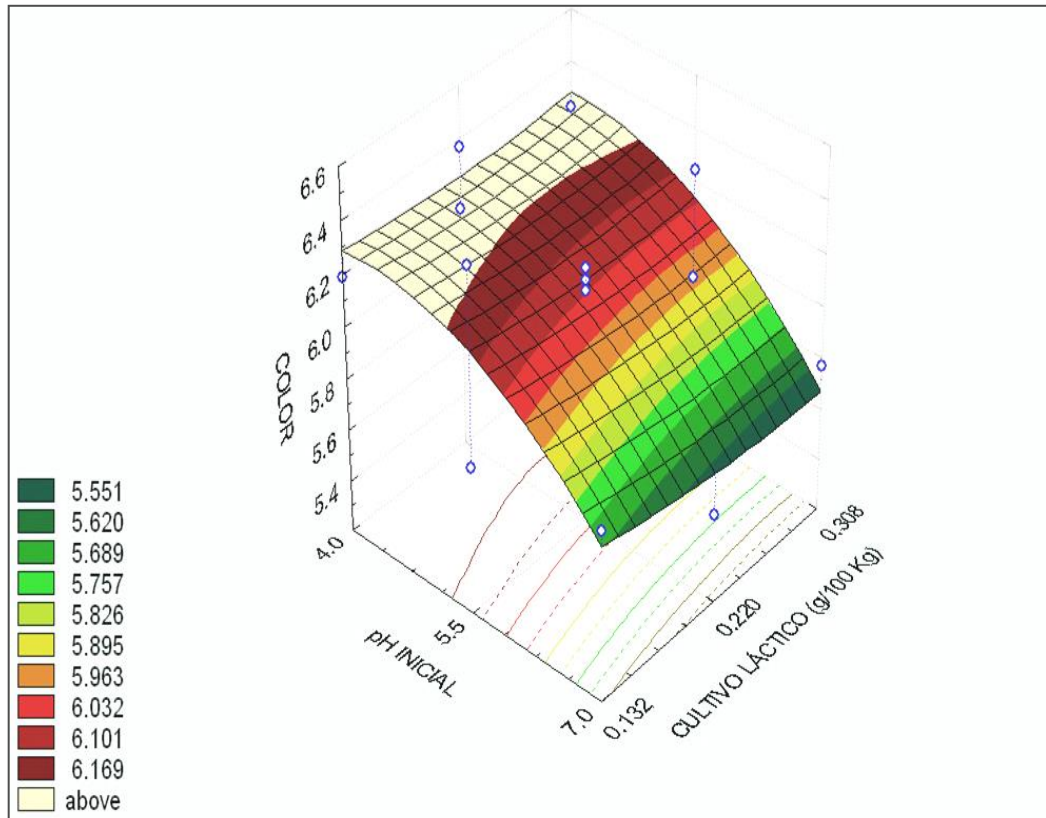


Figura 21. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto del pH inicial y cultivo láctico sobre el color de las aceitunas verdes fermentadas, a un nivel constante de concentración de NaCl 6°Bé.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

### 4.3.3 Textura

El modelo completo y el grado de significación de las variables independientes, son mostrados en el anexo 12a. El análisis de varianza (ANVA) para el modelo completo, son presentados en anexo 12b.

Para la evaluación de la textura de las aceitunas verdes fermentadas los resultados fueron poco satisfactorios, el modelo matemático hallado no

reportó información acerca de la influencia de las variables independientes en la textura del producto final; coeficientes no significativos. Un efecto no significativo del modelo hallado y un bajo coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,7184$ ) demuestra que la variabilidad de la textura de las diferentes muestras no se explica por las variables independientes seleccionadas.

#### **4.4 Identificación y caracterización del cultivo láctico**

Para la identificación de las bacterias lácticas se utilizó una muestra de salmuera del tratamiento T9 en el que se obtuvo los mejores resultados, para la siembra se utilizó como medio de cultivo al agar rogosa, el cual es un medio selectivo para el aislamiento y numeración de lactobacilos, la incubación se realizó en condiciones anaerobias, se seleccionó las placas que presentaban de 30 a 300 colonias, según el método de recuento (Moreno, B y Col., 2000).

Se aislaron colonias típicas de bacterias lácticas y se procedió a realizar las pruebas para la identificación como género *Lactobacillus*. En el cuadro 13, se muestra el resumen de los resultados de la identificación y caracterización del cultivo láctico.

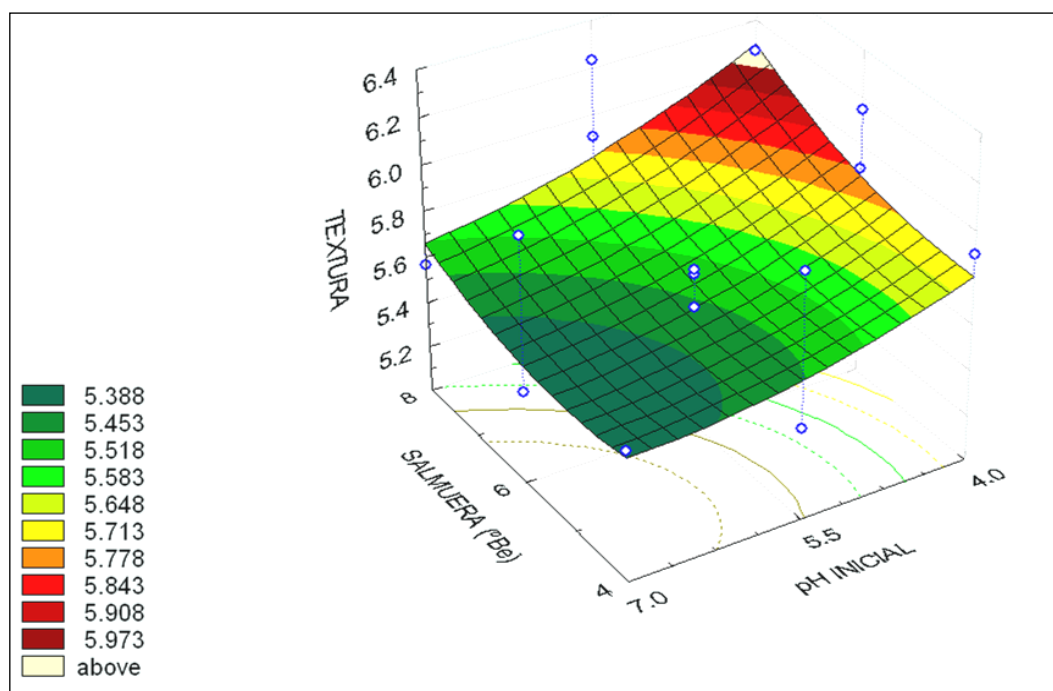


Figura 22. Diagrama de superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de NaCl y pH inicial sobre la textura de las aceitunas verdes fermentadas, a un nivel constante de cultivo = 0,22 g/100 Kg.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

Cuadro 13. Resultado de la caracterización del cultivo láctico para la identificación del *Lactobacillus plantarum*

Características	Resultado
Morfología	Coco bacilar
Tinción Gram	Gram-positivo
Prueba de la catalasa	Catalasa negativa
Tolerancia al 7% de NaCl	Positivo
Tolerancia al 10% de NaCl	Positivo
Tolerancia a pH de 3,9	Positivo
Producción de CO <sub>2</sub>	Negativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

#### 4.5 Optimización de los parámetros en estudio

Para la optimización de los factores en estudio mediante la técnica de optimización múltiple se tomaron 2 criterios diferentes según se muestra en el cuadro 14 estableciendo restricciones de máximos y mínimos para las variables respuesta en función a la necesidad de obtener un producto de buena calidad y/o buenas condiciones para largos periodos de almacenamiento y aplicando la metodología de la función deseada mediante el paquete estadístico Design - Expert 7.1. (Aguirre, 2005), se obtuvo la siguiente solución según se observa en el cuadro 14.

Cuadro 14. Criterios y solución para la selección del tratamiento de mejores condiciones de fermentación con adición de cultivo láctico.

Factor	Criterio	Límite Inferior	Límite Superior	Valores optimizados
Salmuera (°Bé)	en rango	4	8	6,32
pH inicial	en rango	4	7	4
Cultivo Láctico (g/100 kg)	en rango	0,132	0,308	0,136
Acidez (%)	Maximizar	0,538	0,848	0,848
pH final	Minimizar	3,76	4,27	3,767
Azúcares Reductores (%)	en rango	0,0429	0,0979	0,086
Sabor	en rango	5,25	7,5	5,367
Color	Maximizar	5,33	6,5	6,293
Textura	en rango			5,66
Función de deseabilidad ( <i>d</i> )				0,933

Fuente: Elaboración propia (2008)

De dichos resultados se concluye que la solución hallada con un valor de función de deseabilidad cercano a la unidad (0,933) ofrece los mejores resultados tecnológicamente aceptables, tanto para su elaboración como su conservación de las aceitunas verdes fermentadas con cultivo láctico. La figura 23 ilustra la optimización de función deseada para las variables dependientes en donde la región con la combinación óptima de variables independientes (región naranja) se encuentra cuando se condiciona la salmuera acidificándola hasta un pH = 4 y una concentración de salmuera de 6,32 °Be.

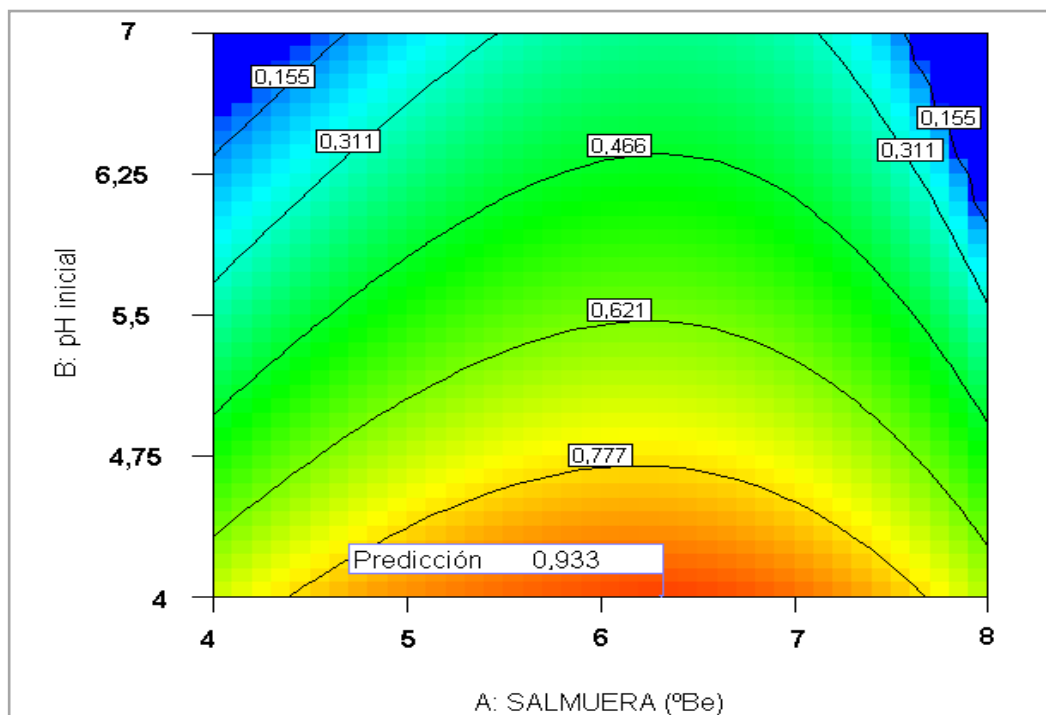


Figura 23. Optimización por la metodología de la función deseada de la fermentación dirigida de la aceituna verde. Manteniendo fijo el nivel de concentración de cultivo en 0,136 g/100 kg.

Fuente: Elaboración propia (2008)

Estas condiciones reducen el tiempo de fermentación siendo este de 60 días con resultado sensoriales aceptables. Las condiciones menos favorables se presentan cuando el proceso se lleva a cabo con salmuera no acidificada (región azul) independientemente de la concentración de salmuera.

#### **4.6 Resultados de la evaluación del producto final**

En la figura 24 y figura 25 se muestran la curva del desarrollo de la acidez y pH del tratamiento T9 con parámetros iniciales de concentración de cloruro de sodio de 6 Bé, pH de inoculación de 4 unidades y concentración de cultivo láctico de 0,132 g / 100 kg es considerada como la muestra en la que se obtuvo los mejores resultados en relación con la muestra testigo de una fermentación tradicional con parámetros iniciales de concentración de cloruro de sodio de 6 Bé. El tratamiento T9 destaca en su desarrollo por el tiempo reducido para alcanzar niveles de acidez titulable expresado en % de ácido láctico superiores al 0,8%, por consecuencia adquiriendo valores bajos de pH, lo cual garantiza la calidad y conservación del producto final. Lo que no sucede en la fermentación tradicional que a los tres meses de fermentación alcanza valores inferiores al 0,7% de ácido láctico dependiendo mucho de las condiciones ambientales en las que se desarrolle.



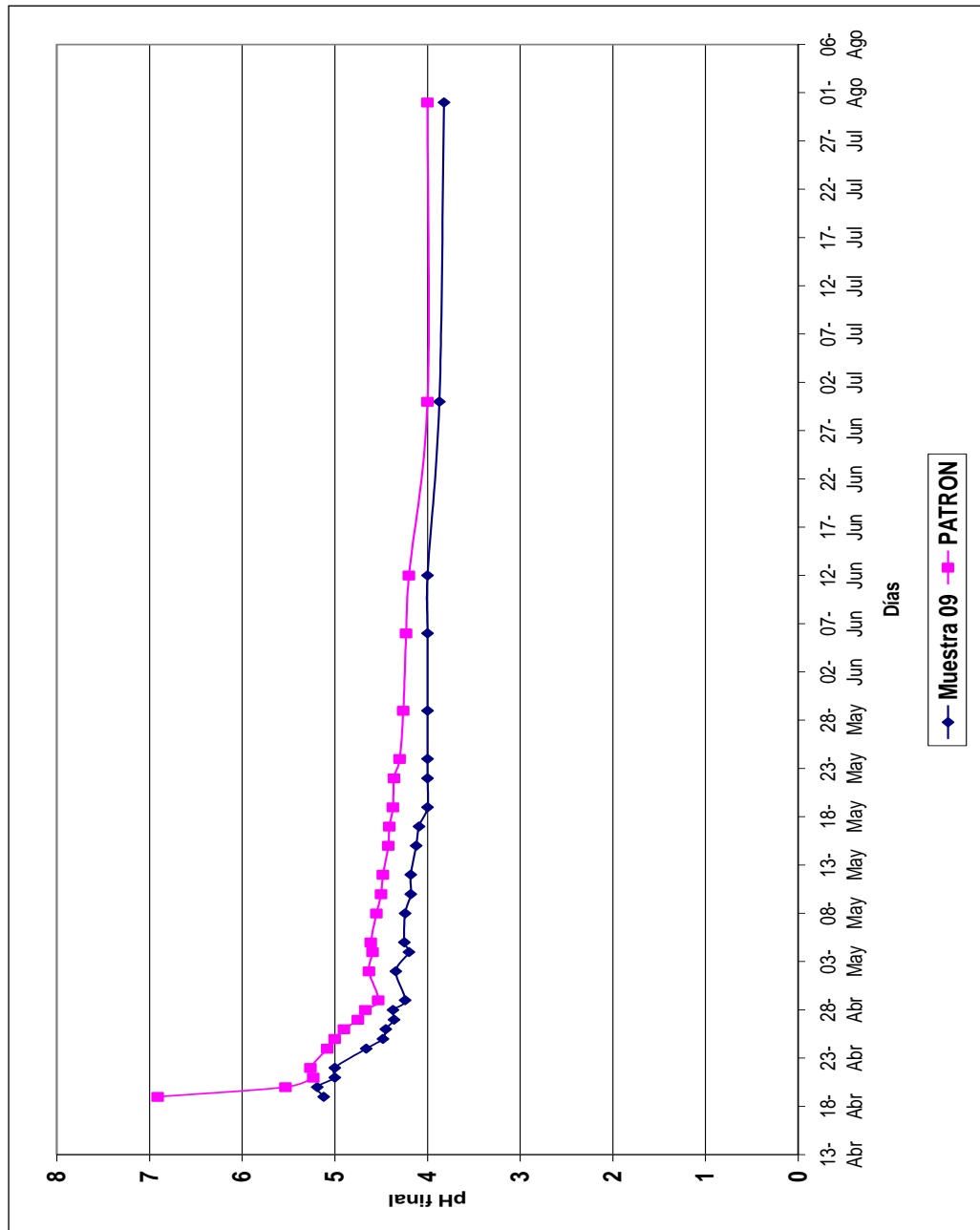


Figura 25. Desarrollo comparativo del pH final entre la fermentación del tratamiento óptimo (salmuera 6,0 °Be; 132 g/100 kg de cultivo láctico; pH inicial = 4) y fermentación tradicional (salmuera 6 °Be)

Fuente: Elaboración propia (2008)

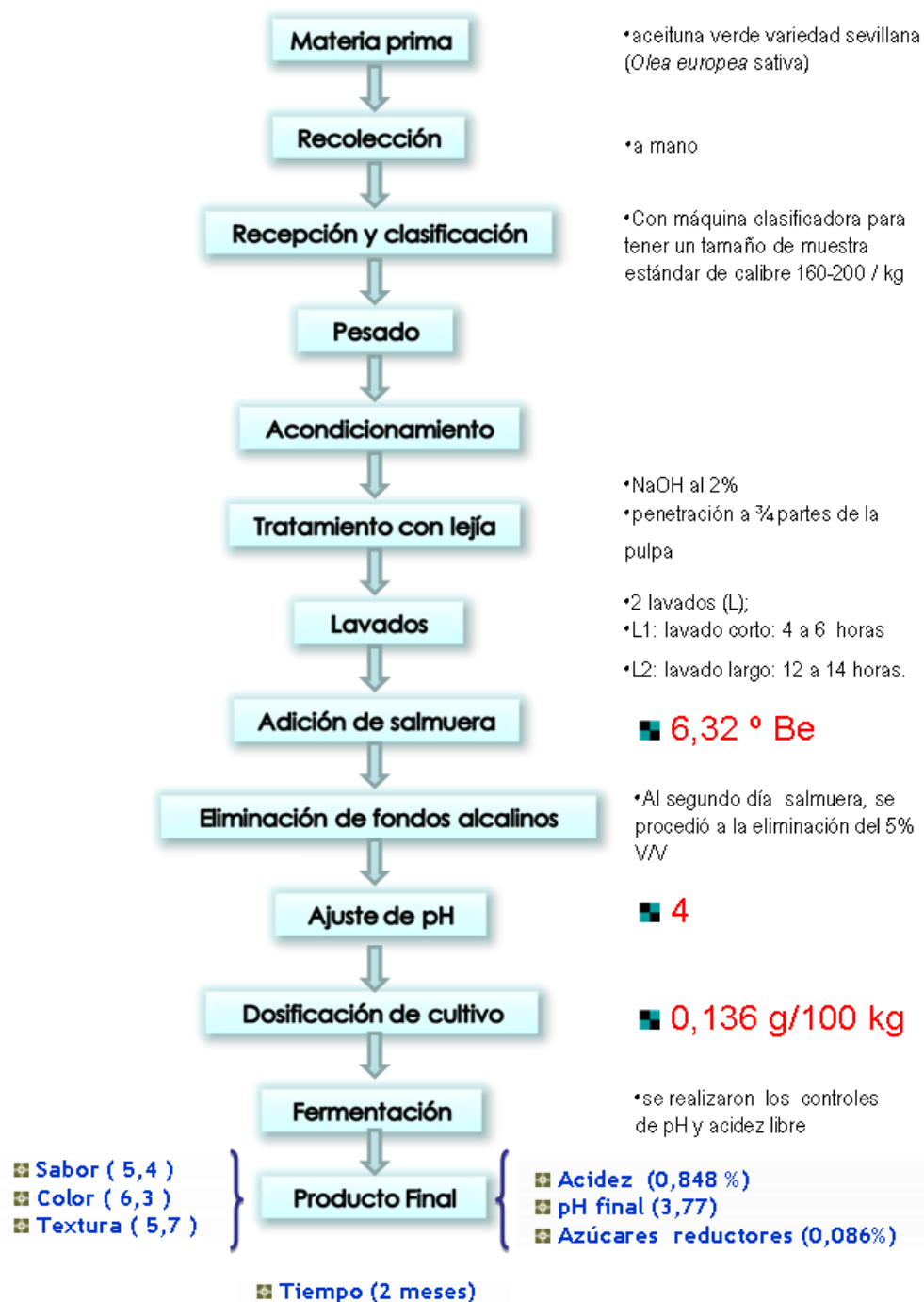


Figura 26. Flujo definitivo para el procesamiento de aceituna verde al estilo español en una fermentación por inoculación de cultivo láctico.  
Fuente: Elaboración propia (2008)

Una vez realizada la optimización de las variables en estudio y establecidos los parámetros, se determinó el flujo de procesamiento definitivo tal como se muestra en la figura 25. Se puede indicar que el uso de cultivos iniciadores para la fermentación de aceituna verdes al estilo español es una excelente herramienta tecnológica de incalculable valor reduciendo considerablemente el tiempo de fermentación (Jiménez y Ruiz, 2004). Por ello se destaca que en el tratamiento óptimo solo fue necesario un tiempo de fermentación de 2 meses.

## CONCLUSIONES

- 1) Los niveles óptimos de concentración inicial de salmuera, pH inicial y concentración de cultivo de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación de aceituna verde al estilo español son 6,32 °Bé, 4 de pH y 0,136 g/100Kg de aceituna respectivamente.
- 2) El tiempo óptimo del proceso de fermentación duró 2 meses.
- 3) El tratamiento óptimo arrojó los siguientes valores de calificación según la escala sensorial de 9 puntos: sabor = 5,367; color = 6,293 y textura 5,660.
- 4) La textura es el factor que menos se ha visto influenciada por las variables independientes. Sólo la combinación pH y cultivo presentó efecto significativo.
- 5) Para el tratamiento de mejores condiciones la caracterización microbiológica categorizan a la bacteria láctica presente como homofermentativa con resistencia a concentraciones de sal de hasta 10%.

## RECOMENDACIONES

- 1) Evaluar el efecto del índice de madurez en el desarrollo de la fermentación y aceptabilidad sensorial.
- 2) Evaluar el efecto de la concentración de NaOH en la penetración al fruto y su efecto en el posterior desarrollo de la fermentación por inoculación de cultivos lácticos.
- 3) Estudiar otros métodos de acidificación.
- 4) Evaluar el tiempo de vida útil del producto.
- 5) Como en todo proceso de elaboración y sobre todo cuando se trata de una fermentación por inoculación, es importante tener en cuenta los principios de higiene elementales, como lavar y desinfectar los tanques de fermentación cuidadosamente antes de usarlos, periódicamente lavar las tapas y retirar los hongos que se puedan formar.
- 6) Las aceitunas contenidas en los tanques deben estar siempre sumergidas por completo en la salmuera durante la etapa de fermentación y durante su almacenamiento, para lo cual debe añadirse a los tanques la salmuera de las mismas características de concentración y de pH (requerido).

- 7) La temperatura es un parámetro importante a controlar ya que influye en la etapa de fermentación, por tal motivo se recomienda acondicionar un ambiente aislado de temperatura controlada óptima para el desarrollo del Lactobacillus.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre Vargas et al (2005). Efecto de Películas de Quitosano en la Vida Útil De Mango (*Mangífera indica*) mínimamente procesado VII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS Lambayeque-Perú
2. Espinoza, E. J (2003). Evaluación sensorial de los alimentos. Impreso en Perú.
3. Gallegos, M. (1999): Técnicas en el Procesamiento de Aceituna de Mesa U.N.J.B.G. Tacna.p 22-40
4. Hart F. L y Fisher H. (1984). Análisis de los Alimentos, Editorial Acribia, Zaragoza- España.
5. ICMSF. (2000): Microorganismos de los alimentos<sup>1</sup>, su significado y métodos de enumeración Editorial Acribia S.A Zaragoza-España.
6. Instituto de la Grasa y sus Derivados (1988). Biotecnología de la Aceituna de Mesa Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
7. Montgomery C. Douglas (1991): Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamerica. México.
8. Norma Técnica Peruana 209.098:2006. Aceituna de mesa.

9. Pearson, D. (1998). Técnicas de laboratorio para el análisis de Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España
10. Roig y Hernández (1991): El uso de los Microorganismos Iniciadores de la Fermentación de la Aceituna de Mesa, *Olivae* N° 37
11. Ruiz, B. Jiménez, R. (2004): Aceituna de Mesa de la Fermentación Tradicional a la Utilización de Cultivos Iniciadores
12. Samaniego, F. L. y Sosa Del Castillo, M. (2000). *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria. Habana- Cuba.

### **Internet**

1. [http://www.ctnc.es:81/noticias/pdf/AGROCSIC/10\\_AGROCSICaceitunaMesa.pdf](http://www.ctnc.es:81/noticias/pdf/AGROCSIC/10_AGROCSICaceitunaMesa.pdf).
2. <http://www.monografias.com/trabajos15/fermentacion-acidolactica/fermentacion-acido>
3. Observatorio Virtual de la Aceituna de Mesa (2005) vinculado a [www.observatorioaceitunademesa.com/scripts/aceituna/generica/mig\\_aestaticas.asp?i=1&activo=0&subactivo=7&subopcion=&a=innovacion.htm](http://www.observatorioaceitunademesa.com/scripts/aceituna/generica/mig_aestaticas.asp?i=1&activo=0&subactivo=7&subopcion=&a=innovacion.htm)

4. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Expo olivo (2005)  
[http://www.produccioncatamarca.gov.ar/expolivo/documentos/Presentaciones\\_pdf/Aceitunas%20de%20mesa%20para%20EXPO%20OLIVOS%202005.pdf](http://www.produccioncatamarca.gov.ar/expolivo/documentos/Presentaciones_pdf/Aceitunas%20de%20mesa%20para%20EXPO%20OLIVOS%202005.pdf)
5. Metodología de superficie de respuesta vinculado a  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lii/peregrina\\_p\\_pm/capitulo2.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lii/peregrina_p_pm/capitulo2.pdf)
6. Instituto de la Grasa (2005): Bacterias Lácticas Seleccionadas para la Fermentación de Aceitunas Sevillanas  
<http://www.csic.es/ott/rdcsic/rdcsicesp/rdal09esp.htm> .p
7. Kleerebezem, Michiel (1995): Wikipedia. Enciclopedia libre  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus\\_plantarum](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_plantarum)
8. Rodríguez Jerez José Juan (2007) La cara oculta de la flora láctica  
Fuente: Diario de la Seguridad Alimentaria vinculado a  
[http://www.portalechero.com/ver\\_items\\_descrip.asp?VarItem=1553](http://www.portalechero.com/ver_items_descrip.asp?VarItem=1553)

# **ANEXOS**

Anexo 1.Especificaciones del cultivo de Lactobacillus plantarum

## **LACTOBACILOS PLANTARUM 2**

**Código EPSA: 1000520102EP**

### **DESCRIPCIÓN**

Iniciador alimentario destinado a la elaboración de aceitunas.

### **CONCENTRACIÓN**

Lactobacilos plantarum RJL2:  $1 \times 10^{12}$  UFC

Lactobacilos plantarum RJL3:  $1 \times 10^{11}$  UFC

### **CALIDAD BACTERIOLÓGICA**

Diagnóstico in vitro mediante test de identificación de Lactobacilos API 50  
CHL.

### **PRESENTACIÓN**

Bolsas transparentes envasadas al vacío. Peso aproximado 22 gramos.

### **CONSERVACIÓN**

Ausencia de luz, lugar fresco y seco, preferentemente en nevera entre  
4°C- 8°C.

### **DOSIFICACIÓN**

Monodosis, una bolsa por fermentador de 10000 kilogramos.

Toda la información contenida en éste documento es transcripción literal  
de su original REV .19/11/02

## Anexo 2. Tanque de fermentación



- a. Tanque de fermentación
- b. Tanque de preparación de soluciones
- c. Bomba de agua
- d. Balanza electrónica

Anexo 3.Ficha de análisis sensorial sabor

**FICHA DE ANALISIS SENSORIAL**

Nombre y apellido.....

Fecha.....

Pruebe una muestra codificada y use la escala de abajo para indicar cuanto gusta o disgusta en relación a cada característica especificada.

1) Extremadamente desagradable
2) Muy desagradable
3) Bastante desagradable
4) Desagradable
5) Ni desagradable ni agradable
6) Agradable
7) Bastante agradable
8) Muy agradable
9) Extremadamente agradable

En relación al atributo.....

Observaciones.....

**RESPUESTA**

235	437	543	678	123	506	467	680	648	332	119	934	890	704	250

Anexo 4.Ficha de análisis sensorial color

**FICHA DE ANALISIS SENSORIAL**

Nombre y apellido.....

Fecha.....

Pruebe una muestra codificada y use la escala de abajo para indicar cuanto gusta o disgusta en relación a cada característica especificada.

1) Extremadamente desagradable
2) Muy desagradable
3) Bastante desagradable
4) Desagradable
5) Ni desagradable ni agradable
6) Agradable
7) Bastante agradable
8) Muy agradable
9) Extremadamente agradable

En relación al atributo.....

Observaciones.....

**RESPUESTA**

235	437	543	678	123	506	467	680	648	332	119	934	890	704	250

Anexo 5.Ficha de análisis sensorial textura

**FICHA DE ANALISIS SENSORIAL**

Nombre y apellido.....

Fecha.....

Pruebe una muestra codificada y use la escala de abajo para indicar cuanto gusta o disgusta en relación a cada característica especificada.

1) Extremadamente desagradable
2) Muy desagradable
3) Bastante desagradable
4) Desagradable
5) Ni desagradable ni agradable
6) Agradable
7) Bastante agradable
8) Muy agradable
9) Extremadamente agradable

En relación al atributo.....

Observaciones.....

**RESPUESTA**

235	437	543	678	123	506	467	680	648	332	119	934	890	704	250

Anexo 6. Fruto del olivo de la variedad sevillana utilizada en la investigación



Fuente: (Elaboración propia)

## Anexo 7.Preparación de la salmuera y conversión de °Bé a %

### Preparación de la salmuera

$$\text{Kg de sal} = \frac{\text{°Bé} \times 1,25 \times V}{100}$$

-----

100

Dónde:

°Bé : Los Grados Baumé que se requiere

1,25 : Factor del NaCl, depende de la pureza de la sal.

V : Volumen de la salmuera a preparar.

Según el diseño experimental se trabaja con 3 niveles de concentración de salmuera 4, 6 ,8 °Bé, aplicando la fórmula de conversión su equivalencia en porcentaje es 5, 7,5 y 10 % respectivamente.

Anexo 8. Análisis estadístico para la evaluación de la variable respuesta

pH final

a) Coeficientes del modelo de regresión completo

	Coeficientes de Regresión	Error estándar	t(2)	p	
Intercepto	4,0267	0,015	277,134	0,000	*
X <sub>1</sub>	-0,0100	0,009	-1,124	0,378	n.s.
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,1129	0,013	8,622	0,013	*
X <sub>2</sub>	0,1413	0,009	15,875	0,004	*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,0496	0,013	-3,786	0,063	n.s.
X <sub>3</sub>	0,0312	0,009	3,512	0,072	n.s.
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,0446	0,013	-3,404	0,077	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0050	0,013	0,397	0,729	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,0250	0,013	-1,987	0,185	n.s.
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,0025	0,013	-0,199	0,861	n.s.

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad  
n.s.= No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

b) Análisis de varianza

<b>promedio</b> :	4,0327	Coeficiente de Determinación R <sup>2</sup> :	0,9441			
<b>desviación</b> :	0,0533	Coeficiente de Variación C.V. :	0,0132			
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>	
Regresión	0,2395	9	0,0266	9,38	4,77	*
Residuo	0,0142	5	0,0028			
Falta de ajuste	0,0129	3	0,0043	6,80	19,16	n.s.
Error puro	0,0013	2	0,0006			
<b>Total</b>	<b>0,2537</b>	<b>14</b>				
Varianza explicada :			93,62%			
Máxima Varianza explicada :			98,65%			

X<sub>1</sub> = NaCl (Be) ; X<sub>2</sub> = pH inicial ; X<sub>3</sub> = Cultivo (g/100 Kg);

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

Fuente: Elaboración propia (2008)

Anexo 9. Análisis estadístico para la evaluación de la variable respuesta  
acidez desarrollada

a) Coeficientes del modelo de regresión completo

	Coeficientes de Regresión	Error estándar	t(2)	p	
Intercepto	0,815	0,008	99,199	0,000	*
X <sub>1</sub>	-0,014	0,005	-2,734	0,112	n.s.
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0,133	0,007	-17,978	0,003	*
X <sub>2</sub>	-0,102	0,005	-20,332	0,002	*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,005	0,007	0,630	0,593	n.s.
X <sub>3</sub>	-0,015	0,005	-3,057	0,092	n.s.
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,081	0,007	-10,953	0,008	*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,010	0,007	1,406	0,295	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,038	0,007	5,273	0,034	*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,002	0,007	-0,246	0,829	n.s.

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

n.s.= No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

b) Análisis de varianza

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO</b>					
promedio : 0,703		Coeficiente de Determinación R <sup>2</sup> : 0,948			
desviación : 0,044		Coeficiente de Variación C.V. : 6,30%			
Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculado	F tabla
Regresión	0,178607	9	0,0198452	10,134	4,770 *
Residuo	0,009791	5	0,0019583		
Falta de ajuste	0,009387	3	0,0031289	15,464	19,160 n.s.
Error puro	0,000405	2	0,0002023		
Total	0,188398	14			
Varianza explicada :			94,80%		
Máxima Varianza explicada :			99,79%		
X <sub>1</sub> = NaCl (Be) ; X <sub>2</sub> = pH inicial ; X <sub>3</sub> = Cultivo (g/100 Kg);					
* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad					

Fuente: Elaboración propia (2008)

Anexo 10. Análisis estadístico para la variable respuesta sabor

a) Coeficientes del modelo de regresión completo

	<b>Coeficientes de regresión</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>t (2)</b>	<b>P</b>	
INTERCEPTO	4,1003	1,541	2,660	0,117	n.s.
X <sub>1</sub>	-0,1891	0,240	-0,786	0,514	n.s.
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0227	0,016	1,393	0,298	n.s.
X <sub>2</sub>	-0,9396	0,358	-2,621	0,120	n.s.
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,1792	0,029	6,197	0,025	*
X <sub>3</sub>	43,7382	5,023	8,707	0,013	*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-76,2687	8,400	-9,079	0,012	*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,0438	0,021	-2,100	0,171	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,3551	0,355	1,000	0,423	n.s.
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-2,3674	0,473	-5,000	0,038	*

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

n.s.= No significativo

X<sub>1</sub> = Concentración de salmuera (Be), X<sub>2</sub> = pH inicial, X<sub>3</sub> = Cultivo Láctico

Fuente: Elaboración propia (2008)

b) Análisis de varianza

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO</b>						
<b>promedio :</b>	5,6647	<b>Coef.deDeterminación R<sup>2</sup> :</b>	0,7184			
<b>desviación :</b>	0,2969	<b>Coef. de Variación C.V. :</b>	5,24%			
<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F Calculado</b>	<b>F tabla</b>	
Regresión	1,1245	9	0,1249	1,42	4,77	n. s.
Residuo	0,4408	5	0,0882			
Falta de ajuste	0,4175	3	0,1392	11,96	19,16	n. s.
Error puro	0,0233	2	0,0116			
<b>Total</b>	<b>1,5652</b>	<b>14</b>				
<b>Varianza explicada</b>		<b>:</b>	<b>71,84%</b>			
<b>Máxima Varianza explicada :</b>			<b>98,51%</b>			

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

n. s. = No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

Anexo 11. Análisis estadístico para la variable respuesta color

a) Coeficientes del modelo de regresión completo

	Coeficientes de regresión	Error Estándar	t (2)	p	
<b>INTERCEPTO</b>	1,845	0,617	2,993	0,096	n.s.
X <sub>1</sub>	0,617	0,096	6,412	0,023	*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0,025	0,007	-3,843	0,062	n.s.
X <sub>2</sub>	0,650	0,143	4,533	0,045	*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,087	0,012	-7,494	0,017	*
X <sub>3</sub>	10,947	2,009	5,448	0,032	*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	4,520	3,360	1,345	0,311	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,023	0,008	2,800	0,107	n.s.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-1,989	0,142	-14,000	0,005	*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,265	0,189	-1,400	0,296	n.s.

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad  
n.s.= No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

b) Análisis de varianza

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO</b>					
promedio	: 5,9113	Coef. de Determinación R <sup>2</sup> :	0,9212		
desviación	: 0,1651	Coef. de Variación C.V. :	2,79%		
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculado	F tabla
Regresión	1,5925	9	0,17695	6,49	4,77 *
Residuo	0,1363	5	0,02725		
Falta de ajuste	0,1313	3	0,04375	17,50	19,16 n.s.
Error puro	0,0050	2	0,00250		
Total	1,7288	14			
Varianza explicada		92,42%			
Máxima varianza explicada :		99,71%			

X<sub>1</sub> = NaCl (Be) ; X<sub>2</sub> = pH inicial ; X<sub>3</sub> = Cultivo (g/100 Kg);

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

n.s.= No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

Anexo 12. Análisis estadístico para la variable respuesta textura

a) Coeficientes del modelo de regresión completo

	Coeficientes de regresión	Error Estándar	t(2)	p	
<b>INTERCEPTO</b>	5,1764	1,330	3,892	0,060	n.s.
<b>X<sub>1</sub></b>	-0,0233	0,207	-0,112	0,921	n.s.
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0,0252	0,014	1,796	0,214	n.s.
<b>X<sub>2</sub></b>	0,0459	0,309	0,148	0,896	n.s.
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0,0337	0,025	1,351	0,309	n.s.
<b>X<sub>3</sub></b>	3,0303	4,335	0,699	0,557	n.s.
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	29,1624	7,248	4,023	0,057	n.s.
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	-0,0167	0,018	-0,927	0,452	n.s.
<b>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub></b>	-0,5682	0,306	-1,854	0,205	n.s.
<b>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub></b>	-2,0833	0,409	-5,099	0,036	*

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad  
n.s.= No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)

b) Análisis de varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO						
promedio :	5,6647	Coef. de Determinación R <sup>2</sup> :	0,7184			
desviación :	0,2969	Coef. de Variación C.V. :	5,24%			
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	F tabla	
Regresión	1,1245	9	0,1249	1,42	4,77	n. s.
Residuo	0,4408	5	0,0882			
Falta de ajuste	0,4175	3	0,1392	11,96	19,16	n. s.
Error puro	0,0233	2	0,0116			
Total	1,5652	14				
Varianza explicada	:		71,84%			
Máxima Varianza explicada	:		98,51%			

\* = Significativo al nivel de 5 % de probabilidad

n. s. = No significativo

Fuente: Elaboración propia (2008)