

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INNOVACIÓN



**PROPUESTA DE UN MÉTODO DE FERMENTACIÓN APLICANDO
MICROORGANISMOS NATIVOS Y CLORURO DE SODIO PARA
MANIPULAR LA ACIDEZ DE LA ACEITUNA NEGRA NATURAL**

TESIS

Presentado por:

Br. Claudia Vanessa Clavijo Koc

Asesor:

Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Para Obtener el Grado Académico de:

MAESTRA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INNOVACIÓN

TACNA-PERÚ

2021

Agradecimientos

- Agradecimientos a los Fondos de Fincyt Asociación de Aceite de Oliva y al CITE Agroindustrial de Tacna lugar de elaboración del Proyecto
- A las Biólogas Patricia Lanchipa, Virginia Chipana a la Ing. Martha Gallegos y los colegas que participaron en el proyecto de investigación.
- Al Dr. Daladier Castillo por su apoyo en la revisión y apoyo en los análisis del proyecto.

Dedicatoria

A mi madre.

Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria	iii
Índice de Contenidos	iv
Anexos.....	xvi
Resumen	xvii
Abstract	xviii
Introducción	xix
Capítulo I: El Problema.....	21
1.1 Planteamiento del Problema	21
1.2 Formulación del Problema.....	23
1.2.1 Problema General	23
1.2.2 Problemas Específicos	23
1.3 Justificación del Problema	24
1.4 Objetivos.....	25
1.4.1 Objetivos General	25
1.4.2 Objetivos Específicos	25

Capítulo II Marco Teórico.....	26
2.1 Antecedentes del Problema.....	26
2.2 Bases Teóricas del Cambio Planeado	28
2.2.1 Historia del Olivar	28
2.2.2 El Olivo en el Mundo y el Perú	28
2.2.3 Aceituna.....	29
2.2.4 Variedades de Aceituna en el Perú	29
2.2.5 Tipos de Aceituna	30
2.2.6 Preparación Comercial.....	30
2.3 Definiciones de Conceptos Básicos.....	34
2.3.1 Aceituna mesa.....	34
2.3.2 Fermentación	34
2.3.3 Metabolismo Aerobio.....	34
2.3.4 Heterótrofo.....	34
2.3.5 Quimiorganotrofo.....	34
2.3.6 Respiración	35
2.3.7 Sal Común	35
2.3.8 Halófilos	35
2.3.9 Homofermentativos	35

2.3.10 Heterofermentativos	35
2.3.11 Lactiplantibacillus spp.....	35
2.3.12 Lactiplantibacillus pentosus.....	35
2.3.13 Bacterias ácido lácticas.....	36
2.3.14 Levaduras.....	36
2.3.15 Levaduras Fermentativas	36
2.3.16 Levaduras Oxidativas	36
2.3.17 Recuento de Aerobios Mesófilos Viables	36
2.3.18 Enterobacterias	36
2.3.19 Coliformes	36
2.3.20 pH	37
2.3.21 Cloruros de Sodio	37
2.3.22 Dióxido de Carbono.....	37
2.3.23 Polifenoles	37
Capítulo III: Marco Metodológico	38
3.1 Hipótesis	38
3.1.1 Hipótesis General.....	38
3.2 Variables	38
3.2.1 Variable Independiente.....	38
3.2.2 Indicadores.....	38

Microorganismos Microbianos	38
3.2.3 Variable Dependiente	38
3.2.4 Indicadores.....	39
3.3 Tipo de Investigación:	39
3.4 Nivel de Investigación:	39
3.5 Población de Estudios:.....	39
3.6 Técnicas de Recolección de Datos:	39
3.6.1 Muestreo	39
3.6.2 Estudio Microbiológico de Microorganismos en Salmuera ...	39
3.6.3 Aislamiento de Microorganismos de la Aceituna Natural.....	40
3.6.4 Selección de Microorganismos Para la Fermentación.....	45
3.6.5 Producción de Biomasa. Se realizó el recuento microbiano en cámara de Petroff Hauser, para determinar la cantidad de microorganismos que se obtienen a 35 y 30° C overnight.	45
3.6.6 Preparación de Inóculo	45
3.6.7 Fermentación de la Aceituna Negra Natural.	45
3.6.8 Monitoreo de la Fermentación.....	46
Capítulo IV: Diagnóstico Situacional	50
4.1 Descripción del Problema Focalizado	50
4.1.1 Presentación del Nudo Crítico	50
4.1.2 Características Relevantes del Caso	50
4.2 Análisis de los Factores Críticos.....	51

4.2.1 Causas	51
4.2.2 Consecuencias.....	51
4.2.3 Dificultades a Resolver.....	51
Capítulo V: Propuesta de la Innovación.....	52
5.1 Descripción de la Propuesta.....	52
5.2 Descripción de la Estructura de la Propuesta.....	53
5.3 Descripción de la Viabilidad de la Propuesta	56
Capítulo VI: Los Resultados	57
6.1 Descripción del Trabajo de Campo	57
6.2 Descripción de la Funcionalidad de la Propuesta	57
6.3 Cambios Relevantes de la Aplicación de la Propuesta	57
6.4 Verificación de la Hipótesis.....	58
6.4.1 Estudio Microbiológico, Aislamiento, Identificación y Selección de Microorganismos del Fruto del Olivo y Salmueras	58
6.4.2 Selección de Cepas Microbianas Mediante la Evaluación Bioquímica y Fisiológica de Cepas.....	66
6.4.3 Efecto de los Inóculos Microbianos y Cloruro de Sodio en la Elaboración de Aceituna Negra Natural.....	71
6.4.4 Evolución de Parámetros Físicoquímicos y Microbiológicos en el Proceso de Fermentación De Aceituna Negra Natural Inoculado Con Las Cepas S10A Y M07G.....	81
6.4.5 Evolución de Levaduras	86

6.4.6 Perfil Organoléptico De Los Diferentes Tratamientos Inoculados y Control A Nivel De Laboratorio.....	94
6.4.7 Comparación Sensorial en los Tratamientos a Nivel de Laboratorio.....	100
6.4.8 Validación de la tecnología de inoculación da Aceituna Negra Natural a Nivel de Planta Piloto.....	103
6.4.9 Análisis Sensorial de Aceitunas Inoculadas en Planta Piloto, Fermentación Control y Aceitunas Comerciales.....	113
Capítulo VII: Conclusiones y Recomendaciones.....	119
7.1 Conclusiones.....	119
7.2 RECOMENDACIONES.....	120
7.3 Bibliografía.....	121

Índice de Tablas

Tabla 1 Producción de Dióxido de Carbono de Cepas Microbianas de Aceituna y Salmuera.....	69
Tabla 2 Análisis de Varianza del Análisis Sensorial de Sabor en la Aceituna ..	101
Tabla 3 Análisis de Varianza del Análisis Sensorial de Ácido de Aceituna negra natural Fermentada con Inóculos Microbianos	102
Tabla 4 Códigos de Aceitunas Negras Natural Inoculadas, Control y Comercial	114
Tabla 5 Análisis Sensorial para Determinar el Sabor de la Aceituna en Planta Piloto	114
Tabla 6 Análisis de Varianza de Acidez en Aceituna Negra Natural Fermentada en Planta Piloto	116

Índice de Figuras

Figura 1 Aislamiento, Identificación y Selección de Microorganismos.....	53
Figura 2 Determinación del Efecto de la Inoculación de Bacterias Lácticas y Levaduras	54
Figura 3 <i>Inoculación de Tanques en Planta Piloto</i>	55
Figura 4 Flujograma de Viabilidad de la Propuesta en el Proceso de Aceituna Negra Natural con Menor Acidez	56
Figura 5 Géneros de Hongos Predominantes en el Fruto de la Aceituna Fresca Madura	58
Figura 6 Concentración de Hongos por Parcela.....	59
Figura 7 Análisis Metagenómico de Hongos y Levaduras en Dos Muestras de Salmuera en salmueras de 3,5 % de cloruros y 7 % de cloruros.....	60
Figura 8 Porcentaje de Familias y Especies Bacterianas de muestras de Muestra en salmueras de 3,5 % de cloruros y 7 % de cloruros Analizadas Metagenómicamente	62
Figura 9 Concentraciones de Familias Bacterianas por Muestra	64
Figura 10 Cantidad de Microorganismos Aislados del Ectocarpio de la Aceituna	65
Figura 11 Crecimiento de Cepas Microbianas a Diferentes Concentraciones de Cloruro de Sodio	67
Figura 12 Crecimiento de Cepas Microbianas a Diferentes pH.....	68
Figura 13 Comparación de los Perfiles de Aceitunas Negras Naturales, Inoculadas con la Cepa S10A, M07G, No Inoculadas y Comercial	70

- Figura 14** Diagrama de Pareto de cepa M07G (levadura) S10A (bacterias lácticas) y Cloruro de sodio sobre la acidez al día 4 de la fermentación de la aceituna en salmuera 71
- Figura 15** Diagrama de Pareto de cepa M07G (levadura) S10A (bacterias lácticas) y Cloruro de sodio sobre la acidez al día 91 de la fermentación de la aceituna en salmuera 72
- Figura 16** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio Efecto en el pH al Día 4 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera 73
- Figura 17** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el pH al Día 91 de la Fermentación de la Aceituna En Salmuera..... 74
- Figura 18** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 4 de La Fermentación de la Aceituna en Salmuera..... 75
- Figura 19** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 23 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera 76
- Figura 20** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 91 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera 77
- Figura 21** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras al Día 4 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera..... 78
- Figura 22** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras Día 23 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera..... 79
- Figura 23** Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras Día 91 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera..... 80
- Figura 24** Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control 81

Figura 25 Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	81
Figura 26 Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 9% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	82
Figura 27 Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 7% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	83
Figura 28 Comparación de la Evolución de Bacterias Lácticas a 8% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	84
Figura 29 Comparación de la Evolución de Bacterias lácticas a 9% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	85
Figura 30 Comparación de la Evolución de Levaduras a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	86
Figura 31 Comparación de la Evolución de Levaduras a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	87
Figura 32 Comparación de la Evolución de Levaduras a 9 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	88
Figura 33 Comparación de la Evolución de pH a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	89
Figura 34 Comparación de la Evolución de pH a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	89
Figura 35 Comparación de la Evolución de pH a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control	90
Figura 36 Comparación de la Evolución de la Acidez a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	91
Figura 37 Comparación de la Evolución de la Acidez a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	92
Figura 38 Comparación de la Evolución de la Acidez a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control.....	93
Figura 39 Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 7 % de Sal (C-7)	94

Figura 40 Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 8 % de Sal (C-8)	95
Figura 41 Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 9 % de Sal (C-9)	95
Figura 42 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 7 % de Sal (B-7).....	96
Figura 43 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 8 % de Sal (B-8).....	96
Figura 44 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 9 % de Sal (B-9).....	97
Figura 45 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 7 % de Sal (L-7).....	97
Figura 46 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 8 % de Sal (L-8).....	98
Figura 47 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 9 % de Sal (L-9).....	98
Figura 48 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 7 % (BL-7).....	99
Figura 49 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 8 % (BL-8).....	99
Figura 50 Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 9 % (BL-9).....	100
Figura 51 Comparativo del Sabor de la Aceituna en los Tratamientos	101
Figura 52 Comparativo de la Acidez de la Aceituna en los Tratamientos.....	103
Figura 53 Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 1.....	104
Figura 54 Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 2.....	105
Figura 55 Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 3.....	105

Figura 56 Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque inoculado, Bodega 1.....	106
Figura 57 Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2.....	107
Figura 58 Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 3.....	107
Figura 59 Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 1.....	108
Figura 60 Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2.....	109
Figura 61 Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 3.....	109
Figura 62 Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 1.....	110
Figura 63 Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2.....	111
Figura 64 Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque inoculado, Bodega 3.....	111
Figura 65 Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado.....	112
Figura 66 Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado.....	112
Figura 67 Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado.....	113
Figura 68 Comparación de Sabor Global de Aceituna Negra Natural en Tanque Control y Tanque Inoculado y Aceitunas Comerciales.....	115
Figura 69 Comparación Sensorial de acidez de los tratamientos inoculados con las cepas S10A y M07G, Controles sin Inóculo y Aceituna Comercial.....	116
Figura 70 Comparación de los Perfiles de Aceitunas Negras Naturales, Inoculadas con la Cepa S10A, M07G, No Inoculadas y Comercial.....	118

Anexos

Anexo 1: Matriz de Consistencia	129
Anexo 2: Cambio de Coloración del Epicarpo y Mesocarpo de la Aceituna en Diferentes Estados de Maduración.....	133
Anexo 3: Puntos de Muestreo	134
Anexo 4: Muestreo de la Aceituna.....	138
Anexo 5: Perfil Bioquímico de <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> el Sistema API.....	139
Anexo 6: Plataforma EZ-Bioclaud para identificación de la cepa <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	140
Anexo 7: Caracterización de Hongos Miceliales	141
Anexo 8: Tanques de Fermentación a Escala de Laboratorio.....	153
Anexo 9: Muestreo de Tanque a Nivel en Planta Piloto	154
Anexo 10: Registro Fotográfico del Análisis de Cata de Aceituna Fermentada con la Nueva Tecnología	155
Anexo 11: Registro Fotográfico de Cata de Aceitunas Fermentadas a Nivel de Laboratorio.....	156
Anexo 12: Registro Fotográfico de Jueces Semi-expertos para la Evaluación del Perfil de la Aceituna Negra.....	157
Anexo 13: Metodología de Análisis Sensorial de la Aceituna Desarrollado por El Consejo Oleícola Internacional (COI)	158
Anexo 14: Producción de los Diferentes Compuestos Orgánicos Volátiles en Salmuera de Aceituna Verde Estilo Sevillano, Aplicando Inóculos <i>L. pentosus</i> (T1 y T2), <i>L. plantarum</i> (T3) <i>W. anomalus</i> (T4) y <i>g</i> (T5)	167

Resumen

La fermentación de aceituna negra natural utilizando inóculos microbianos nativos, aislados de salmueras de fermentación de la zona de la Yarada-Los Palos, se realizó un análisis metagenómico de salmueras de aceituna y un estudio de microorganismos cultivables los cuales fueron seleccionados y se inocularon dos tipos de microorganismos *Lactiplantibacillus pentosus* (S10A) y *Wickerhamomyces anomalus* (M07G) a concentraciones de cloruro de sodio de 7, 8 y 9 % de Cloruro de Sodio a nivel de laboratorio, se realizaron los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales y se determinó el efecto de las levaduras sobre la acidez de la aceituna, sin embargo el pH es menor a 3,8 y el sabor de la aceituna es más agradable en aceitunas inoculadas con bacterias lácticas, realizando el análisis de los tratamientos se consideró inocular a nivel de planta piloto con la cepa S10A y la cepa M07G en concentraciones de 10^7 y 10^5 cel/mL respectivamente, a 9 % de Cloruro de Sodio; la fermentación se llevó en tanques de 700 kilos de capacidad de aceituna en tres bodegas diferentes con su respectivo control, se realizaron los análisis microbiológicos, fisicoquímicos y sensorial y se determinó un desarrollo normal de todos los parámetros con un mayor desarrollo de levaduras y menor desarrollo de bacterias lácticas comparado al control, no se detectó ningún microorganismo coliforme y la acidez llegó a 1,4 en los tanques inoculado y 1,8 en los tanques control. Sensorialmente las aceitunas fueron menos ácidas y de mejor aceptación comparadas con el control y aceitunas comerciales.

Palabras Claves: Aceituna, Acidez, Inóculo, Sal

Abstract

The fermentation of natural black olives using native microbial inocula, isolated from fermentation brines from the Yarada-Los Palos area, a metagenomic analysis of olive brines and a study of cultivable microorganisms were carried out, which were selected and two types were inoculated. of microorganisms *Lactiplantibacillus pentosus* (S10A) and *Wickerhamomyces anomalus* (M07G) at concentrations of sodium chloride of 7, 8 and 9% of Sodium Chloride at the laboratory level, physicochemical, microbiological and sensory analyzes were carried out and the effect of the yeasts on the acidity of the olive, however the pH is less than 3,8 and the flavor of the olive is more pleasant in olives inoculated with lactic bacteria, over performing the analysis of the treatments, it was considered to inoculate at the pilot plant level with the strain S10A and strain M07G in concentrations of 10^7 and 10^5 cells / mL respectively, at 9 % Sodium Chloride; The fermentation was carried out in tanks of 700 kilos of olive capacity in three different wineries with their respective control, the microbiological, physicochemical and sensory analyzes were carried out and a normal development of all the parameters was determined with a greater development of yeasts and less development of lactic acid bacteria compared to the control, no coliform microorganisms were detected and the acidity reached 1,4 in the inoculated tanks and 1,8 in the control tanks. Sensorily, the olives were less acidic and of better acceptance compared to the control and commercial olives.

Keywords: Olive, Acidity, Inoculum, Salt

Introducción

La aceituna es el fruto de la planta *Olea europea* var. seviliana L, este fruto es originario del Mediterráneo, es un fruto amargo debido al glúcido oleuropeína, los microorganismos son los encargados de degradar este compuesto, produciendo acidez, bajando el pH, los microorganismos que predominan son en su gran mayoría levaduras y bacterias lácticas que son capaces de desarrollarse a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, las bacterias se pueden desarrollar a concentraciones menores a 8 % y las levaduras son capaces de desarrollarse a concentraciones mayores de sal.

La aceituna negra natural es uno de los productos agroindustriales de mayor exportación de la ciudad de Tacna, sin embargo este proceso es desarrollado en bodegas casi de manera artesanal, donde solamente se hace el seguimiento del pH y los grados de sal durante la fermentación. No se estandariza el proceso de fermentación de la aceituna y en algunas ocasiones se producen anomalías en la fermentación, otra característica de la aceituna negra natural de Tacna es que tienen una alta acidez, lo cual dificulta que la aceituna sea aceptada en otros mercados que consumen alimentos con sabores menos intensos.

Los microorganismos tienen un rol muy importante en el sabor de la aceituna y los parámetros fisicoquímicos en especial la concentración de sal, determinan el tipo de microorganismos que llevará a cabo la fermentación.

En España e Italia principalmente, utilizan microorganismos liofilizados para llevar una fermentación dirigida con un sabor estandarizado y evitar mermas por problemas en la fermentación. Sin embargo, en el mercado internacional básicamente se comercializan microorganismos para aceituna verde estilo sevillano

y para aceituna negra natural no se ha desarrollado un mercado debido a que este tipo de aceituna no se produce a gran escala en Europa, sin embargo están realizando estudios actualmente para producir aceitunas probióticas y las aceitunas que más se ajustan a estas características son las aceitunas negras naturales.

Producir aceituna negra natural es menos contaminante que producir aceitunas verdes estilo sevillanas y a su vez son aceitunas más saludables por su alto contenido de tirosol e hidroxitirosol, antioxidantes que se produce durante la fermentación.

Los microorganismos nativos tienen el potencial de adaptarse a la fermentación debido a que tienen que competir con la flora nativa de la aceituna.

El objetivo de este trabajo es obtener un proceso donde podamos manipular el sabor de la aceituna y sobre todo la acidez para obtener aceitunas que puedan ser exportadas a diferentes mercados.

Capítulo I: El Problema

1.1 Planteamiento del Problema

Existen bacterias lácticas que son utilizadas como inóculos comerciales para la producción de aceituna estilo sevillana, logrando disminuir la merma por defectos de fermentación.

Las aceitunas que se producen mediante el proceso de fermentación natural producen altos niveles de acidez y una merma superior al 9 % la cual varía en diferentes campañas (Gil, 2018). Desarrollar tecnologías de la aceituna negra natural es muy importante debido a que es un producto que se produce solamente en Perú, Chile y algunas partes de Argentina, debido a los elevados costos de producción la producción de aceituna negra natural en España es prácticamente mínimo y se reporta como una industria artesanal.

Existen bacterias lácticas que son utilizadas como inóculos comerciales para la producción de aceituna estilo sevillana, logrando disminuir la merma por defectos de fermentación.

Las aceitunas que se producen mediante el proceso de fermentación natural producen altos niveles de acidez y una merma superior al 10% la cual varía en diferentes campañas. Desarrollar tecnologías de la aceituna negra natural es muy importante debido a que es un producto que se produce solamente en Perú, Chile y algunas partes de Argentina, debido a los elevados costos de producción la producción de aceituna negra natural en España es prácticamente mínimo y se reporta como una industria artesanal.

Existen bacterias lácticas que son utilizadas como inóculos comerciales para la producción de aceituna estilo sevillana, logrando disminuir la merma por defectos de fermentación.

En la actualidad la fermentación no es un proceso estandarizado y no se estandariza la calidad del producto porque no se puede manipular el sabor, textura y acidez. El principal problema de la aceituna negra natural es la acidez y esta característica limita el mercado de exportación de la aceituna a otros mercados como el norte americano y canadiense, no se tienen opciones para producir diferentes tipos de aceitunas, no se puede controlar problemas de fermentación cómo el ablandamiento. Las aceitunas que se producen mediante el proceso de fermentación natural producen altos niveles de acidez y una merma superior al 10% la cual varía en diferentes campañas. Desarrollar tecnologías de la aceituna negra natural es muy importante debido a que es un producto que se produce solamente en Perú, Chile y algunas partes de Argentina, debido a los elevados costos de producción la producción de aceituna negra natural en España es prácticamente mínimo y se reporta como una industria artesanal. La merma de la aceituna de mesa produce pérdidas económicas directas para las empresas es de alrededor de S./ 30.000,00, el acceso a mercados más exigentes en calidad se ve limitados por no cumplir con estándares de calidad requeridos, mayor acceso a mercados que pagan un 30% menos de precio que mercados cómo el americano. Aún no se controlan los procesos fermentativos y post-fermentativos, no se conoce una tecnología óptima para producir inóculos microbianos para ser aplicado a varias toneladas de aceituna negra, hay un limitado control de parámetros en la aplicación de insumos que influyen en la conservación. El escaso conocimiento de técnicas de control de calidad del producto para monitorear el proceso de fermentación y manipular mejor las variables que influyen en el proceso de fermentación.

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 *Problema General*

¿Se puede desarrollar un método de fermentación de aceituna negra aplicando inóculos microbianos nativos y cloruro de sodio para manipular la acidez de la aceituna negra natural?

1.2.2 *Problemas Específicos*

- ¿Cuál es la flora microbiana cultivable y no cultivable de la aceituna y de estas es posible aislar, identificar y seleccionar de la aceituna como fruto natural y de las salmueras para ser utilizado como inóculo?
- ¿Cómo evoluciona la flora microbiana y los parámetros fisicoquímicos en el proceso de fermentación inoculado con cepas nativas?
- ¿Cuál es efecto de la aplicación de cepas nativas de bacterias lácticas y levaduras en el proceso de fermentación de aceituna negra a natural variedad Sevillana, a diferentes concentraciones cloruro de sodio?
- ¿Existen diferencias significativas en el sabor y acidez de la aceituna?
- ¿Se puede validar el proceso a escala piloto en 3 bodegas de la Yarada - los Palos?

1.3 Justificación del Problema

La fermentación de la aceituna negra en Tacna es un proceso natural y no hay estudios suficientes sobre los microorganismos que intervienen en la fermentación y si la aplicación de ellos puede influir en las características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas, a diferencia de los estudios realizados en Europa desde mediados del ciclo anterior. Sin embargo la principal actividad agroindustrial de Tacna con una producción en el año en el año 2019 del 8 % de exportación (Reporte de Comercio Regional, 2020), ha sido realizada de una manera artesanal aplicando la experiencia de los productores y los estudio científicos realizados y la literatura que podemos encontrar se basa en el aspecto fisicoquímico de la fermentación.

Este trabajo ha realizado una investigación básica para conocer la microbiota y la evolución de la fermentación de la aceituna negra natural hasta llegar a una investigación aplicada para la producción de una aceituna negra natural con menor acidez, manipulando los microorganismos para manipular características organolépticas que son requeridas por el mercado nacional e internacional y en un futuro elaborar aceitunas con un valor nutricional lo cual justifica el estudio microbiológico de la aceituna negra natural para obtener un proceso de producción estandarizado.

Para competir con otros mercados es necesario estandarizar la calidad de la aceituna peruana para generar una oferta de aceituna de primera calidad, con mejor precio.

1.4 Objetivos

1.4.1 *Objetivos General*

Proponer un método de fermentación aplicando microorganismos nativos y cloruro de sodio para manipular la acidez de la aceituna negra.

1.4.2 *Objetivos Específicos*

- Estudiar la flora microbiana cultivable y no cultivable, aislar, identificar y seleccionar cepas del fruto de la aceituna y salmueras, para ser utilizadas como inóculo.
- Evaluar el proceso microbiológico y fisicoquímico de los diferentes tratamientos.
- Determinar el efecto de cepas nativas (bacteria láctica y levaduras) en la fermentación de aceituna negra natural var. Sevillana, a diferentes concentraciones cloruro de sodio a nivel de laboratorio.
- Evaluar sensorialmente la acidez y sabor los diferentes tratamientos a nivel de laboratorio.
- Validar un proceso de fermentación aplicando microorganismos nativos en bodegas de la Yarada – Los Palos.

Capítulo II Marco Teórico

2.1 Antecedentes del Problema

El uso de starters o inóculos microbianos en los procesos fermentativos son utilizados en muchos alimentos para lograr estandarizar las características organolépticas y fisicoquímicas del alimento. Se han realizado estudios microbiológicos de la fermentación de la aceituna en muchas variedades, predominando la fermentación de aceitunas verdes, en España e Italia.

En Marruecos se ha realizado el estudio “Propiedades fisicoquímicas y la microflora de las aceitunas de mesa negras marroquíes” observando el desarrollo de la microflora mesófila total, *Staphylococcus sp*, indicadores de contaminación fecal (*Enterococcus sp*, Coliformes totales y fecales), *Salmonella sp*, esporulados (*Clostridium sp* y *Bacillus sp*) y levaduras y mohos, el pH de estas aceitunas se encuentran entre un pH de 6.33 y 4.90 (Asehraou, Faid, & Jana, 1992).

En el artículo “Efecto de la aireación y cloruro de sodio en el desarrollo de parámetros de microflora y fitoquímicos en la fermentación *Olea europaea* L. var. Sevillana en el estilo natural negro en la zona de La Yarada-Tacna”, predominan microorganismos mesófilos *Lactiplantibacillus sp* y Levaduras en concentraciones de 10⁸ ufc/ml y 10⁵ ufc/ml respectivamente con un pH de 3.8 y una acidez promedio de 1.6 mg/100 mL de ácido láctico (Koc, Rospigliosi, Arata, Sepúlveda, & Ochoa, 2013).

Los estudios microbiológicos realizados por de Mourad & Nour-Eddine, (2006) en el trabajo titulado “Estudio microbiológico de aceitunas verdes argelinas fermentadas naturalmente: aislamiento e identificación de bacterias y levaduras del ácido láctico junto con los efectos de las soluciones de salmuera obtenidas al final de la fermentación de la aceituna en *Lactiplantibacillus plantarum*” investigó sobre

los microorganismos que se desarrollan en la fermentación de aceitunas verdes elaboradas al norte de Argelia entre las que se encuentran: coliformes, bacterias aerobias, *Staphylococcus spp*, *Lactiplantibacillus spp*, *Enterococcus spp*, bacterias lipolíticas y bacterias psicrófilas, con un pH final de pH 4.40 la concentración de bacterias del ácido láctico fue predominante junto con las levaduras. Las bacterias del ácido láctico aisladas fueron: *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. lactis subsp. lactis*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*. La especie dominante fue *L. plantarum*. Las levaduras se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida parapsilosis* y al aplicar salmueras como inóculos predominó *L. plantarum*.

Según Arroyo-López et al., (2012), demostró en el artículo titulado “Levaduras en el procesado de aceitunas de mesa: ¿microorganismos deseables o deterioradores?”, que las levaduras son microorganismos que pueden tener un doble papel, causando deterioro en el fruto con producción de malos olores y sabores, acumulación de CO₂ lo que produce hinchazón en los contenedores, la turbidez de las salmueras, el ablandamiento de las frutas y la degradación del ácido láctico, que es especialmente dañino durante el almacenamiento y envasado de aceituna de mesa. Pero por otro lado, afortunadamente, las levaduras también poseen actividades bioquímicas deseables (lipasa, esterasa, β -glucosidasa, catalasa, producción de factores asesinos, etc.), con potencial probiótico en los vegetales, produce antioxidantes y vitaminas, se adhiere a las células intestinales o mantiene la barrera epitelial; la selección de las cepas más apropiadas para ser utilizadas como iniciadores, solo o en combinación con las bacterias del ácido láctico, es una línea de investigación prometedora que se desarrolló en un futuro próximo.

En la tesis titulada “Aplicación de *Lactiplantibacillus spp*. como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes” determinó la importancia de los inóculos con bacterias lácticas en la fermentación de las aceitunas verdes de mesa, sin embargo su desarrollo se ve influenciado por la concentración de temperatura, pH y sal (González, 2018).

En el trabajo realizado por Porru, et al. (2018) titulado “*Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally*

black table olive fermentations”, demuestra la capacidad probiótica de las levaduras mediante estudios moleculares y bioquímicos, las principales especies identificadas fueron *Wickerhamomyces anomalus* and *Nakazawaea molendini-olei*, albeit, *Candida diddensiae*, *Candida boidinii*, *Zygorulasporea mrakii*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

En el “Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de compuestos químicos de importancia sensorial”, indicó que esta levadura fermenta sucrosa y sacarosa, produce $5.81 \pm 0,1$ % v/v de etanol y ácido acético hasta $4.2 \pm 0,3$ g/L (Escalante, Rychtera, Melzoch, Polo, & Sakoda, 2012).

2.2 Bases Teóricas del Cambio Planeado

2.2.1 Historia del Olivar

El árbol del olivo se remonta al libro del Génesis, su cultivo se asocia para la extracción de aceite de oliva desde el paleolítico en Creta entre 5000 a 3500 a.C.

Algunos historiadores como Kaloguería, Priego, Molinari, entre otros, reportan que el origen del olivo se encuentra entre Persia, el Valle del Nilo o el Valle del Jordán, sin embargo la mayoría coincide que proviene de Mesopotamia (Estrada, 2011).

Vaughn (como se citó en Fernández, et al., 1985), describe que la cita más antigua de la fermentación de la aceituna se remonta al siglo primero de nuestra era como lo reporta el historiador Columella en el año 54 D.C.

2.2.2 El Olivo en el Mundo y el Perú

El nombre científico del olivo es *Olea europea* L., pertenece a la familia de las Oleáceas y al orden de los Ligustales, crece en condiciones climáticas desde los 6 a 40° C y se encuentra en latitudes 30° y 45°, en ambos hemisferios. (Estrada, 2011).

El Mediterráneo es la zona natural del olivo, pero se ha extendido en zonas de América del Sur en los países de Chile, Argentina y Perú, como también en México, Estados Unidos y Australia (Fernández et al., 1985).

Las crónicas señalan que el olivo llega al Perú con la conquista española desde Sevilla en 1559 adaptándose desde Ica hasta Tacna y posteriormente al norte entre Huaral y Huacho (Guevara, 2015).

El olivo es un árbol que crece en suelos fértiles, las flores son pequeñas de color blanco y su fragancia es intensa, tiene hojas permanentes y su tronco es leñoso con surcos retorcidos y muchas ramificaciones (Estrada, 2011).

2.2.3 Aceituna.

Fernández (1985) teniendo en cuenta los estudios de (Green y Wickens, 1989; Lavee et al., 2000; Vavilov., 1951; Amane et al., 2000; Hess et al., 2000; Rallo et al., 2003), define a la aceituna como el fruto del olivo (*Olea europea* L.), perteneciente a la División Magnolioifitos, clase Magnoliales, de la subclase Asteridaes, orden de las Olales, familia Olaceae, Son de forma ovoide, tiene un tamaño medio de 1 a 4 cm de longitud y de 0,6 a 2 cm de diámetro, dependiendo de la variedad. Al inicio son de color verde, y a medida que maduran se tornan negros, por la síntesis de antocianina. Se puede obtener aceite, aceituna deshidratada o procesarla para aceituna de mesa para consumo directo y a partir de ésta, derivarla a aceituna rellena, pasta de aceituna, entre otros. Existen otros mercados como el norteamericano que consume aceituna negra obtenida por proceso de oxidación.

2.2.4 Variedades de Aceituna en el Perú

Las variedades de olivo son en su mayoría de origen europeo y provienen especialmente de España, Italia y Portugal. Guevara (2015), cita a Diaz quien indica que las principales variedades cultivadas en el Perú son la Sevillana, Ascolana y Liguria.

En Tacna se cultivan variedades aceiteras y para aceituna de mesa, siendo la más utilizada la variedad Sevillana, también conocida como “criolla”, también se produce en otros lugares: Huaral, Ica, Pisco, Bella Unión, Yauca la Ensenada, Mejía, Mollendo e Ilo, los árboles son de tamaño grande, y el fruto de color negro-morado intenso a la madurez (Guevara, 2015).

2.2.5 Tipos de Aceituna

Según el Codex-66-1981(2013) y el COI (2004), definen los siguientes tipos de aceituna:

a) Aceitunas verdes: Frutos recogidos durante su periodo de madurez, antes del envero y cuando han alcanzado un tamaño normal.

b) Aceitunas de color cambiante: frutos recogidos antes de su completa madurez, durante el envero.

c) Aceitunas negras: Frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella.

2.2.6 Preparación Comercial

El COI (2004) y el Codex 66-1981 (2013) definen las siguientes preparaciones de la aceituna: en aceitunas aderezadas, aceitunas al natural, aceitunas verdes al natural, aceitunas deshidratadas y aceitunas oxidadas. Las aceitunas al natural: aceitunas verdes, de color cambiante o negras tratadas directamente con una salmuera, donde sufren una fermentación total o parcial, y conservadas con o sin acidificantes.

La técnica convencional de fermentación de vegetales, que generalmente utiliza la industria, es bastante empírica y se basa en la fermentación espontánea debida a la carga microbiana que lleva el producto. El crecimiento microbiano durante este proceso ha sido dividido en cuatro etapas bien definidas: (1) iniciación, que suele incluir el desarrollo de muchos microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos presentes originalmente en los vegetales y en todo tipo de material en contacto con éstos; (2) fermentación primaria, que implica crecimiento de bacterias ácido lácticas con o sin desarrollo de levaduras fermentativas; (3) fermentación secundaria, que se caracteriza por el crecimiento de levaduras fermentativas a partir de la materia fermentable que permanece después de que el desarrollo de las bacterias ácido lácticas resulta inhibido por los bajos valores de pH; (4) post-fermentación, que tiene lugar después de consumirse la materia fermentable y se caracteriza, en general, por el crecimiento de microorganismos oxidativos en la superficie de la salmuera cuando ésta se encuentra expuesta a la atmósfera (Fleming, 1982).

Según Gallegos (2005), la fermentación de la aceituna negra natural estilo botija, se realiza con la recolección del fruto en un estado de madurez de 4,5 a 6, este índice de madurez se mide por la intensidad del color de verde a violáceo oscuro (Anexo 02).

2.2.6.1 Cosecha. La cosecha de la aceituna negra se realiza con un estado de madurez entre 4 a 5 y se realiza la recolección durante todo el día para ser procesada en la tarde o al día siguiente a primera hora para evitar el enmohecimiento del fruto.

2.2.6.2 Preparación de Salmuera. Se utiliza agua potable para disminuir la carga microbiana y patógenos, se agrega sal en porcentajes variados entre 6 a 15 % de sal, la concentración se mide en grados boum , se puede adicionar ácido acético o ácido láctico al 0,1 o 0,2 %, los tanques se llenan a los $\frac{3}{4}$ de la preparación.

2.2.6.3 Fermentación. Los frutos se agregan a un tanque diseñado especialmente para eliminar los gases producto de la fermentación, el proceso fermentativo se produce de manera natural, donde la sal selecciona el crecimiento microbiano, los cuales degradan la oleuropeina, producen ácido y otros compuestos orgánicos que confieren las características de la aceituna, la fermentación dura entre 3 a 4 meses.

2.2.6.4 Cloruro de Sodio en el Proceso Fermentativo. La sal industrial es un insumo esencial para el proceso fermentativo, la mayor parte de microorganismos patógenos no crecen en concentraciones elevadas de cloruro de sodio, sin embargo favorece el desarrollo de bacterias lácticas y levaduras, estos microorganismos producen en mayor cantidad ácido láctico, metabolito homofermentativo del género *Lactiplantibacillus sp*, y las levaduras son organismos heterofermentativos que producen diferentes compuestos como el etanol y el CO₂ y subproducto como el diacetilo, ácido acético, acetona entre otros, dando aromas característicos de un alimento fermentado La concentración de sal es el factor más importante en el desarrollo de los microorganismos concentraciones entre 3 % a 6 % se desarrollan las bacterias ácido lácticas y superiores inhibe su

desarrollo creciendo solamente levaduras (Madigan, Martinko y Parker, 2003), (Fernández, 1985) y (Sanchez, García y Rejano; 2006).

2.2.6.5 Microorganismos en la Fermentación de la A Negra Natural.

Los microorganismos que se desarrollan en los procesos de fermentación de la aceituna son muy variados, depende principalmente del procesamiento y la variedad de la aceituna, En la aceituna negra natural descrita por Durán y González (1973), colocan las aceitunas a concentraciones de sal (cloruro de sodio) de 10%, la sal difunde al fruto y se estabiliza entre 7 a 8 %, se reporta un elevado porcentaje de bacterias gramnegativas del grupo de los coliformes y levaduras, las bacterias ácido lácticas son muy escasas, durante los primeros días predominan las bacterias gramnegativas y pueden producir el alambrado o gas pocket, el cloruro de sodio inhibe el desarrollo de clostridios y bacterias propiónicas, las cuales pueden desarrollarse a la baja acidez en las primeras semanas. Se forman velos superficiales de levaduras y de mohos que pueden producir actividad pectinolítica ablandando el fruto.

Los lactobacilos, pueden crecer a concentración altas de polifenoles, y con capacidad de degradarlos (Ghabbour et al., 2011), sin embargo, los reportes de acidez mayores a 2 % en las aceitunas de nuestra zona nos indica que los microorganismos que podrían predominar son los lactobacilos, en estudios realizados por Bernabé (2000), reporta el desarrollo de bacterias ácido lácticas en fermentaciones a nivel de laboratorio. Durán, Romero, García , Brenes y Garrido (1997), comprueban el crecimiento de bacterias lácticas en la fermentación de la aceituna cuando el porcentaje de sal es menor a 8 % y depende de la concentración de polifenoles que contenga el fruto, produciendo ácido láctico en concentraciones.

2.2.6.6 Parámetros Fisicoquímico en la Aceituna Negra Natural.

Los parámetros fisicoquímicos es la acidez expresada en porcentaje de ácido láctico, pH y concentración de sal medidos en grados boumé, en la variedad lechín, en Sevilla, la fermentación de la aceituna negra natural llega a pH 4,70 a 4,40 en relación con la concentración de cloruros que fluctuaron entre 8,9 y 9% con una acidez libre de 0,6 % expresada en ácido láctico. En las aceitunas negras naturales, reporta

Gallegos (2005), una acidez cercana a 2 % con un pH de 3,5 a 3,8, los grados boumé se mantienen en 8°.

2.2.6.7 Defectos y Merma de la Aceituna negra natural. Textura: Una de las principales causas de pérdida de textura en la aceituna es el aspecto de un ojo de pescado y de ahí su nombre en inglés, fish eye. Al final, las bolsas son tan grandes que la densidad de la aceituna se reduce y los frutos deteriorados flotan en la parte superior del envase. En este punto, la textura del fruto está completamente degradada. El crecimiento de las bacterias lácticas en el proceso tradicional se considera circunstancial, pero en nuestro medio se puede decir que es una constante por la acidez que desarrolla el producto ya que sólo aparecen cuando los niveles de sal en la salmuera descienden por debajo de 8 - 8,5 por 100. Esta diferencia de comportamiento está relacionada, probablemente, con las características fisicoquímicas del fruto. La población láctica está compuesta por especies de los géneros *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Los dos últimos indicados son bacterias cocáceas, que desaparecen antes debido a una menor tolerancia a la acidez que los lactobacilos producen. En cuanto a las levaduras, que crecen durante todo el proceso fermentativo, se desarrollan desde las primeras fechas y alcanzan su máximo entre los 10 y 25 días aproximadamente de colocación de las aceitunas en salmuera. Cuando existe desarrollo de la población láctica se aprecia paralelamente una disminución de la población de levaduras, lo que indica que existe una competencia entre ambos tipos de microorganismos (Rodríguez de la Borbolla, 1972). Las bacterias lácticas tienen un antibacteriano llamado plantaricina, el cuál actúa contra otros microorganismos que pueden alterar la fermentación. (Rufino, 2002). La fermentación se realiza en condiciones aeróbicas, actuando microorganismos metabólicamente aeróbicos. Contar con una tecnología que influya en reducir la merma de la aceituna de mesa negra es una tecnología incremental o de mejora, ya que no se está produciendo un nuevo producto, sin embargo, mejorar la calidad de la aceituna permitirá a la empresa acceder a mercados más competitivos, disminuir las pérdidas económicas por mermas. La empresa trabajó mediante una tecnología más estandarizada, disminuyendo los riesgos de producción de la aceituna, manipular y controlar las variables que

intervienen en el proceso que intervienen en la fermentación y la conservación de la aceituna de mesa negra, es importante generar un conocimiento que sea replicado en la zona para mejorar la calidad de aceituna de los demás productores de la zona. Los defectos de la aceituna son las características desagradables o que no son características del producto, en el COI (2004) se detallan los parámetros de las fermentación anormal donde se ha considerado el olor y sabor a pútrida, butírica, moho, rancio, cocinado, jabonoso, metálico y tierra, mientras que parámetros favorables son los atributos a salado, ácido y amargo; las sensaciones quinestésicas son dureza, fibrosidad y crujiente.

2.3 Definiciones de Conceptos Básicos

2.3.1 *Aceituna mesa*

Según la norma COI (1980), reportada por Fernández (1985), define “aceituna de mesa, al fruto de variedades del olivo (*Olea europea* var. sativa L.), sano cogido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal, que, sometido a las preparaciones adecuadas, de un producto de consumo y de buena conservación como mercancía comercial”.

2.3.2 *Fermentación*

Catabolismo de conceptos en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación oxidativa (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

2.3.3 *Metabolismo Aerobio.*

Microorganismo capaz de usar O₂ en la respiración (Madigan, et al., 2003).

2.3.4 *Heterótrofo.*

Organismo que requiere compuestos orgánicos como fuente de carbono. (Madigan, et al., 2003).

2.3.5 *Quimiorganotrofo.*

Organismos que utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía (donador de electrones) (Madigan, et al., 2003).

2.3.6 Respiración

Proceso en el que un compuesto es oxidado con O₂ o un sustituto de O₂ funciona como aceptor terminal de electrones, usualmente acompañado de producción de ATP vía fosforilación oxidativa (Madigan, et al., 2003).

2.3.7 Sal Común

Es la sal utilizada para la alimentación humana, es el cloruro de sodio.

2.3.8 Halófilos

Microorganismos que soportan concentraciones elevadas de sal, se pueden subdividirse en halófilos extremos, halófilos moderados y halotolerantes (Madigan, et al., 2003).

2.3.9 Homofermentativos

Microorganismos que convierten la glucosa en un solo compuesto que es el ácido láctico (Madigan, et al., 2003).

2.3.10 Heterofermentativos

Microorganismos que convierten la glucosa en más de un compuesto, como el etanol, dióxido de carbono y otros compuestos (Madigan, et al., 2003).

2.3.11 *Lactiplantibacillus spp*

Bacterias grampositivas, no esporuladas que producen en mayor proporción ácido láctico producto de la fermentación de carbohidratos (Frazier y Westhoff, 1993). Son bacterias que grampositivas, bacilares, cocoides y cocobacilares, no esporuladas, catalasa negativa y con la capacidad de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico principalmente (Madigan et al., 2003). Este género comprende 261 especies, hasta marzo de 2020 y ha sido recalificado según su genoma y filogenia de aminoácidos además por su hospedador y características bioquímicas, el género *Lactobacillus* en 25 géneros, incluido el género *Lactobacillus* que se han denominado el *Delbrueckii Lactobacillus* grupo, *Paralactobacillus* y 23 nuevos géneros. (Zheng et al., 2020)

2.3.12 *Lactiplantibacillus pentosus*.

Antes llamado *Lactobacillus pentosus*, aislado de vegetales fermentados y asociado a degradar la oleuropeína y en los últimos reportes considerada una

bacteria con propiedades pro bióticas por su capacidad antiinflamatoria del tracto digestivo y respiratorio. (Garcia-Gonzalez et al., 2021)

2.3.13 Bacterias ácido lácticas

Son bacterias que grampositivas, bacilares, cocoides y cocobacilares, no esporuladas, catalasa negativa y con la capacidad de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico principalmente (Madigan, et al., 2003).

2.3.14 Levaduras

Microorganismos pertenecientes al reino fungi y a la clase ascomicetae, pertenecen a diferentes géneros y especies, su característica principal es que pueden tener metabolismo fermentativo y sus estructuras celulares es muy simple formando células individuales o pseudomicelios (Madigan et al., 2003).

2.3.15 Levaduras Fermentativas

Son las levaduras que producen principalmente etanol y CO₂, en condiciones anaeróbicas, predominan las especies *Sacharomyces* spp (Leveau y Bauix, 2000).

2.3.16 Levaduras Oxidativas

Las levaduras oxidativas, como *Pichia membranaefaciens*, producen niveles de acetaldehído, ésteres y ácido acético (Leveau y Bauix, 2000).

2.3.17 Recuento de Aerobios Mesófilos Viables

Es el recuento de todos los microorganismos capaces de crecer en un medio con compuestos orgánicos, glucosa y peptona en mayor concentración, se incuban a temperaturas mesófilas entre 29° a 35° C en condiciones aeróbicas (Frazier y Westhoff, 1993).

2.3.18 Enterobacterias

Son bacterias gramnegativas, no esporuladas provenientes del tracto intestinal de los animales y humanos, son anaerobios facultativos y fermentan la glucosa, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. (Frazier y Westhoff, 1993).

2.3.19 Coliformes

Es un grupo de enterobacterias que tienen la capacidad de fermentar la lactosa, las bacterias más representativas de este grupo es *Escherichia coli* (Frazier y Westhoff, 1993).

2.3.20 *pH*

Es la concentración de los iones hidrógeno, intervienen en el crecimiento de los microorganismos, el pH intrínseco y extrínseco de los alimentos es uno de los principales factores que influye en el tipo de microorganismos que se desarrolla en un alimento (Frazier y Westhoff, 1993).

2.3.21 *Cloruros de Sodio*

Conocida como sal común, es necesario para la vida, se encuentra en minas, es utilizado como un aditivo alimentario en un 2 % y utilizado para la fermentación de alimentos (Feldman, 2005).

2.3.22 *Dióxido de Carbono*

Conocido como también como anhídrido carbónico es el producto de la fermentación o respiración de los organismos y por la combustión de compuestos orgánicos (Feldman, 2005).

2.3.23 *Polifenoles*

Los polifenoles son compuestos fitoquímicos secundarios al metabolismo de las plantas, son componentes de la aceituna y su concentración influye en el desarrollo de la flora microbiana en la fermentación (Arslan y Özcan, 2011).

Capítulo III: Marco Metodológico

3.1 Hipótesis

3.1.1 *Hipótesis General*

Se propone un método de producción de aceitunas inoculadas con microorganismos al 9 % de cloruro de sodio, que tienen un efecto en la acidez, sensorialmente y en los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos.

3.2 Variables

3.2.1 *Variable Independiente*

Bacterias lácticas

Levaduras

Cloruro de Sodio

3.2.2 *Indicadores*

Microorganismos Microbianos

Porcentaje: %

3.2.3 *Variable Dependiente*

Parámetros fisicoquímicos (pH, acidez)

Parámetros microbiológicos (BAL, levaduras y enterobacterias)

Características organolépticas (salado, amargo y sabor general)

3.2.4 Indicadores

pH: mV

acidez: g/100 mL

3.3 Tipo de Investigación:

Aplicada

3.4 Nivel de Investigación:

Cuantitativa – Explicativa

3.5 Población de Estudios:

Aceitunas de la zona de la Yarada-Los Palos.

3.6 Técnicas de Recolección de Datos:

Experimental-Prospectivos-Longitudinal

3.6.1 Muestreo

Se realizó la recolección de la aceituna en diferentes zonas de la Yarada, los puntos de muestreo (Anexo 3), donde se realizaron con un muestreo aleatorizado estratificado; se tomó 1 kilo de fruto fresco y se muestreó las salmueras que se encontraron en la zona más cercanas del punto de muestreo, como se especifica en el Anexo 4.

3.6.2 Estudio Microbiológico de Microorganismos en Salmuera

Se realizó un estudio del tipo de microorganismos que predominan en la salmuera de la aceituna con aproximadamente 7 meses de fermentación, con la finalidad de aislar bacterias lácticas y levaduras que soportan una alta concentración de sal y ácido láctico, se realizaron 3 diluciones de la salmuera para realizar el estudio de los microorganismos, posteriormente se realizaron los mismos procedimientos detallados en el ítem de Aislamiento de microorganismos de la aceituna negra natural.

3.6.3 Aislamiento de Microorganismos de la Aceituna Natural

3.6.3.1 Dilución de la Muestra. Se tomaron 100 gramos de aceituna de cada muestra y se colocó en un frasco de tapa azul con solución salina al 0,85 % se agitó vigorosamente para homogenizar la muestra y los microorganismos se desprendan de la superficie del fruto.

3.6.3.2 Aislamiento e Identificación de Microorganismos. El aislamiento de los microorganismos se realizaron de muestras de aceituna fresca y de salmuera de aceitunas de 6 a 7 meses de fermentadas.

3.6.3.3 Bacterias ácido lácticas. El aislamiento de microorganismo del fruto se realizó filtrando 100 mL de una solución de lavado con solución salina al 0,85% y 25 g de aceituna en un sistema de filtración al vacío, utilizando una membrana de filtración de 0,45 μm , posteriormente se sembró en Agar MRS y Agar Rogosa, repicar las colonias de color blanco mate de aproximadamente de 0,1 a 0,5 μm . El aislamiento de microorganismos de salmueras de fermentación se realizaron haciendo diluciones de la salmuera al décimo hasta llegar a la dilución 10^{-4} , y se sembró por el método de disseminación de Agar MRS y Agar Rogosa, repicar las colonias de color blanco mate de aproximadamente de 0,1 a 0,5 μm .

3.6.3.4 Identificación de Levaduras Mediante el Sistema API 20 AUX. Es un sistema para la identificación precisa de las levaduras más frecuentes. La galería API 20 AUX está constituido por 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y permiten actuar 19 ensayos de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semi agar y las levaduras crecen solamente si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. La lectura de estas reacciones se realiza por comparación con los testigos de crecimiento y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo analítico o del Software de identificación.

Se reunió el fondo y la tapa de una cámara de incubación y se repartió aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada, libre de cloro, en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda, se inscribió la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. Se retiró la galería de su envase individual para depositarla en la cámara de incubación.

Se suspendió la colonia en estudio en una solución de 2 ml NaCl 0,85%, la suspensión microbiana se comparó con un patrón de McFarland N° 2. Luego se abrió una ampolla de API C medio y se transfirió 100 microlitros de la suspensión microbiana, esta suspensión se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas.

Las cúpulas que contienen los reactivos de identificación se llenaron con la suspensión del API C, evitando la formación de burbujas y colocando la suspensión logrando que llene las cúpulas de forma horizontal o un poco convexa pero sin concavidad. Finalmente se cerró la cámara de incubación y se incubó de 48 a 72 horas a 29 °C. Después de las 48 a 72 horas se observó crecimiento en de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la del control nos indicó una reacción positiva y se anotó en la hoja de resultados. Se determinó la presencia de hifas (micelio o pseudomicelio), la identificación se obtuvo a partir del perfil numérico, para determinar el perfil numérico se separan tres grupos y se asignó para cada uno un valor 1,2 o 4. Sumando al interior de cada grupo los números que correspondieron a reacciones positivas, se obtuvo 7 cifras que constituyen el perfil numérico. Con ayuda del catálogo analítico se localizó el perfil numérico en la lista de los perfiles, utilizando el programa API web TM. Se introdujo manualmente por teclado el perfil numérico de 7 cifras.

3.6.3.4.1 Identificación Bioquímica de Bacterias Ácido Lácticas. Para su identificación se realizó la prueba de coloración Gram, prueba de la catalasa, prueba de coloración de esporas y la prueba para determinar si el microorganismo es homofermentativo o heterofermentativo, posteriormente las colonias fueron identificadas mediante el Sistema API CH 50, kit basado en la fermentación de 50 carbohidratos.

El API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API 50 CH se utilizó en combinación con el API 50 CHL Medium para la identificación de los *Lactobacillus*. La galería API 50 CH está compuesta por 50 microtubos y permite el estudio de la fermentación de sustrato,

perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos). Los ensayos de fermentación se inocularon con API 50 CHL Medium que rehidrata los substratos. Durante el período de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador del pH del medio. El primer tubo, sin principio activo sirve como testigo negativo, los materiales que se utilizan en el kit consta de aceite de parafina, McFarland Standard, Programa informático de identificación, pipetas, gradilla para ampolla, protege-ampollas, Escobillones/torundas, equipo general de laboratorio y el medio de inoculación: API 50 CHL.

Cada galería está constituida por 5 filas conteniendo cada una 10 tubos numerados, Se preparó una cámara de incubación (fondo o tapa) y se anotó la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No hacerlo sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación)

Se repartió 10 ml de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda y cada una de las filas de su embalaje se separó en dos las filas 0-19 y 20-39 y se colocaron en el fondo de la cámara de incubación hasta completar la galería con la fila 40-49.

Se cultivó el microorganismo sobre en Agar MRS adecuado para su crecimiento y se verificó la pureza de la cepa.

Se tomó este cultivo mediante escobillón en un medio sólido, o mediante la centrifugación en un medio líquido. Se preparó el inóculo en el medio apropiado y esta suspensión se utilizó de manera inmediata.

Se repartió la suspensión bacteriana con la ayuda de una pipeta estéril en los 50 tubos de la galería, teniendo en cuenta las precauciones siguientes: Se inclinó ligeramente hacia delante la cámara de incubación. Se evitó la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula. Cuando sólo se inoculó el tubo, no rebasó el límite superior del mismo con el fin de conservar una buena anaerobiosis.

Cuando el tubo y la cúpula se debieron llenar completamente, para evitar la formación de un menisco cóncavo o convexo.

Se incubó las galerías a la temperatura óptima de crecimiento del grupo de microorganismos estudiados: 30 °C.

La lectura de las galerías se realizó con tiempos de incubación definidos (24 H, 48 H), dependiendo del microorganismo y del tipo de reacción estudiada.

Las Interpretación de cada ensayo positivo (+), negativo (-), dudoso (?) y se anotó en la hoja de resultados, (Anexo 5).

El perfil bioquímico así constituido sirvió para la identificación de los *Lactobacillus* y microorganismos próximos, con la ayuda de un programa informático de identificación.

3.6.3.4.2 Identificación Molecular de Bacterias Ácido Lácticas. Se envió a secuenciar el gen 16S Ribosomal, utilizando el primer universales Revers 907, la identificación se realizó enviando la cepa aislada y purificada y se analizó utilizando el programa EZ-Biocloud y Blast (NCBI) (Anexo 6).

3.6.3.4.3 Aislamiento e Identificación de Microorganismos Bacterias Aerobias Mesófilos: Se sembró 0,1 mL de la solución en Agar Nutritivo mediante la técnica de diseminación, se clasificarán las colonias según su morfología.

3.6.3.4.4 Bacillus sp: Se tomaron las colonias del medio Agar Nutritivo y se realizó la prueba de catalasa, posteriormente se procedió a la coloración de esporas y coloración Gram, se repicó en Agar Nutritivo + Almidón 0,1 % para determinar si las bacterias son productoras de amilasas.

3.6.3.4.5 Cocos Gram Positivos. Se tomaron las colonias del medio Agar Nutritivo y se realizó la prueba de la catalasa y coloración Gram, si las colonias son cocos gram positivos se sembraron en Agar Sangre y Agar Manitol Salado.

3.6.3.4.6 Enterobacterias. Se aislaron colonias del Agar McConkey, que tuvieron morfología bacilar negativas al Gram, se repicaron las colonias en Agar MacConkey y se clasificaron en bacterias lactosa negativa y lactosa positivas mediante el color de las colonias, se realizó la prueba de la oxidasa y se repicaron en Agar TSI, LIA, Citrato, Indol, Voges Proskauer y Rojo de metilo, para

determinar las enterobacterias más representativas: *E.coli*, *Enterobacter sp* y *Proteus sp*

3.6.3.4.7 *Salmonella sp* y *Shigella sp*: Se inoculó 25 g de aceituna en 250 ml de agua peptonada al 1%, se incubó a 35° C por 18 a 20 horas, se sembró 0,1 ml de la muestra incubada en Caldo Tiosulfato y Caldo Selenito y se incubó a 43° C por 20 horas, posteriormente se tomó una asada de cada tubo y se sembró por la técnica de agotamiento en los medios MacConkey, Agar Bilis Verde Brillante y Agar Selenito, incubar por 24 horas a 37° C y seleccionar las colonias típicas a *Salmonella* en cada medio de cultivo, posteriormente se sembró las colonias en Agar TSI y LIA tomar como positivo las colonias que dieron K/A y K/A en los tubos respectivamente, con mayor probabilidad de ser *Salmonella sp* los tubos que producen sulfuro de hidrógeno y gas, finalmente confirmar con sueros de antígeno somático O y antígeno somático H.

3.6.3.4.8 *Bacterias Anaerobias*: Se sembró 1 mL de muestra en Caldo Tioglicolato, el tubo se calentó a 80° C por 10 minutos y se incubó a 37°, en condiciones anaeróbicas, cubriendo el tubo con aceite mineral y una atmósfera de CO₂ a 30%, se realizó la coloración de Gram, coloración de esporas, y la prueba de catalasa.

3.6.3.4.9 *Identificación Bioquímica de Clostridium Sulfito Reductores.*
***Clostridium sulfito reductores*:** Se tomó las colonias que crecerán en el tubo con Caldo Glicolato de preferencia las colonias de color negro y se sembró en Agar Sulfito Reductores en cámara de anaerobiosis a 30 % de CO₂.

3.6.3.4.10 *Aislamiento de Hongos Filamentosos y Levaduras.* Se inoculó 0,1 mL de muestra diluida y sembrar por la técnica de diseminación en Agar Papa Dextrosa + Cloroanfenico, incubar por 5 días a 28° C.

3.6.3.4.11 *Identificación de Hongos y Levaduras*: El aislamiento de hongos filamentosos y levaduras se realizó haciendo diluciones al décimo y se sembró en Agar Papa Dextrosa más cloroanfenicol (APD+ C), incubando por 28° C por 5 días, se purificó en APD+C, hasta obtener colonias purificadas.

Los hongos se identificaron hasta género utilizando claves taxonómicas utilizando la técnica de la cinta pegante y caracterización de colonia (Anexo 7), para el caso de la identificación de levaduras se realizó utilizando el Sistema API AUX 20 CH. Se repicó las colonias para su purificación y se realizó la caracterización de las colonias y posteriormente se realizó la técnica de la cinta adhesiva para observar la morfología microscópica de los hongos, identificar hasta género siguiendo el corrido de claves de identificación de hongo.

3.6.4 Selección de Microorganismos Para la Fermentación

Las bacterias lácticas y levaduras se seleccionaron realizando las siguientes pruebas fisiológicas.

3.6.4.1 Resistencia a Diferentes Concentraciones de Cloruro de Sodio. Las colonias se repicó en caldo glucosa peptona (levaduras) y caldo MRS (bacterias lácticas) a concentraciones de 0 %, 9 % y 15 % de cloruro de sodio.

3.6.4.2 Resistencia a Diferentes pH. Las colonias se repicó en caldo glucosa peptona (levaduras) y caldo MRS (bacterias lácticas) a pH de 1, 2, 3, 4.

3.6.4.3 Producción de CO₂ a Partir de la Glucosa. Se inoculó las colonias en caldo glucosado (levaduras) y caldo MRS (bacterias lácticas) en tubos de fermentación con campana de Durham y se verificó la cantidad de gas acumulado en la campana.

3.6.5 Producción de Biomasa. Se realizó el recuento microbiano en cámara de Petroff Hauser, para determinar la cantidad de microorganismos que se obtienen a 35 y 30° C overnight.

3.6.6 Preparación de Inóculo

El inóculo se preparó en Caldo Glucosa Extracto de levadura incubado por 18 horas a 35° C, se inocula hasta llegar a una concentración final de 10⁷ ufc/mL, en la salmuera.

3.6.7 Fermentación de la Aceituna Negra Natural.

Cosecha de Aceituna: Los frutos procesados serán de la variedad Sevillana o criolla, (*Olea europaea* L), recolectados con un índice de madurez de 4,5 - 6 (COI, 1985), a inicios del mes de junio.

La preparación de salmuera se trabajó en tanques pequeños de 12 kilos de aceituna en 8 litros de salmuera en tanques de fibra de vidrio con tapa con agujeros para eliminar el gas producido en el proceso de fermentación (Anexo 8).

La fermentación de aceituna negra a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, aplicando cepas microbianas. Se realizó un análisis factorial 2k, los factores serán tipo de microorganismos y concentración de sal.

3.6.8 Monitoreo de la Fermentación

3.6.8.1 Toma de muestra. Se tomó 500 mL de salmuera de la parte media de cada tanque de fermentación, tener en cuenta las normas de asepsia para evitar contaminación cruzada, para ello se deberán utilizar frascos y mangueras estériles, mechero y el personal deberá contar con guantes, barbijo, gorro y mandil (Anexo 9).

3.6.8.2 Análisis Microbiológicos. La muestra se prepó según (ICMFS, 1992).- Para realizar recuentos microbianos es necesario diluir la muestra, para ello es necesario preparar una solución de dilución como el agua peptonda estéril a una concentración de 0,1 %, pesar 1 g de peptona de marca Merck en agua bidestilada, dispensar 90 mL en un matraz de vidrio borosilicato y en siete tubos dispensar 9 mL a cada uno, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C; posteriormente realizar diluciones con una micropipeta de 1 000 a 10 000 microlitros para obtener la décima parte, para ello la primera dilución es 90 mL de agua peptonada y 10 mL de muestra y mezclar vigorosamente con un agitador vortex a 3000 rpm obteniendo una dilución a la décima o también se le denomina dilución 10-1, luego tomar un mililitro de la primera dilución con una micropipeta de 100 a 1000 microlitros (μL) y agregar a un tubo con 9 mL de agua peptonada esterilizada y de esa manera se obtiene una dilución al centésimo o 10-2, y así sucesivamente se pueden realizar diluciones hasta 10-8.

3.6.8.2.1 Recuento en Placa por el Método de Incorporación (ICMFS, 1992). Se toma un mililitro de cada dilución de la muestra con una micropipeta de 100 a 1000 μL , se vierte a una placa Petri por duplicado y luego se incorpora el medio de cultivo a una temperatura de 45 a 55° C, y se homogeniza el medio por

movimientos en círculos y hacia los costados, dejar solidificar e incubar en una incubadora marca Memmert según el microorganismo a incubar. El cálculo de resultados microbiológicos (ICMFS, 1992).- Se realiza el recuento de las placas Petri y se toman en cuenta las placas que tienen entre 300 y 30 colonias, posteriormente se multiplica por el inverso de la dilución de la placa y se saca el promedio de todas ellas, el resultado se da en número de microorganismos por mililitro de la muestra.

3.6.8.2.2 *Análisis de Enterobacterias técnica de recuento en placa según la norma (ICMFS, 1992).* Se utiliza el medio de cultivo VRBG (Violeta Rojo Brillante Glucosa) marca Oxoid, diluir 38.5 g en 1 litro de agua bidestilada, calentar con agitación y hervir por 2 minutos, luego el medio de cultivo es utilizado al llegar a una temperatura de 55 a 45° C, y sembrar por el método de incorporación e incubar a 35° C o 37° C por 24 horas +/- 2 horas. Finalmente contar las colonias de rojas a púrpuras con un contador de colonia, realizar los cálculos para determinar el número de enterobacterias en las muestras.

3.6.8.2.3 *Análisis de Bacterias Ácido Lácticas, (ICMFS, 1992).* Prepara Agar MRS de la marca Merck, suspender 66,25 gramos en un litro de agua bidestilada, autoclavar a 121° C por 15 minutos, dejar enfriar hasta temperaturas de 55 a 45° C, opcionalmente adicionar azida de sodio, para inhibir el crecimiento de levaduras, sin embargo esto podría inhibir algunas cepas sensibles de bacterias lácticas, sembrar por el método de incorporación hasta diluciones de 10⁻⁸. Utilizar el contador de colonias y contar las colonias color blanco lechoso, se recomienda hacer una coloración Gram para observar la morfología de las células y realizar la prueba de catalasa y coloración de esporas, realizar los cálculos respectivos para determinar la concentración de bacterias lácticas en cada tratamiento.

3.6.8.2.4 *Análisis de Levaduras, técnica de recuento en placa (ICMFS, 1992).* Prepara Agar OGYE de la marca Merck, suspender 37 gramos en un litro de agua bidestilada, autoclavar a 121° C por 15 minutos, dejar enfriar hasta temperaturas de 55 a 45° C, adicionar oxitetraciclina una concentración final del medio de 0,02 %, para inhibir el crecimiento de bacterias, sembrar por el método

de incorporación hasta diluciones de 10⁻⁸, utilizar el contador de colonias y contar las colonias color blanco, realizar los cálculos respectivos para determinar la concentración de bacterias lácticas en cada tratamiento.

3.6.8.3 Análisis Fisicoquímicos de la Salmuera. Se realizó el monitoreo de los tanques de fermentación durante los 3 meses de fermentación.

3.6.8.3.1 Análisis de acidez total por titulometría (AOAC, 2007). Se toma 10 mL de muestra y se vierte en el matraz y se añade 100 mL de agua destilada, luego se lleva a evaporación hasta obtener los 10 mL y posteriormente se introduce el pH neutro dentro de la muestra. Se valora con NaOH hasta llegar pH 7 – 7,5 y se registra el gasto.

Cálculos:

$$\% \text{ "acidez total"} = ((G)(N)(F)(9))/V$$

Donde:

G = Volumen en mL de hidróxido de sodio gastados en la titulación.

N = Normalidad del hidróxido de sodio.

V = Volumen de la muestra tomada.

F = Factor de corrección.

9= Mili equivalente del ácido láctico.

3.6.8.3.2 Determinación de pH. Se realizó por el método potenciométrico, con un equipo marca Hanna, antes de realizar cada análisis se procede a la calibración del equipo con tres buffers tampón de 4, 7 y 10, luego adicionar en un vaso de precipitado 10 mL de salmuera y enrasar a 100 mL, colocar el electrodo de pH y el de temperatura hasta que se establezca el valor en la pantalla, registrar el dato y lavar el electrodo con agua destilada y proceder con la siguiente muestra.

3.6.8.3.3 Análisis Sensorial de Sabor Global y Acidez. Este análisis se realizó con un panel de 46 jueces en la fase experimental de Laboratorio (Anexo 10) y 16 jueces en la fase de planta piloto (Anexo 11), en esta etapa se trabajó con personas relacionadas con el ámbito de la aceituna, alumnos universitarios, técnicos

de planta de procesamiento y trabajadores de las plantas de aceituna, la metodología se siguió utilizando los parámetros de la norma COI (Anexo 12).

Se seleccionaron aceitunas que tuvieran el mismo grado de maduración, el que predominaba en el tanque entre 4,5 y 5.

Se determinó el sabor general de la aceituna (aceptación), y la acidez de la aceituna, utilizando los métodos de la evaluación sensorial se clasificaron en dos grandes grupos, constituido por pruebas analíticas, con jueces entrenados y las pruebas afectivas que se realizan con jueces no entrenados o consumidores, en el caso de nuestra investigación se realizó con jueces no entrenados y consumidores.

El método tomado el afectivo cuantitativo de ordenación, ya que nuestros jueces tuvieron que ordenar las muestras según sea el caso de las fichas de evaluación.

Las muestras fueron extraídas de los fermentadores, de los cuales se tuvieron cuidado con que se tenga iguales condiciones, de índice de madurez, para poder tener características similares y los jueces no tengan problemas con las características sensoriales.

Se trató que todas las muestras sean uniformes, igual tamaño, color parecido, para someterlas a evaluación, La porción que se les entregó a cada juez, fue colocada en platillos blancos para no influenciar con colores que alteren la muestra, se presentaron las muestras al azar y desordenadas en numeración y luego se colocaron las aceitunas con el blanco o borrador de sabores que fueron galletas de soda y agua sin gas; y también las fichas de llenado para la evaluación respectiva (Anexo 13).

3.6.8.3.4 Análisis Estadísticos. El análisis estadístico se ha realizado con el Software Excel-Office 2016 y Statgraphic Centurión XIII. Se realizó estadística descriptiva, análisis de varianza y determinación de los efectos de las variables mediante un análisis multifactorial.

Capítulo IV: Diagnóstico Situacional

4.1 Descripción del Problema Focalizado

Escasa estandarización de la fermentación de la aceituna negra natural.

Escasos estudios de las características microbiológicas de la aceituna negra natural.

Limitado conocimiento de los parámetros de la aceituna negra natural de Tacna.

4.1.1 *Presentación del Nudo Crítico*

La caracterización de la aceituna de Tacna, en la denominación de origen de Indecopio indican “Olor propio de la aceituna negra, muy aromática, con tonos frescos, el sabor es exacto salado con un punto **exacto de acidez** y amargor agradable, jugoso y firme” (Resolución N° 023772-2014/DS-INDECOPI).

Los productores de aceituna de mesa determinan que la aceituna negra natural de Tacna, fermentada en óptimas condiciones es generalmente muy ácida, lo que no favorece la comercialización en mercados nacionales e internacionales y la mayoría no se ajusta a los estándares de “Aceituna de Tacna” por Indecopi.

4.1.2 **Características Relevantes del Caso**

Aplicación de inóculos microbianos para modificar las características organolépticas sin variar sus características fisicoquímicas.

4.2 Análisis de los Factores Críticos

4.2.1 *Causas*

Escasos estudios microbiológicos en las aceitunas negras naturales elaboradas en la región de Tacna.

4.2.2 *Consecuencias*

No se estandariza la producción de aceituna para ser exportada a mercados objetivos.

4.2.3 *Dificultades a Resolver*

Determinar la aplicación de inóculos microbianos para producir aceitunas negras naturales con características sensoriales de acidez diferente y sabor aceptable.

Capítulo V: Propuesta de la Innovación

5.1 Descripción de la Propuesta

Los inóculos microbianos son funcionales en aceitunas fermentadas en otras latitudes, la aceituna verde estilo sevillana utiliza inóculos microbianos en España e Italia principalmente y estandarizan el proceso; en el caso de la aceituna negra se desea manipular el proceso para obtener aceitunas con características organolépticas diferenciadas sin alterar sus características microbiológicas y organolépticas y obtener aceitunas con un sabor más equilibrado con respecto a la acidez.

5.2 Descripción de la Estructura de la Propuesta

Figura 1

Aislamiento, Identificación y Selección de Microorganismos

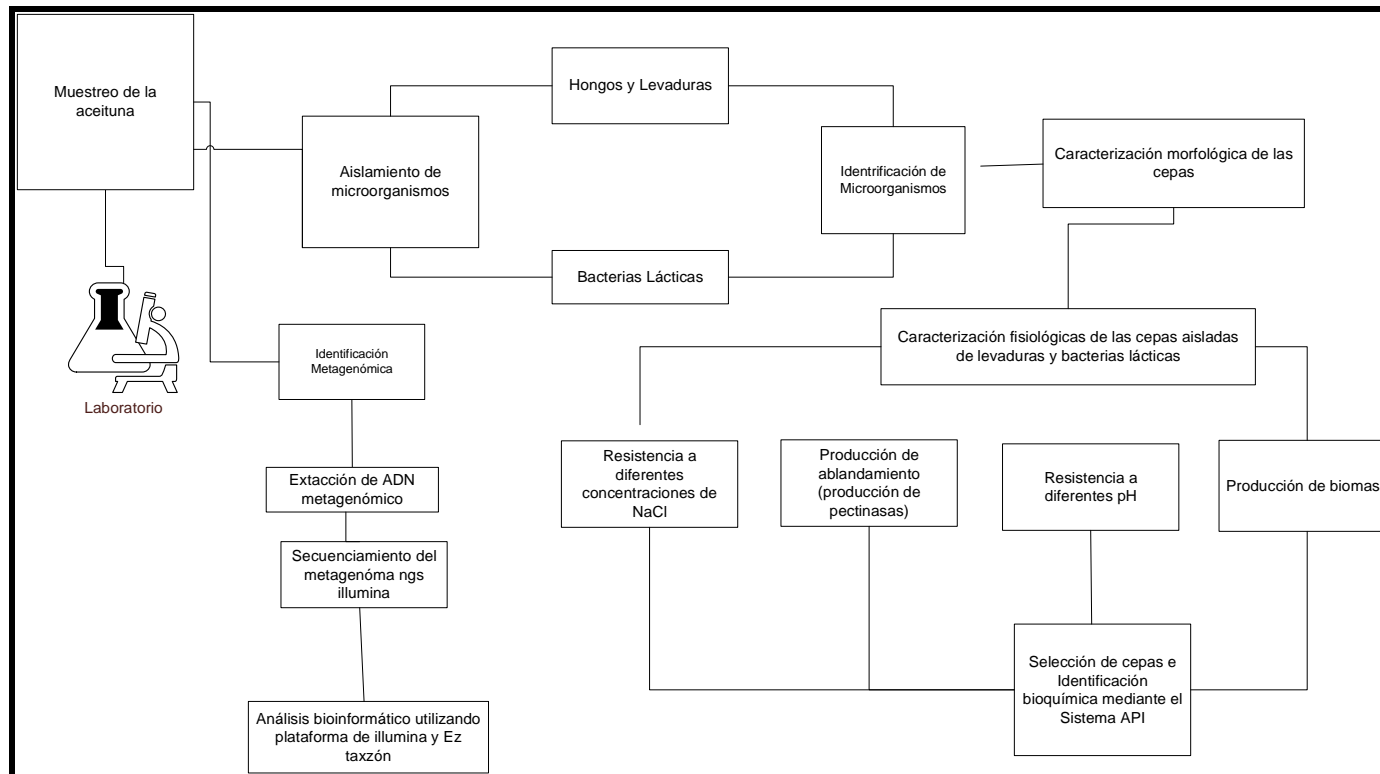


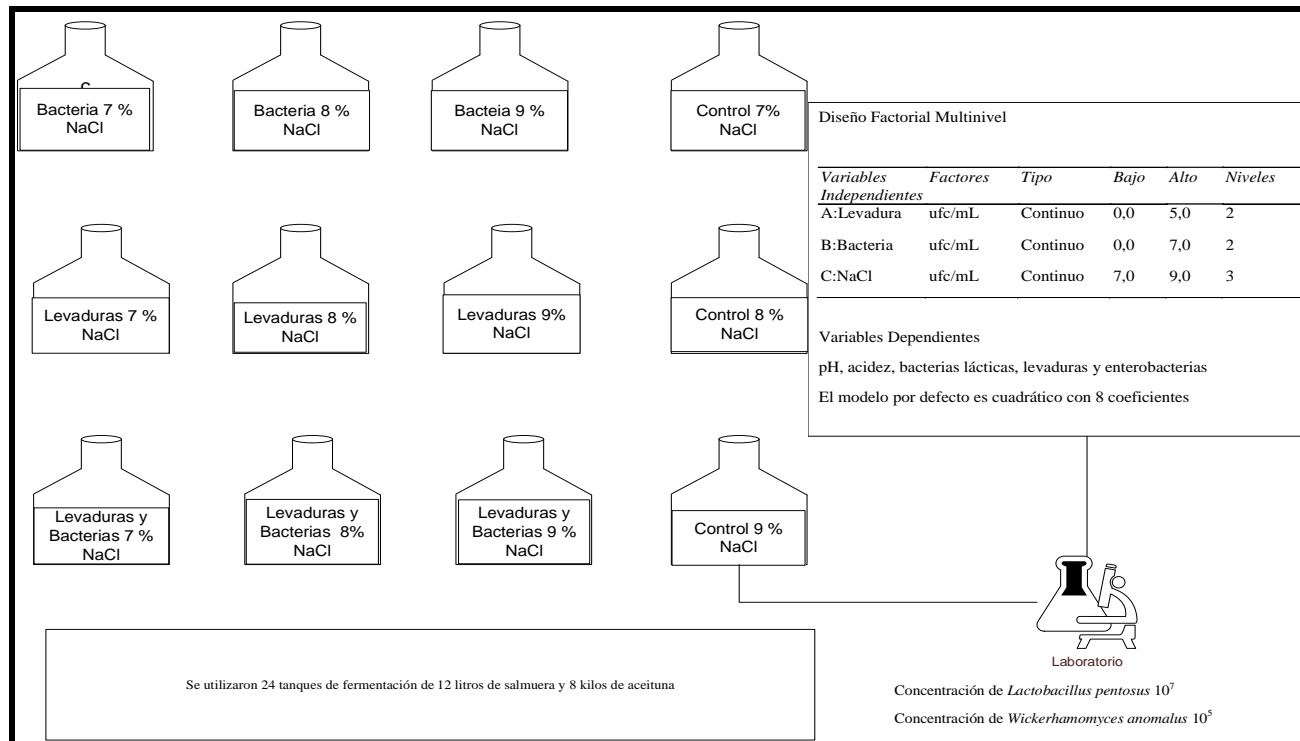
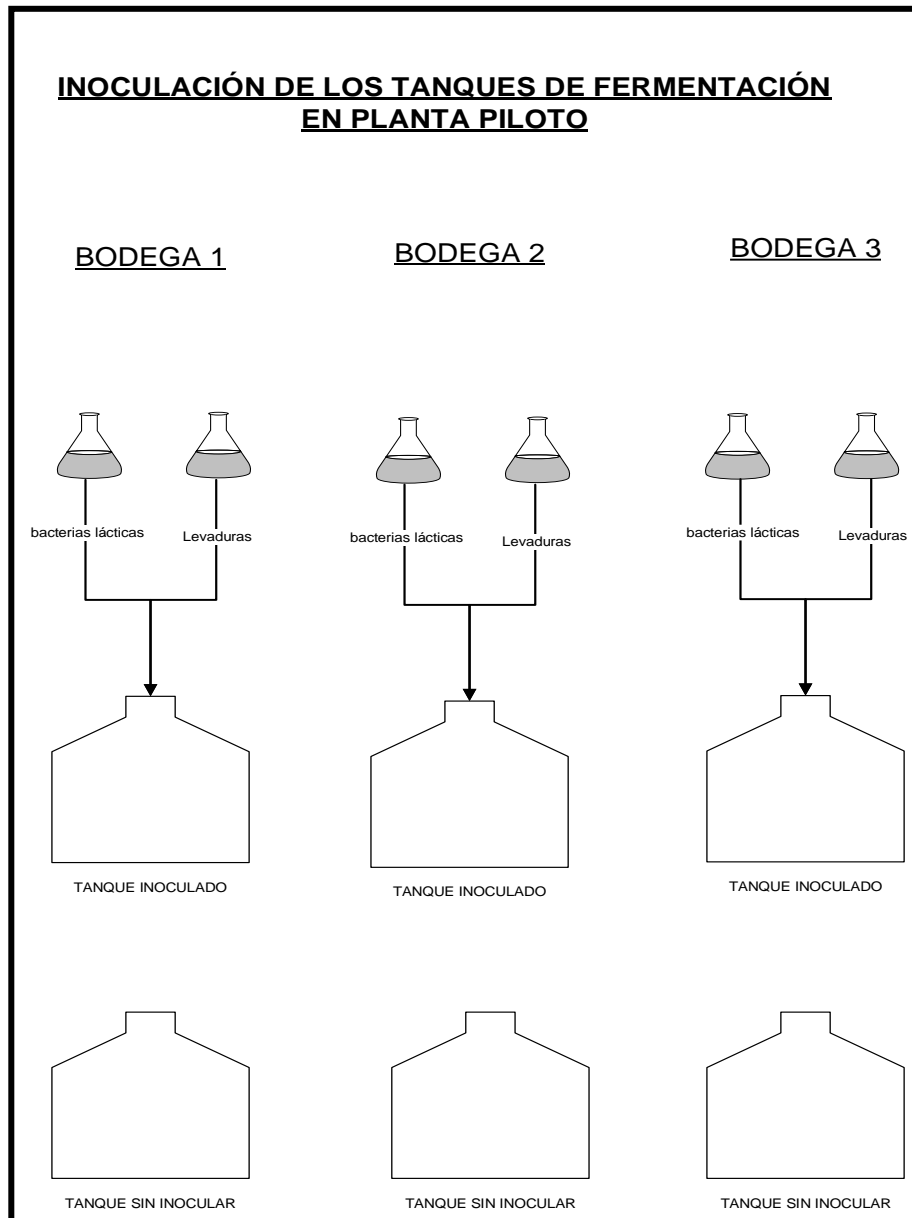
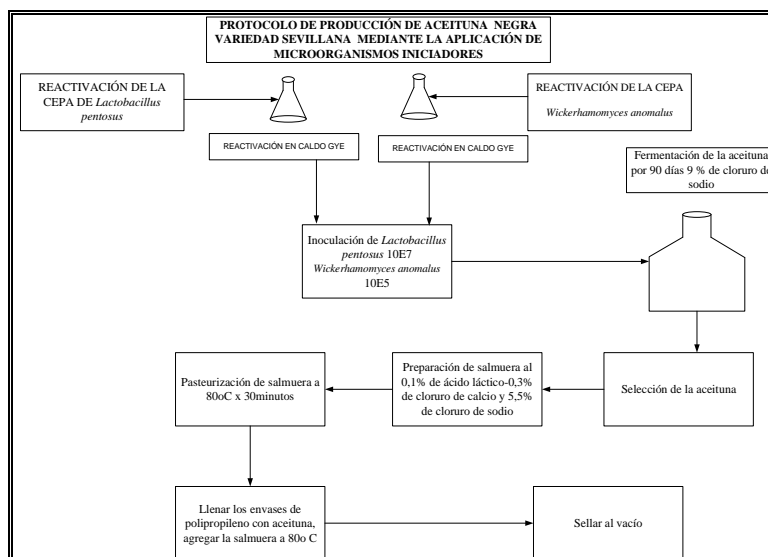
Figura 2*Determinación del Efecto de la Inoculación de Bacterias Lácticas y Levaduras*

Figura 3*Inoculación de Tanques en Planta Piloto*

5.3 Descripción de la Viabilidad de la Propuesta

Figura 4

Flujograma de Viabilidad de la Propuesta en el Proceso de Aceituna Negra Natural con Menor Acidez



Aplicar inóculos microbianos nativos aislados de la aceituna negra natural de Tacna, una levadura M07G *Wickerhamomyces anomalous* y S10A *Lactiplantibacillus pentosus*, en concentraciones de 10^6 y 10^7 cel /mL, a los 2 días de fermentación con salmueras de 9% de cloruro de sodio, acidificada con ácido acético al 0,01 % fermentar aplicando las Buenas Prácticas de Manufactura, limpiando y desinfectando los tanques de fermentación para eliminar la flora microbiana presente en los tanques.

Se deben utilizar aceitunas con un grado de maduración de 4,5 a 5 (Anexo 2), para no obtener aceitunas con un porcentaje muy elevado de azúcar la cual se convertirá en ácido láctico mayormente.

Por tres meses, monitorear los parámetros fisicoquímicos semanalmente y realizar un análisis microbiológico a la tercera semana de fermentación y al final de la fermentación para garantizar que la fermentación se está realizando de manera correcta y a los tres meses se obtendrán aceitunas con menor cantidad de ácido y sin ningún defecto.

Capítulo VI: Los Resultados

6.1 Descripción del Trabajo de Campo

El trabajo se realizó en el laboratorio CITE Agroindustrial, para realizar los análisis microbiológicos y fisicoquímicos, en las bodegas se realizó la aplicación de los inóculos y se analizaron semanalmente los tanques para evaluar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

6.2 Descripción de la Funcionalidad de la Propuesta

La aplicación de inóculos microbianos es una alternativa para asegurar una fermentación estandarizada en sabor y obtener aceitunas con menor acidez y pueda ser exportada a mercados más exigentes.

6.3 Cambios Relevantes de la Aplicación de la Propuesta

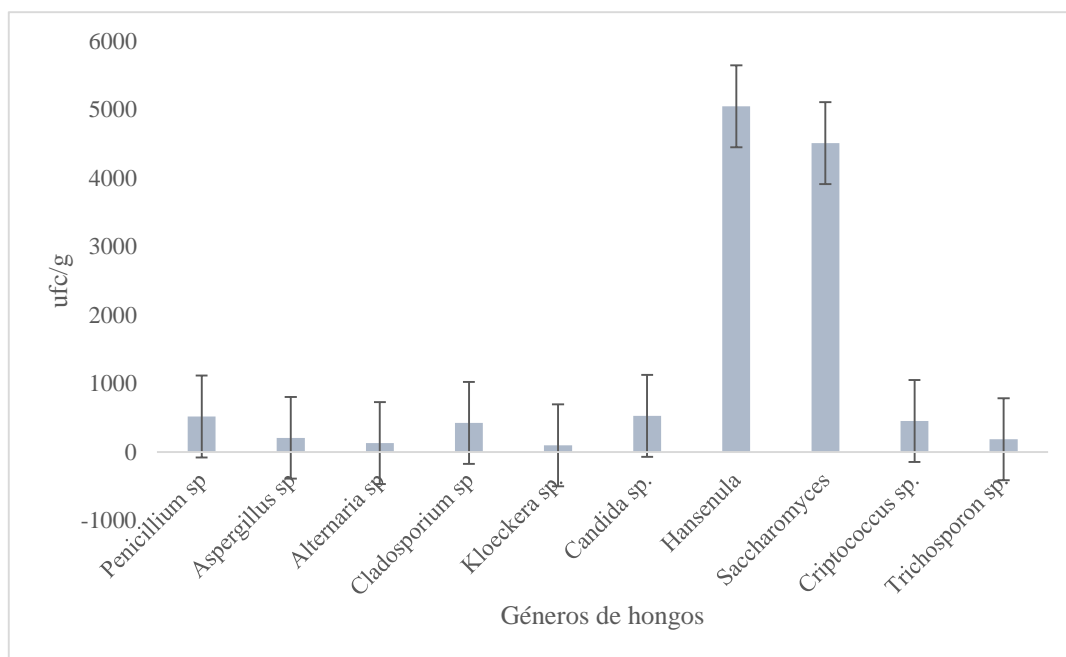
Aceitunas diferenciadas en sabor y acidez utilizando diferentes tipos de inóculos microbianos, a diferencia de aceitunas fermentadas de manera natural con agua y sal, como actualmente se elabora en las bodegas de Tacna.

6.4 Verificación de la Hipótesis

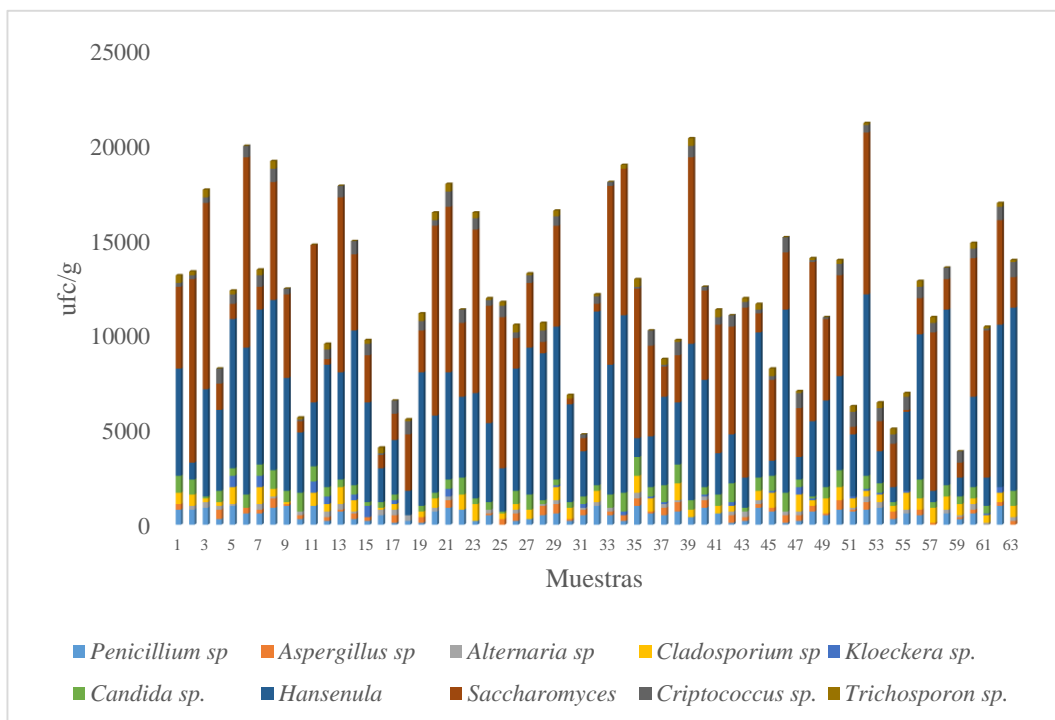
6.4.1 Estudio Microbiológico, Aislamiento, Identificación y Selección de Microorganismos del Fruto del Olivo y Salmueras

Figura 5

Géneros de Hongos Predominantes en el Fruto de la Aceituna Fresca Madura



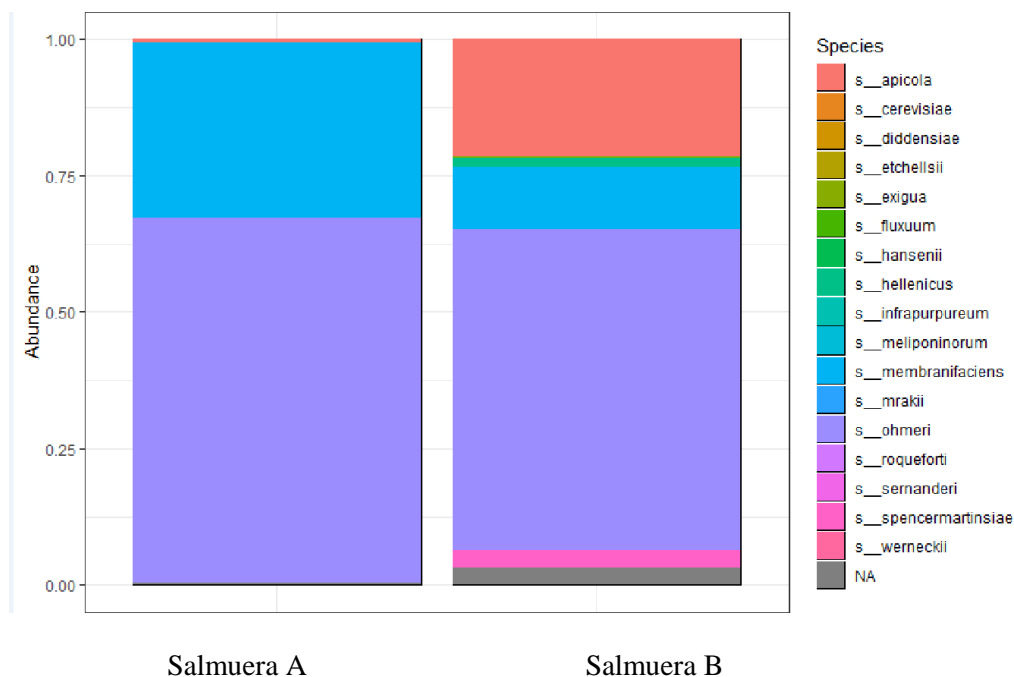
Las especies de hongos que predominan en el fruto fresco de la aceituna es el género *Saccharomyces sp* y *Hansenula sp*, (*Wickerhamomyces anomalus*) esto indica que las levaduras pueden empezar a fermentar la aceituna desde los primeros días.

Figura 6*Concentración de Hongos por Parcela*

Se puede determinar la concentración de hongos presentes en el fruto de olivo en 2×10^4 ufc/mL, se obtuvo los microorganismos del ectocarpio, los microorganismos predominantes son las levaduras; y los hongos filamentosos se encuentran en concentraciones 10^3 ufc/mL.

Figura 7

Análisis Metagenómico de Hongos y Levaduras en Dos Muestras de Salmuera en salmueras de 3,5 % de cloruros y 7 % de cloruros

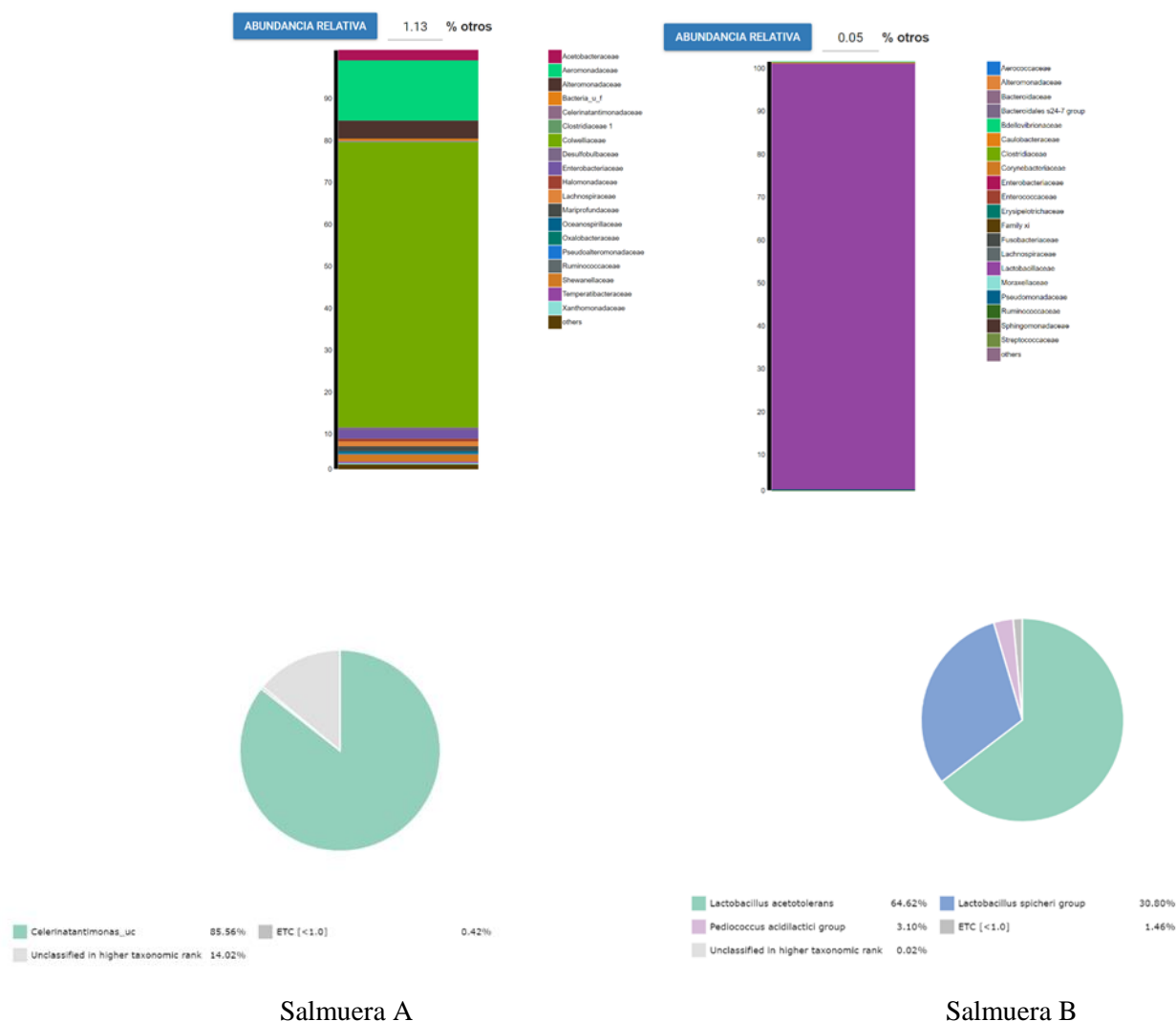


Se analizaron 2 muestras de salmuera la muestra de salmuera A con 1 año de fermentación y la segunda con 2 años de fermentación, la salmuera A tenía como 7,5 % de cloruros, un pH de 3,9 y una acidez de 0,8 mg/L expresado en ácido láctico, la salmuera B tenía 3,5 % de cloruros con un pH de 3,4 y una acidez de 1,8 mg/L. El estudio metagenómico del reino fungi, en salmueras de aceitunas nos revela una abundancia relativa de varias especies de hongos, la especie que predomina es *Kodamaea ohmeri* y como segunda especie predominante *Picchia membranifaciens* y en menor proporción *Candida apícola*, el estudio metagenómico de dos salmueras tuvieron como principal diferencia el tiempo de fermentación la diferencia era de un año entre ambas y la concentración de sal, lo mismo que la acidez entre ambas muestras, los estudios metagenómicos de levaduras en salmueras de aceitunas verdes agrietadas en Turquía se observó la prevalencia de especies de *Candida diddensiae* en un 90 % , mientras que el 10%

mostró similitud con *Candida boidinii*. (Demirci et al., 2021). En aceitunas francesas realizaron el análisis metagenómico y reportaron al final de la fermentación las especies de *P. membranifaciens* como dominante, seguido de *Schwanniomyces etchellsii* y *Candida boidinii*, que fueron subdominantes en las primeras etapas de fermentación. La levadura que predominó en las salmueras fue *Kodamaea ohmeri*, esta levadura no se ha reportado en otras aceitunas en la abundancia como se encuentra en las salmueras de aceitunas de la Yarada, esta levadura es halófila de procedencia marina, esto se debe a la ubicación de las bodegas cercanas al mar, o podrían llegar como parte de la flora de la sal de fermentación, también se ha reportado como un posible probiótico en Keffir de Malasia (Azhar & Abdul Munaim, 2019). *K ohmeri* BG3, se estudió por su capacidad de producir fitasas, los fitatos o ácido fítico puede intervenir en la absorción de minerales en el intestino, impidiendo su absorción (Li et al., 2008).

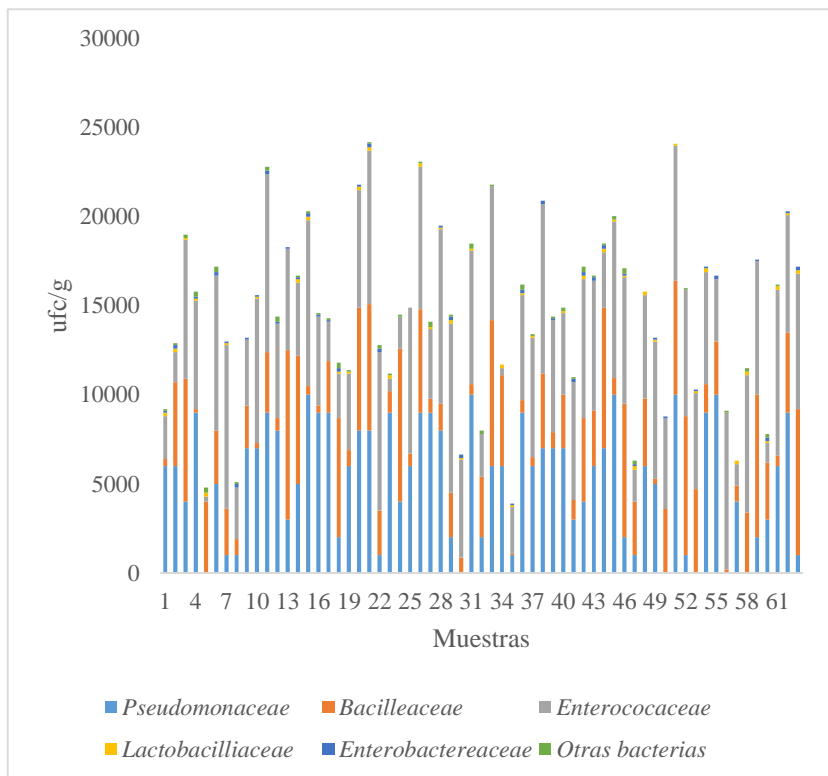
Figura 8

Porcentaje de Familias y Especies Bacterianas de muestras de Muestra en salmueras de 3,5 % de cloruros y 7 % de cloruros Analizadas Metagenómicamente



El análisis metagenómicos de las salmueras A y B se observó una abundancia relativa de la familia Lactibacillaceae mayor 99 % y al aumentar la concentración de sal generalmente para la conservación de la aceituna en bodega predomina la familia Colwelliaceae. Esto es muy importante para comprender la variación de la microbiota en la salmuera por adición de sal y el tiempo de

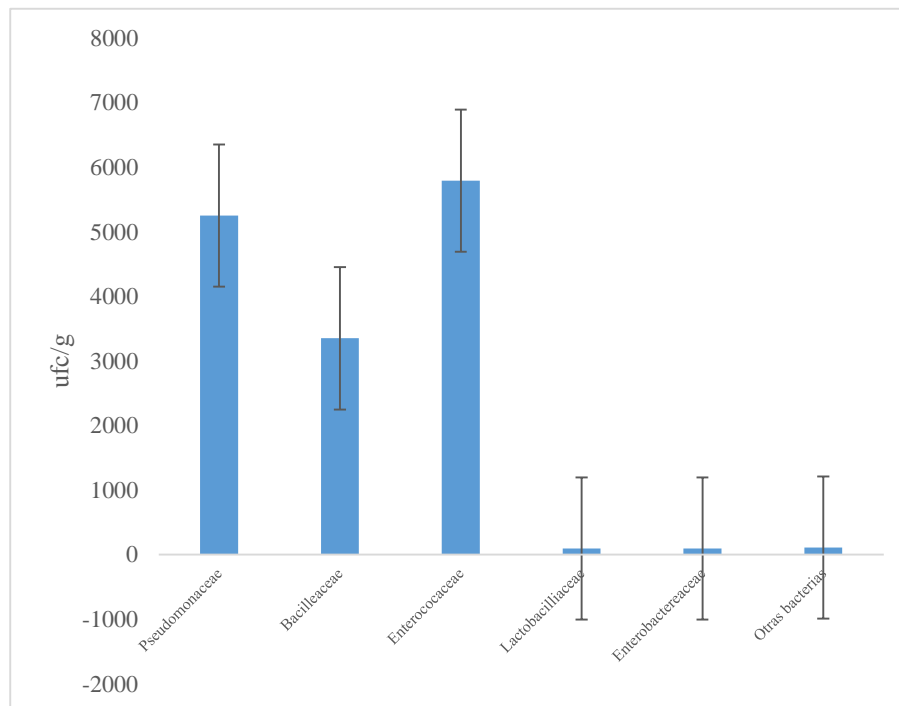
conservación, así como puede influir en las características organolépticas de la aceituna. En la muestra que tiene 3,5 % de sal predomina además de bacterias de la celerinatantimonas familia Lactobacillaceae, otras familias asociadas con la tierra como es el caso de la familia Clostridiaceae o Sphingomonadaceae, sin embargo en la salmuera con concentración de cloruros de 7 % predominan familias halófilas y algunas familias asociadas con el mar Aeromonadaceae y Oceanospirillaceae. Las especies que predominan cambian completamente dependiendo de la concentración de sal, el género *Lactobacillus* actualmente *Lactiplantibacillus* predomina en una cantidad mayor al 95 % predominando la especie *Lactobacillus acetotolerans* o *Lactiplantibacillus acetotolerans*, seguido de *Pediococcus acidilactici* en un 3 %, En la muestra con 7 % de cloruros, la bacteria que predomina es el *Celerinatantimonas sp* en un porcentaje de 85,56 %, esto nos revela un cambio muy importante en el proceso de la fermentación de la aceituna, porque se asociaba con la disminución de bacterias y el desarrollo de levaduras cuando se aumenta la sal en las aceitunas, sin embargo una flora microbiana halófila sigue desarrollándose durante la etapa de conservación de la aceituna, el 14 % de las bacterias no se pueden identificar hasta especie, solamente hasta género o familia. Los análisis se realizaron utilizando dos bases de datos metagenómicos plataformas *Base spaces* de illumina y Ez-Biocloud, estudios similares se han realizado en el continente Europeo, para conocer la metagenómica de las salmueras de la aceitunas, Kazou et al (2020), identificó en aceitunas estilo negras naturales de la variedad Kalamata en bodegas de la ciudad de Grecia Especies de *Lactobacillus sp* (40 % a 70 %) y *Celerinatantimonas sp* (20 % a 10 %). Benítez Cabello et al (2020) analizaron 72 muestras y en el 100 % de muestras se encontró la especie de *Lactobacillus sp* actualmente *Lactiplantibacillus sp* y en el 87,5 % de muestras se identificaron *Celerinatantimonas sp*. En la ciudad de Nyons Francia se analizaron salmueras de aceituna de fermentación natural espontánea predomina la especie *Celerinatantimonas dizotrófica* en un porcentaje de 45 % a 99 % de abundancia y no se reportó el género *Lactiplantibacillus sp* (ex *Lactobacillus sp*), la bacteria *Celerinatantimonas dizotrófica* la correlacionaron con ácidos acético, cítrico, láctico, 2-methoxyphenol y methyl hexanoate; esta bacteria apareció a partir del día 21 de la fermentación y con el incremento del pH.

Figura 9*Concentraciones de Familias Bacterianas por Muestra*

En el fruto podemos observar una concentración de bacterias cultivables de 2×10^4 UFC/mL, esta flora microbiana ingresa a la fermentación y sólo se desarrollarán si las condiciones de cloruro de sodio son muy bajas, en la fermentación de la aceituna negra el pH baja a 5 en los primeros días debido al intercambio de los jugos de los frutos, esto condiciona que estas bacterias no se desarrollen en cantidades detectables desde el punto microbiológico.

Figura 10

Cantidad de Microorganismos Aislados del Ectocarpio de la Aceituna



La familia Enterococaceae y Pseudomonadaceae, son las predominantes en el fruto, llegando a concentraciones de 5×10^3 ufc/mL, los enterococos son bacterias del tracto intestinal de los animales, y el abonamiento de los campos con estiércol sin compostar, estas bacterias son resistentes a la desecación y radiación, la familia Pseudomonadaceae es muy común en frutos, verduras.

Estudios realizados por Sofo et al., (2019), los microorganismos que predominan en aceitunas regadas con aguas residuales o aguas tratadas de la aceituna en Ferrandina al sur de Italia, mediante el análisis metagenómico demuestra que los microorganismos que predominan son las gamma proteobacterias y el género de mayor predominancia es *Pseudomonas* y *Firmicutes* siendo *Enterococcus* el género más abundante.

6.4.2 Selección de Cepas Microbianas Mediante la Evaluación Bioquímica y Fisiológica de Cepas

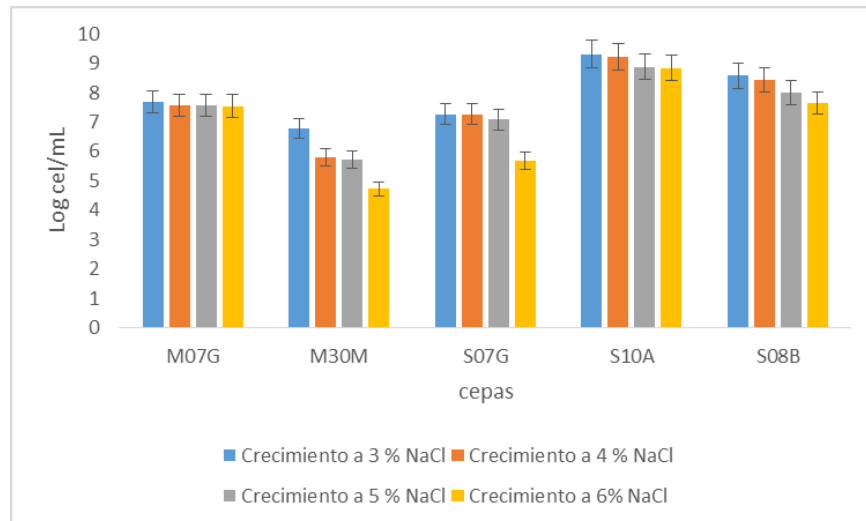
Se identificaron las cepas microbianas API BIOMERIUX 50 CH para bacterias lácticas, se realizó la identificación genética de la cepa S10 A, aplicando el perfil bioquímico del Kit y utilizando el software de Sistema API, se identifica a la especie *Lactiplantibacillus pentosus* y utilizando las bases de datos bioninformáticas se obtiene la bacteria *Lactiplantibacillus pentosus* con un porcentaje de similitud de 99,11 % en las bases de Datos Bioinformáticos del NCBI y EZ-Bioclaud. La especie *Lactiplantibacillus pentosus* ha cambiado recientemente por *Lactiplantibacillus pentosus*, la especie *Lactiplantibacillus* estaba compuesto por 261 especies y son muy diversos genéticamente, metabólicamente y el huésped en el que se encuentra, de esta manera se han redefinido la taxonomía de *Lactiplantibacillus pentosus* a *Lactiplantibacillus pentosus*. Una cepa de esta bacteria es aplicada actualmente como un probiótico en aceitunas por su capacidad de regular los procesos inflamatorios sobre todo en el intestino, a diferencia de otras bacterias que colonizan el intestino como Enterobacterias, Clostridium entre otra flora microbiana que causa problemas intestinales, actualmente el estudio del microbioma está tomando mucha importancia en muchas enfermedades metabólicas y multisistémicas (Benítez-Cabello et al., 2019).

También se identificó la cepa S08B mediante el Kit bioquímico API BIOMERUX 50 CH a *Lactiplantibacillus plantarum* y mediante la identificación molecular arrojó a *Lactiplantibacillus paraplantarum*.

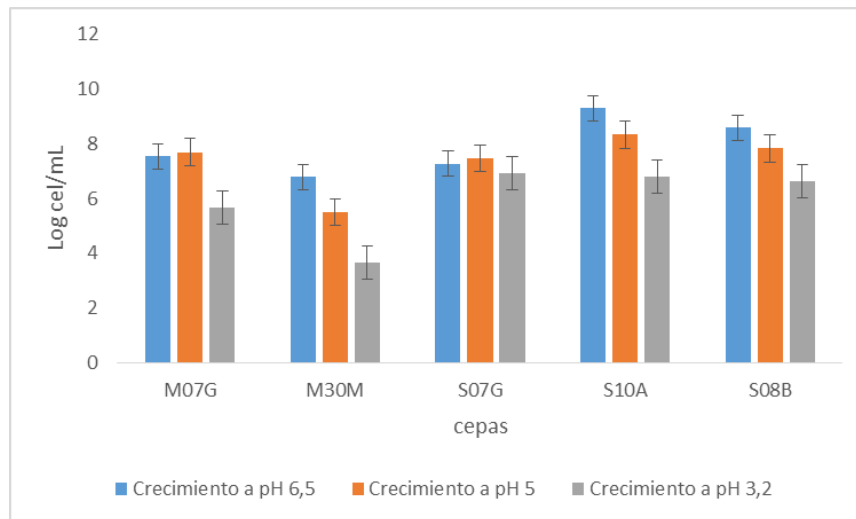
Se identificaron hasta especie mediante el SISTEMA API BIOMERIUX 20 CH para levaduras y Se identificó las levaduras como: *Pichia anomala* o *Hansenula anomala* la cepa M07G actualmente su taxonomía ha cambiado a *Wickerhamomyces anomalus* (Bonatsou et al., 2015) y *Saccharomyces cereviceae* M30M.

Figura 11

Crecimiento de Cepas Microbianas a Diferentes Concentraciones de Cloruro de Sodio



La cepa bacteriana S10A, *Lactiplantibacillus pentosus* y la cepa de levadura M07G, *Wickerhamomyces anomalus* son los microorganismos que han podido resistir concentraciones de sal de 6 % de NaCl, la fermentación de la aceituna se estandariza entre 4 a 5 % de cloruros en las salmueras, esto permite que otros microorganismos no puedan desarrollarse y la fermentación se lleve a cabo por estos microorganismos inoculados.

Figura 12*Crecimiento de Cepas Microbianas a Diferentes pH*

La cepa M07G y S10A son más resistentes al pH, creciendo a concentraciones de 10^6 y 10^7 cel/mL respectivamente a un pH muy bajo de 3,2; este factor es muy importante porque un metabolito que se produce en la fermentación de la aceituna mayor cantidad es el ácido láctico, bajando el pH, lo que permite la conservación de la aceituna, tener microorganismos que soportan pH muy bajo pueden ser utilizados como microorganismos probióticos debido a que pueden predominar en una concentración relativamente alta durante la etapa de conservación de la aceituna y resistir el pH del estómago y lograr parte del tracto digestivo.

Estudios realizados por Rodríguez-Gómez et al., (2014), han inoculado a *Lactiplantibacillus plantarum* con capacidad probiótica a aceitunas verdes estilo Sevillano, se han aislado levaduras en salmuera de aceituna con actividad antagónica de hongos fitopatógenos (Hernández et al., 2008).

Tabla 1

Producción de Dióxido de Carbono de Cepas Microbianas de Aceituna y Salmuera

Cepa Microbiana	Producción de CO ₂
M07G	+
M30M	+++++
S07G	-
S08B	-

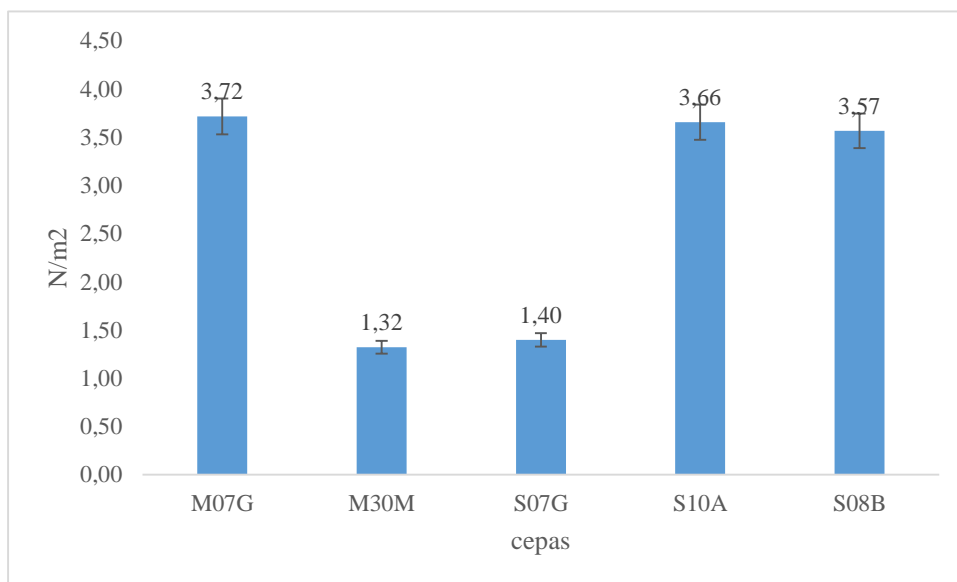
Se determinó la producción de CO₂ de diferentes cepas, teniendo como resultado que el género *Lactiplantibacillus*, son bacterias homofermentativas, el género *Saccharomyces* produce gran cantidad de CO₂ a diferencia de la especie *Wickerhamomyces anomalus* que produce menor cantidad de gas, si las levaduras producen gran cantidad de CO₂ puede producir fisheyes o alambrado.

Las bacterias lácticas de la especie *Lactiplantibacillus pentosus* y *Lactiplantibacillus plantarum* son homofermentativas es decir no producen dióxido de carbono, solamente ácido láctico y algunos otros compuestos aromáticos; estas bacterias son típicas en las fermentaciones de aceituna de mesa con capacidad de degradar la oleuropeína (Ghabbour et al., 2011).

Las levaduras están relacionadas con el alambrado o gas pocket en el producto final de la aceituna y pueden producir sabores y olores desagradables en la fermentación (Garrido-Fernández et al., 1997), pero son muy importantes en el proceso de fermentación de la aceituna.

Figura 13

Comparación de los Perfiles de Aceitunas Negras Naturales, Inoculadas con la Cepa S10A, M07G, No Inoculadas y Comercial



La textura de la aceituna es muy importante para determinar la calidad de la aceituna, muchas especies de levaduras y hongos producen enzimas como las pectinasas relacionadas con el ablandamiento del fruto, (Herrera et al., 2010). Las cepas analizadas que presentaron una textura más firme fueron la levadura M07G y las bacterias lácticas S010 y S08B.

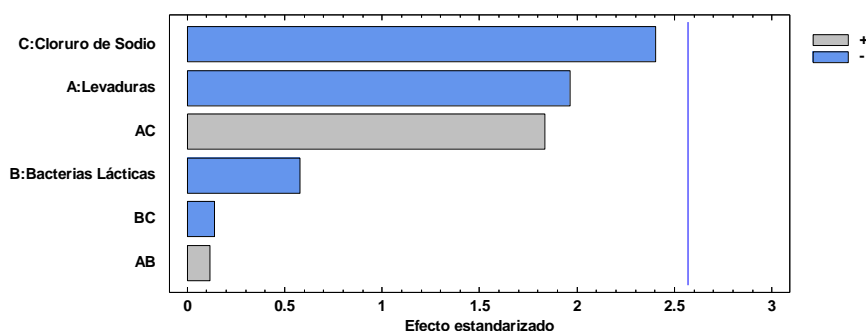
Con las características estudiadas se seleccionaron como inóculos la cepa M07G y S010A, *Wickerhamomyces anomalus* y *Lactiplantibacillus pentosus* respectivamente.

Aplicar inóculos para la fermentación son más comunes en aceituna verde estilo sevillano, al aplicar *Lactiplantibacillus pentosus* y *Wickerhamomyces anomalus*, nos aseguramos que la fermentación no tenga un exceso de producción de dióxido de carbono, no haya ablandamiento del fruto por la producción de enzimas como las pectinasasa.

6.4.3 Efecto de los Inóculos Microbianos y Cloruro de Sodio en la Elaboración de Aceituna Negra Natural

Figura 14

Diagrama de Pareto de cepa M07G (levadura) S10A (bacterias lácticas) y Cloruro de sodio sobre la acidez al día 4 de la fermentación de la aceituna en salmuera



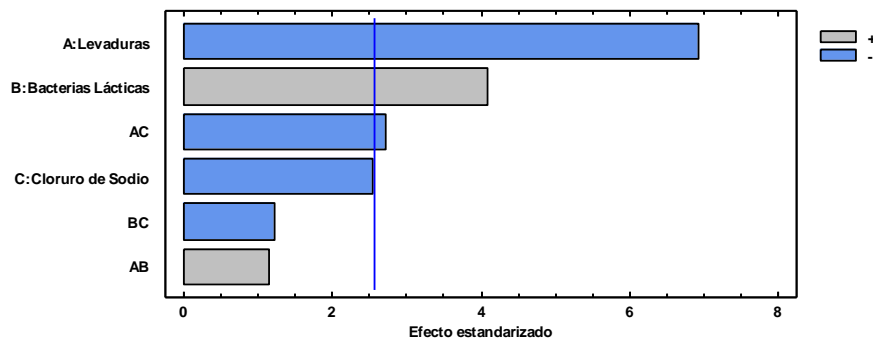
Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

El cloruro de sodio, *Lactiplantibacillus pentosus* (S10A) y *Wickerhamomyces anomalus* (M07G), tienen un efecto negativo en la acidez al inicio de la fermentación, sin embargo este efecto no es significativo, si el efecto sería negativo significativamente podría afectar el inicio de la fermentación, permitiendo el desarrollo de microorganismos no deseables provocando olores y aromas desagradables.

La acidez de la aceituna al inicio de la fermentación está influenciada básicamente por los jugos del fruto en la salmuera y al adicionar ácido acético para acondicionar la salmuera a un pH de 4, para favorecer el desarrollo de los microorganismos como las levaduras y las bacterias lácticas y no permitir el desarrollo de microorganismos indeseables en la fermentación.

Figura 15

Diagrama de Pareto de cepa M07G (levadura) S10A (bacterias lácticas) y Cloruro de sodio sobre la acidez al día 91 de la fermentación de la aceituna en salmuera

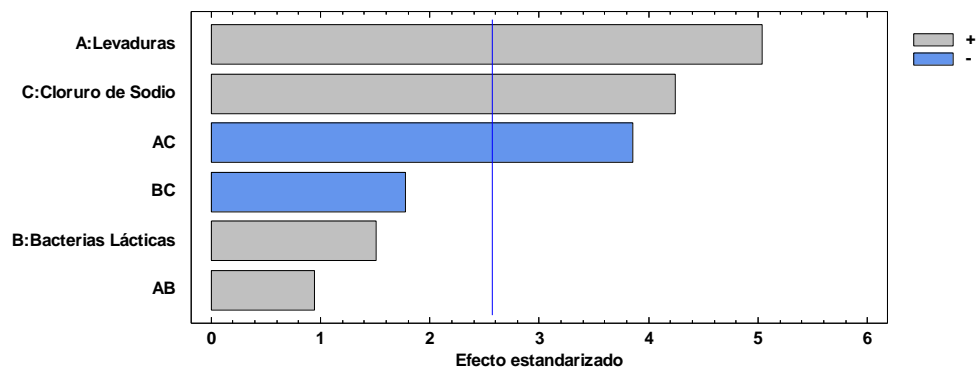


Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

Al finalizar la fermentación la cepa M07G tienen un efecto negativo significativamente en la acidez de la salmuera de la aceituna, al contrario, ocurre con la cepa S10A, que tienen un efecto positivo también significativo; el cloruro de sodio también disminuye la acidez, pero no significativamente. Existe una interacción significativa entre la cepa M07G y cloruro de sodio disminuyendo la acidez final, esto se debe a que la sal disminuye el desarrollo de bacterias lácticas, siendo 8 % de cloruro de sodio la concentración que inhibe su crecimiento, esto lo reportó Balatsouras (1985), citado por (Durán Quintana et al., 1997), las levaduras son más resistentes a la concentración de sal y algunas levaduras utilizan el ácido láctico como fuente de carbono disminuyendo la acidez de la salmuera, desdoblándolo en ácidos más débiles, esto fue reportado por Marquina et al., (1997).

Figura 16

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio Efecto en el pH al Día 4 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera

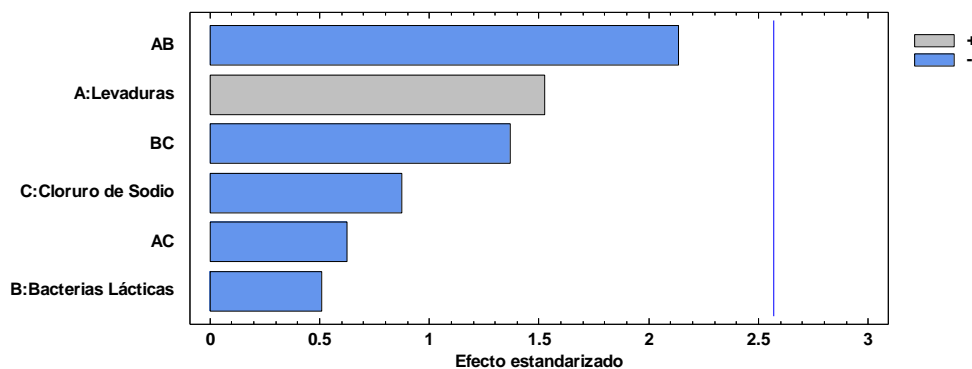


Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

Al inicio de la fermentación el pH es muy importante porque condiciona el crecimiento de la flora microbiana, para asegurar que los inóculos ingresen a un medio adecuado se acondicionó la salmuera con 0,01% de ácido acético industrial, esto nos permite disminuir el pH químicamente, la aplicación de M07G, S10A y el cloruro de sodio tuvieron un efecto positivo, pero no significativo en el pH de la salmuera y no se observa interacción entre los factores. Esto se debe a que los microorganismos aún no están interviniendo en el pH de la salmuera, esto se debe básicamente al tamponamiento del ácido acético adicionado a la salmuera y a los jugos de la aceituna que están siendo intercambiados.

Figura 17

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el pH al Día 91 de la Fermentación de la Aceituna En Salmuera



Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

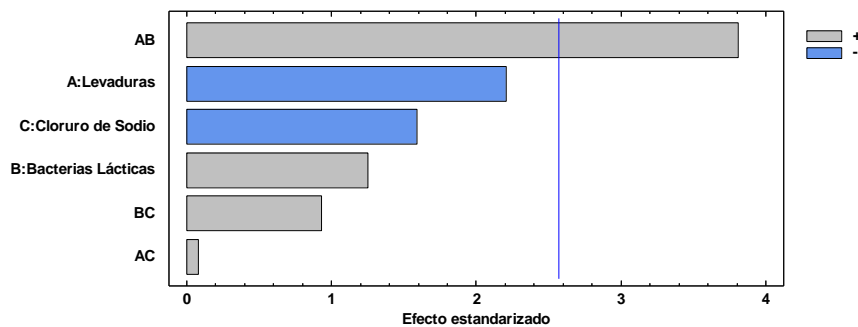
Al final de la fermentación se observa un incremento del pH por efecto de la cepa M07G mientras que la cepa S10A disminuye el pH y el cloruro de sodio también, ninguno de estos factores tiene un efecto significativo.

En la interacción de las variables se observa una interacción positiva entre M07G y S10A, no significativo en la disminución del pH y una interacción entre M07G y el cloruro de sodio para la disminución del pH.

Ninguno de los tres factores influye significativamente en el pH final de la salmuera, manteniéndola a valores menores de 3,6, este valor permite la conservación de la aceituna inhibiendo el desarrollo de bacterias propiónicas, butíricas y coliformes (Durán Quintana et al., 1997).

Figura 18

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 4 de La Fermentación de la Aceituna en Salmuera



Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

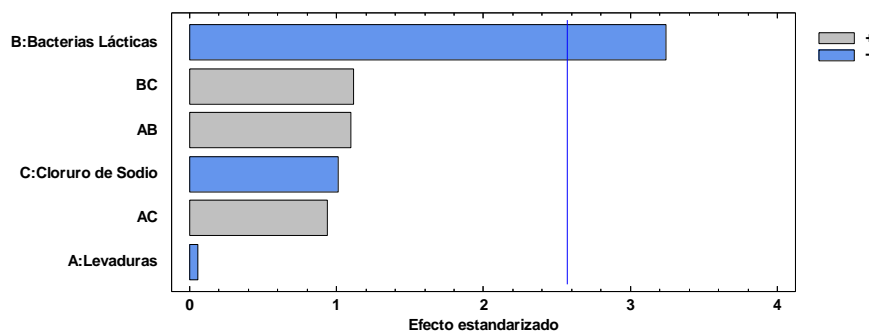
El recuento de bacterias lácticas al día 4 de la fermentación incrementa significativamente la interacción de las cepas S10A y M07G, pero el efecto de solamente de M07G disminuye el crecimiento de las bacterias lácticas al inicio, la inoculación de S10A incrementó el desarrollo de las bacterias y el cloruro de sodio disminuyó el desarrollo de las bacterias lácticas, los tres factores no tienen un efecto significativo.

El inicio de la fermentación es crítico porque los microorganismos lácticos tienen que acondicionarse para empezar a desarrollarse, las limitantes para el desarrollo de las bacterias lácticas es la concentración elevada de sal y la concentración de oleuropeína.

La aplicación de *Lactiplantibacillus pentosus* como starter o inóculos en aceitunas verdes estilo sevillano han demostrado al inicio de la fermentación una adecuada fermentación y consumo de azúcares del fruto (Rodríguez-Gómez et al., 2014).

Figura 19

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 23 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera

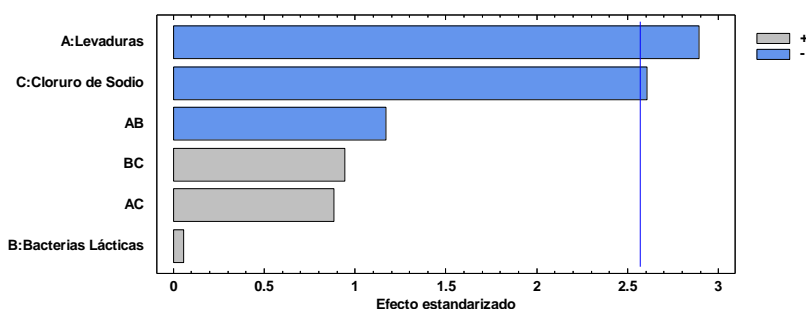


Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

El efecto de la cepa S01A al día 23 tiene un efecto negativo significativo en el desarrollo de las bacterias lácticas, esto nos indica que las bacterias nativas de las salmueras se desarrollan en mayor cantidad, el desarrollo excesivo de bacterias lácticas incrementa la cantidad de ácido láctico y produce aceitunas demasiado ácidas, la cepa M07G tienen un efecto negativo en el desarrollo de las bacterias lácticas pero este no es significativo y el cloruro de sodio también disminuye el crecimiento de las bacterias lácticas, hay una ligera interacción de la cepa S10A y el cloruro de sodio. En la fermentación de la aceituna durante la tercera semana es cuando se evidencia el desarrollo de las bacterias lácticas en concentraciones mayores a 10^7 UFC/mL (Randazzo et al., 2014).

Figura 20

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Bacterias Lácticas al Día 91 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera



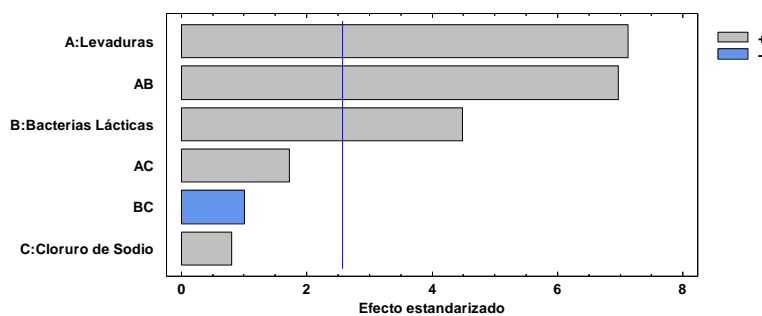
Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

Al final de la fermentación el número de microorganismos ya ha disminuido y el cloruro de sodio y la cepa M70G tienen un efecto negativo significativo en la supervivencia de las bacterias lácticas, la inoculación con la cepa S10A incrementó la supervivencia de las bacterias, pero no de manera significativa.

La aplicación de las cepas S10A y M07G interaccionan entre sí e incrementan la supervivencia de las bacterias lácticas, pero no significativamente. Esto se debe a los componentes nutritivos de las levaduras como la vitamina del complejo B que favorecen el desarrollo de las bacterias lácticas, esto nos indica que para que se puedan desarrollar las bacterias lácticas, es necesario la presencia de levaduras.

Figura 21

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras al Día 4 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera



Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

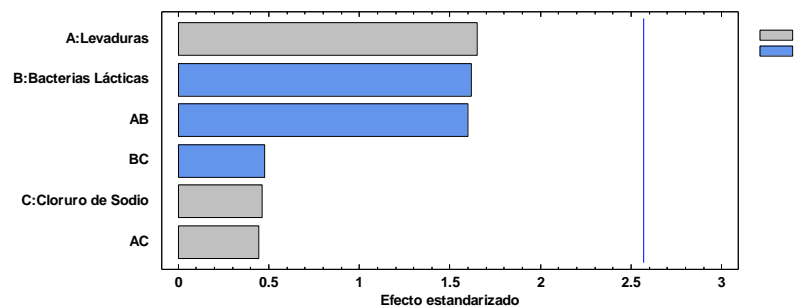
Al inicio de la fermentación los efectos de los dos inóculos tienen un efecto positivo significativo en el desarrollo de las levaduras, el cloruro de sodio también influye en su desarrollo, la interacción de ambos microorganismos S10A y M07G han potenciado el desarrollo de las levaduras sin embargo, el cloruro de sodio y la cepa S10A tienen un efecto negativo en el desarrollo de las levaduras, pero este no es significativo.

El desarrollo de las levaduras al inicio de la fermentación en aceituna negra natural es importante, debido a que el fruto ingresa sin ningún tratamiento de lavado que disminuya la carga en el momento de la fermentación.

Las levaduras tienen la capacidad de inhibir hongos que producen sustancias enzimáticas que pueden producir ablandamiento en el fruto (Fernandez et al., 1997).

Figura 22

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras Día 23 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera

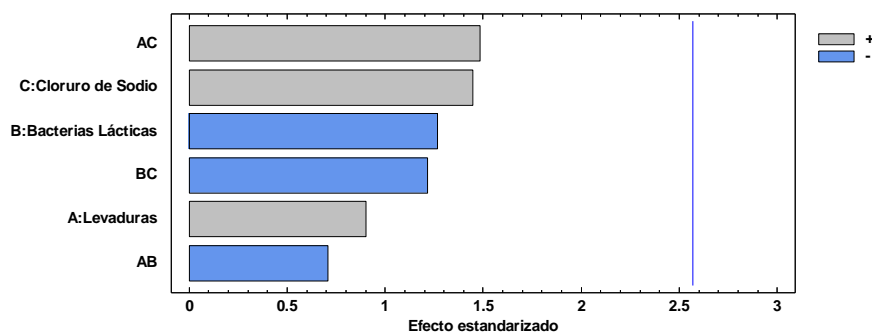


Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

La aplicación de la cepa M07G como inóculo no tiene un efecto significativo en el desarrollo final de las levaduras, al final las bacterias tienden a descender, esto debido a la competencia de sustrato, debido a que las levaduras son metabólicamente más eficientes que las bacterias lácticas, al ser organismos superiores. El cloruro de sodio también incrementa el número de levaduras, esto se debe a la resistencia a la sal que tienen las levaduras. La cepa S10A disminuye la concentración de levaduras al final de la fermentación. Podemos evidenciar que al aplicar la cepa M07G no generó cambios en el proceso de fermentación, el problema de un incremento significativo de las levaduras desde un punto de vista negativo es el incremento de enzimas pectinolíticas, sacarolíticas y la producción de dióxido de carbono, por tal motivo es importante dirigir la fermentación con inóculos de levaduras que no provoquen daños a la aceituna y que pueden aparecer en fermentaciones espontáneas, por problemas de contaminación o por ser parte de la flora natural del fruto (Hernández et al., 2007). No se evidencia una interacción significativa de las variables.

Figura 23

Diagrama de Pareto de Cepa M07G (Levadura) S10A (Bacterias Lácticas) y Cloruro de Sodio, Efecto en el Desarrollo de Levaduras Día 91 de la Fermentación de la Aceituna en Salmuera



Nota. La línea es un efecto significativo valor $p < .05$.

El efecto de la cepa M07G y el cloruro de sodio tienen un efecto positivo en la salmuera al final de la fermentación, pero no significativamente, al contrario de la cepa S10A que tienen un efecto negativo en la prevalencia de las levaduras, tampoco hay interacción entre las variables como se puede observar en la *Figura 23*. Esto nos indica que la inoculación de los microorganismos no tiene un efecto en el desarrollo de la microflora al final de la fermentación, en especial con las levaduras que en exceso puede producir gran cantidad de dióxido de carbono en la salmuera y provocar problemas de agrietamiento en las aceitunas. La cepa M07G identificada como *Wickerhamomyces anomalus*, es muy común en fermentaciones de aceitunas y puede prevalecer en ellas y han determinado que puede ser un buen inóculo para las aceitunas (Bonatsou et al., 2015).

6.4.4 Evolución de Parámetros Fisicoquímicos y Microbiológicos en el Proceso de Fermentación De Aceituna Negra Natural Inoculado Con Las Cepas S10A Y M07G

6.4.4.1.1 Evolución de Enterobacterias en el Proceso de Fermentación

Figura 24

Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control

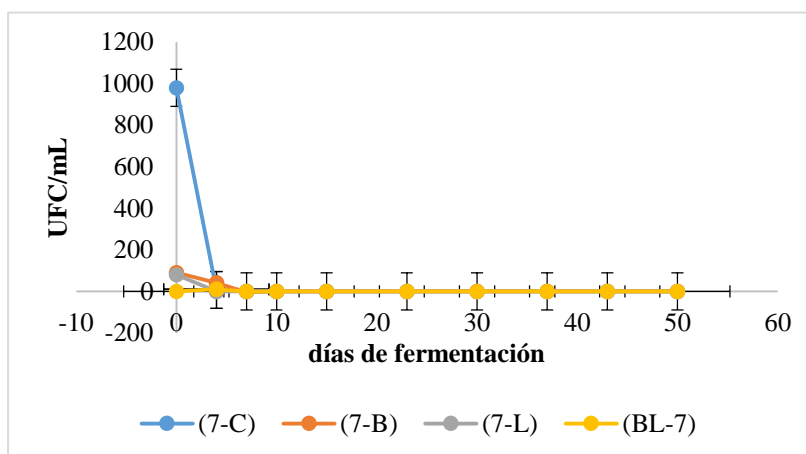
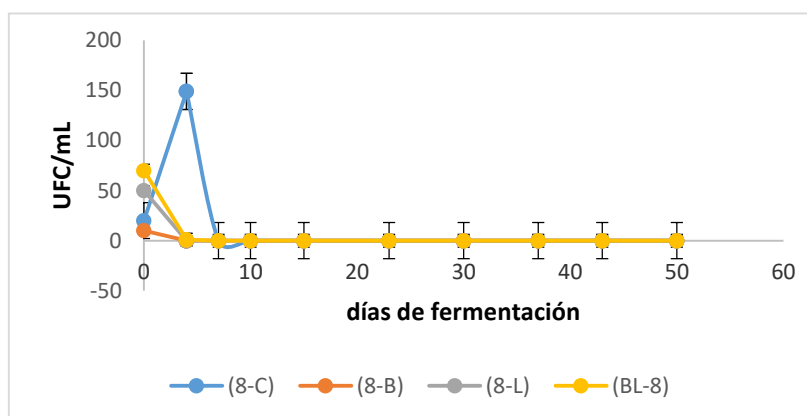


Figura 25

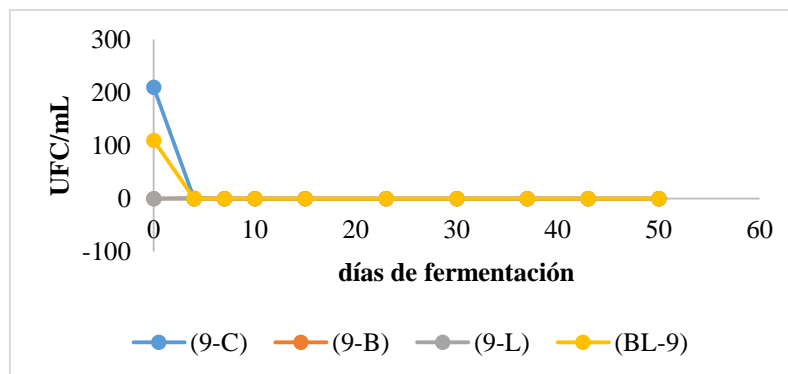
Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 8 % de NaCl



Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control

Figura 26

Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 9% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



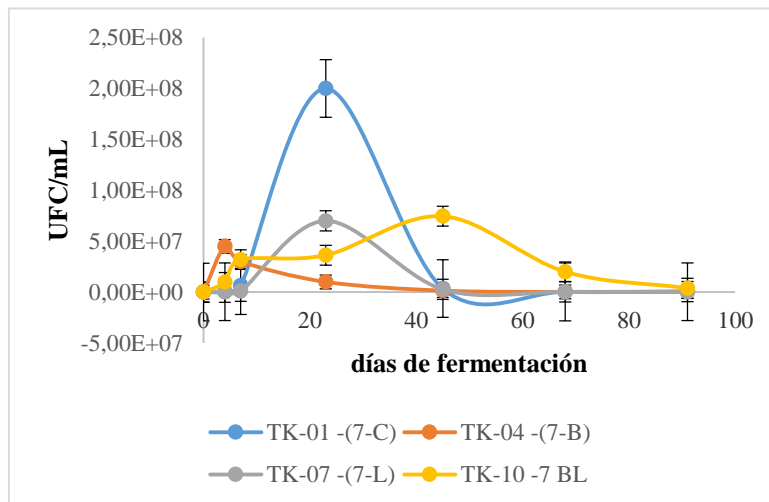
La evolución de las bacterias lácticas a diferentes concentraciones de sal sin inóculo, se puede observar que la concentración de enterobacterias es casi imperceptible, esto es por la aplicación de ácido acético a 0,01 % al bajar el pH a menos de 4 y a la primera semana es casi imperceptible la cantidad de enterobacterias, estos microorganismos producen graves problemas al inicio de la fermentación causando alambrado, pero está asociado en las aceitunas verdes estilo sevillano donde se tampona con facilidad la salmuera con el hidróxido de sodio y el ácido acético, produciendo acetato de sodio (Garrido Fernández et al., 1997).

En aceitunas negras el jugo de la aceituna tiene un pH menor a 5, esto limita el desarrollo de las enterobacterias y otras bacterias neutrofilas (Mateus et al., 2016). En el desarrollo de las enterobacterias no se observa una diferencia en su evolución al inocular los microorganismos M07G y S10A y el cloruro de sodio tampoco evidencia un cambio en el desarrollo de las enterobacterias entre 7 % a 9 % de concentración.

6.4.4.2 Evolución de Bacterias Lácticas

Figura 27

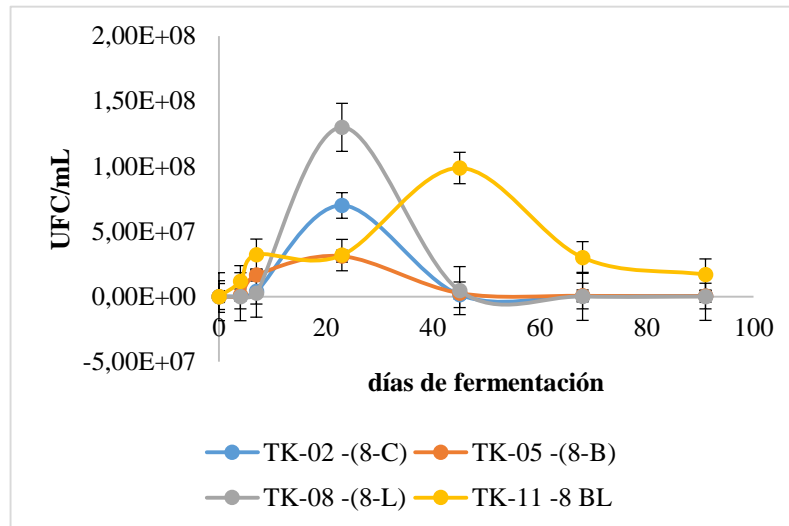
Comparación de la Evolución de las Enterobacterias a 7% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



Se puede evidenciar que las bacterias lácticas se desarrollan a mayor concentración en el control (7-C), esto se debe a que las bacterias lácticas nativas son las que se acondicionan mejor duplicando la cantidad de bacterias que se desarrollan en los otros tratamientos, la concentración baja de cloruro de sodio favorece el crecimiento de las bacterias lácticas nativas, el tratamiento inoculado con la cepa S10A (7-B), no sobrepasa la concentración de 5×10^7 UFC/mL y la mayor concentración se encuentra en las primeras semanas, es la menor concentración de todos los tratamientos, en el tratamiento inoculado con M07G (7-L), incrementan las bacterias lácticas hasta 5×10^7 UFC/mL, a la tercera semana de fermentación y al inocular la ambas cepas S10A (7-B) y M07G (7-L), podemos observar que las bacterias lácticas se mantienen en el tiempo y prevalecen hasta la última semana de fermentación esto se debe a que las bacterias lácticas se favorecen de los nutrientes que proporcionan las levaduras como la vitaminta B, debido a que las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos.

Figura 28

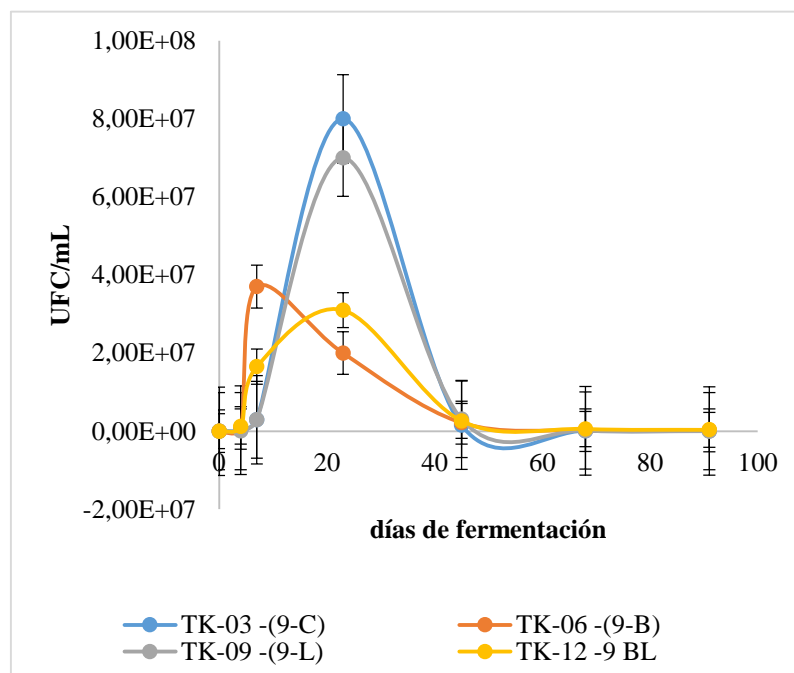
Comparación de la Evolución de Bacterias Lácticas a 8% de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



La evolución de las bacterias lácticas a 8 % de cloruro disminuyen en concentración en referencia a 7 % de cloruro de sodio. En 8 % de cloruro de sodio las bacterias lácticas se desarrollan menor concentración, en el tratamiento inoculado con la cepa S10A (8-B), las bacterias lácticas se desarrollan en menor concentración de los otros tratamientos, esto nos indica que la cepa S10A *Lactiplantibacillus pentosus* no se desarrolla en altas concentraciones comparado con las bacterias nativas. Al inocular la cepa M07G *Wickerhamomyces anomalus*, favorece el crecimiento de las bacterias lácticas, en el caso de la inoculación combinada M07G y S10A, mantiene en el tiempo la concentración de las bacterias lácticas, esto indica que hace sinergia ambas cepas.

Figura 29

*Comparación de la Evolución de Bacterias lácticas a 9% de NaCl
Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control*



El desarrollo de las bacterias lácticas a 9 % de cloruro de sodio su crecimiento es menor que en las concentraciones de 7 % y 8 %, el control seguido del tratamiento con la cepa M07G, son los que registran mayor concentración de bacterias lácticas, en el tratamiento inoculado con sólo la cepa S10A, el crecimiento de las bacterias lácticas incrementa al inicio, pero va descendiendo al final de la fermentación, sin embargo al inocular ambas cepas las bacterias lácticas se mantienen en mayor concentración durante más días.

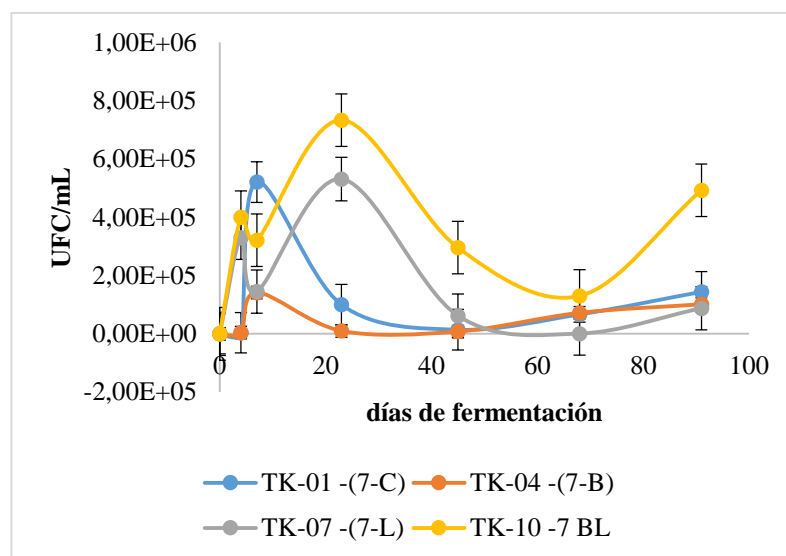
En aceitunas verdes estilo sevillano elaboradas en tanques de fermentación de 5 kilos de aceituna en Sevilla España, inoculadas con *Lactiplantibacillus pentosus* con 12 % de cloruro de sodio, realizando un análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR rt), para determinar la imposición del inóculo a los 19 días, se determinó que al final de la fermentación (65 días), logró una concentración de $8,91 \times 10^5$ UFC/mL, en tanques inoculados con cepas de *W. anomalus* se obtuvo una concentración de bacterias lácticas de $1,76 \times 10^6$ UFC/mL, y en tanques inoculados con *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus*

pentosus y *W. anomalus* se determinó una concentración final de bacterias lácticas de $1,41 \times 10^6$ UFC/mL (Benítez-Cabello et al., 2019).

6.4.5 Evolución de Levaduras

Figura 30

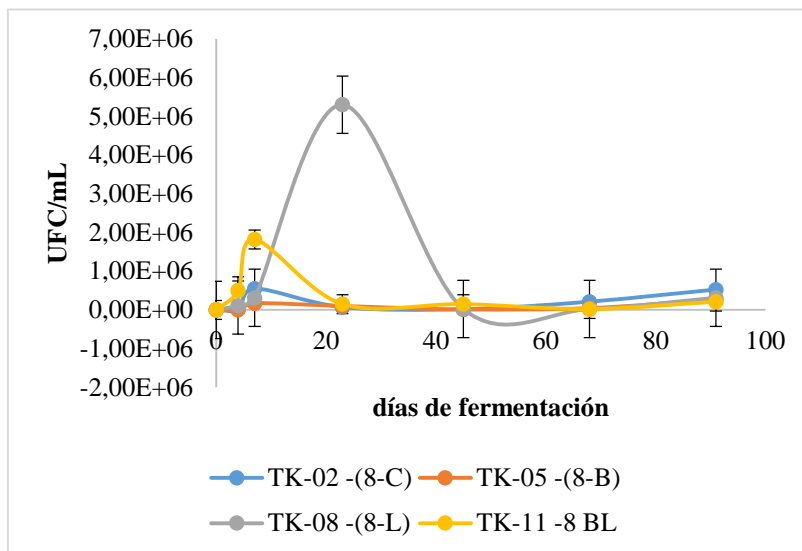
Comparación de la Evolución de Levaduras a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



El desarrollo de las levaduras a 7 % de cloruro se desarrollan a concentraciones que no superan el millón de células por mililitro, en el control, las levaduras se mantienen en concentraciones altas hasta la tercera semana, disminuyendo e incrementando en la última semana, en el tratamiento aplicando la cepa S10A (7-B), las levaduras disminuyen considerablemente con respecto al control, en el caso de la inoculación de sólo la cepa M07G la levaduras se mantienen en concentraciones cercanas a 10^6 UFC/mL, teniendo un pico a los días 23 de la fermentación, manteniéndose hasta el final de la fermentación a concentración de 5×10^5 UFC/mL, al aplicar las dos cepas M07G y S10A (7-BL), las levaduras solamente llegan a concentraciones 5×10^5 UFC/mL, y se mantienen en concentraciones de 10^4 UFC/mL.

Figura 31

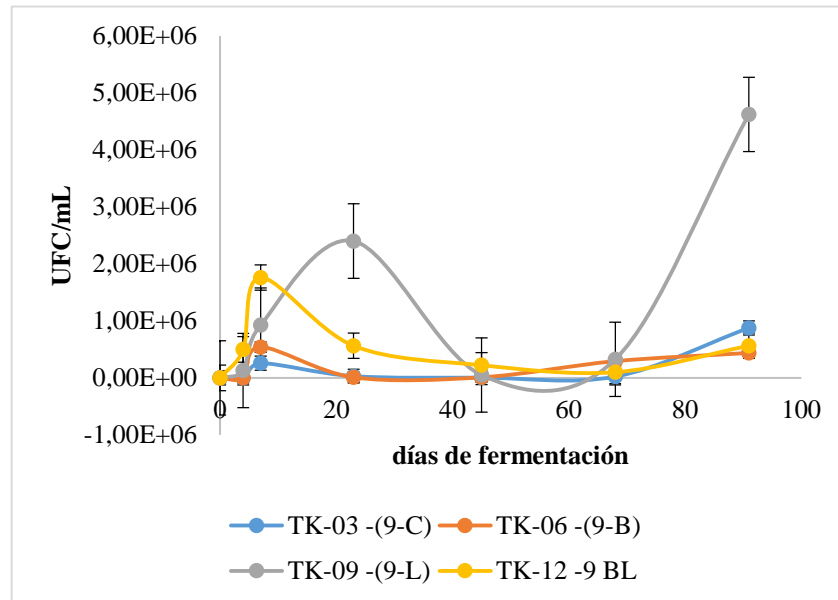
Comparación de la Evolución de Levaduras a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



El desarrollo de las levaduras a 8 % de cloruro de sodio evoluciona a mayor concentración llegando a 5×10^6 UFC/mL. de concentración de levaduras en el tratamiento inoculado con la cepa M07G, disminuyendo a concentraciones de 10^5 al final de la fermentación, el tanque control (8-C), y el tratamiento inoculado con la cepa S10A la concentración de levaduras es de 3×10^5 UFC/mL y en el tratamiento inoculado con ambas cepas, M07G y S10A, hay un incremento inicial de las levaduras llegando a 2×10^6 UFC/mL, manteniéndose en 10^5 UFC/mL.

Figura 32

Comparación de la Evolución de Levaduras a 9 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



Las levaduras se desarrollan sin problemas a concentraciones de 9 % de cloruro de sodio en la primera semana el control (9-C) y el tratamiento inoculado con S10A (9-B) no llegan concentraciones de 10^6 UFC/mL, y el tratamiento inoculado con la cepa M07G (9- L) la concentración de levaduras es 2×10^6 UFC/mL, llegando a la máxima concentración en la tercera semana, disminuyendo las concentraciones menores a 10^6 UFC/mL.

Según Benítez-Cabello et al. (2019), en aceitunas verdes estilo sevillano fermentadas con 12 % de cloruro de sodio, a los 65 días de fermentación se obtuvo una concentración de levaduras de $8,95 \times 10^5$ UFC/mL, al inocular con *Lactiplantibacillus pentosus*, al inocular con *W. anomalus* la concentración de levaduras fue de $1,02 \times 10^6$ UFC/mL y al inocular en forma conjunta *L. pentosus*, *L. plantarum* y *W. anomalus*, la concentración de levaduras fue de $1,10 \times 10^6$ UFC/mL.

6.4.5.1 Evolución del pH

Figura 33

Comparación de la Evolución de pH a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control

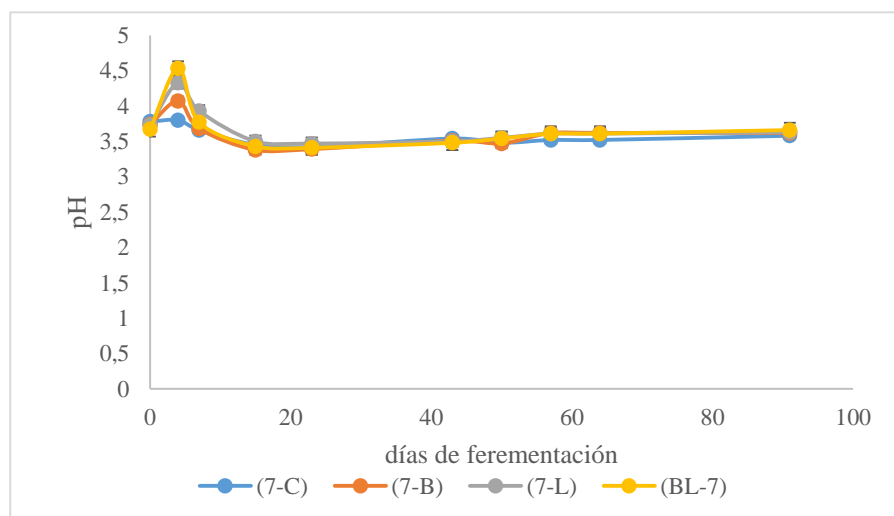


Figura 34

Comparación de la Evolución de pH a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control

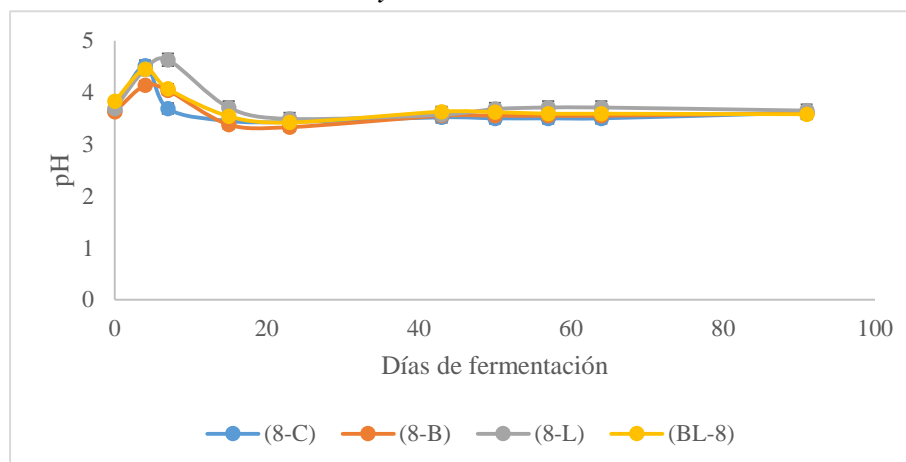
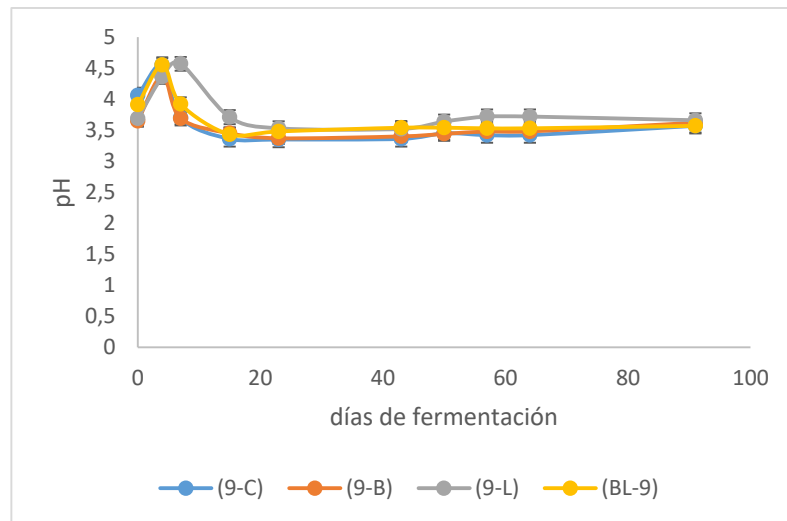


Figura 35

Comparación de la Evolución de pH a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



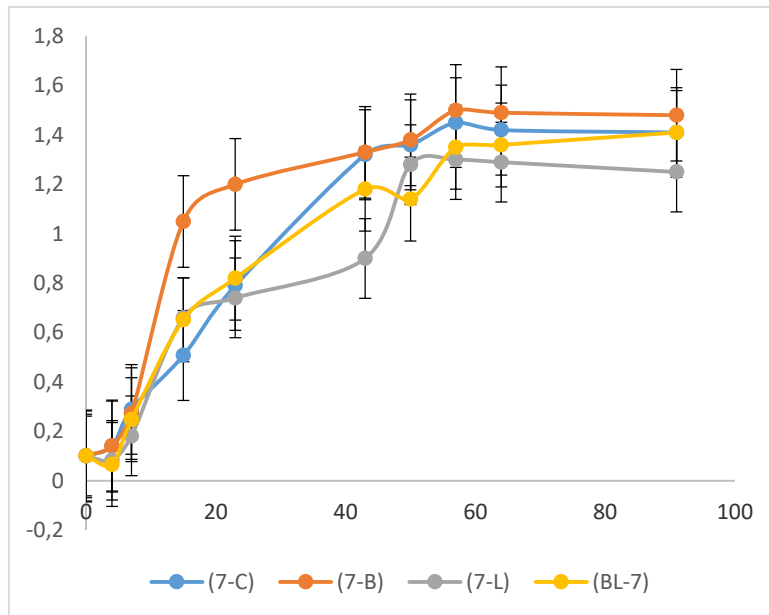
En todos los tratamientos el pH no tiene mayor variación manteniéndose en valores máximos de 4.5 al inicio de la fermentación, manteniéndose a 3,5 durante toda la fermentación, el pH es un parámetro muy importante en el proceso de fermentación, si el pH no baja a valores menores a 4 el fruto fermentado puede sufrir alteraciones y contaminación por microorganismos patógeno o que provocan sabores y olores desagradables.

En las concentraciones de cloruro de sodio 8% y 9 % se observa un ligero incremento en los tratamientos con la cepa M07G, a diferencia de la concentración 7 % no hay mayor diferencia entre los tratamientos durante todo el proceso de fermentación.

6.4.5.2 Evolución de acidez

Figura 36

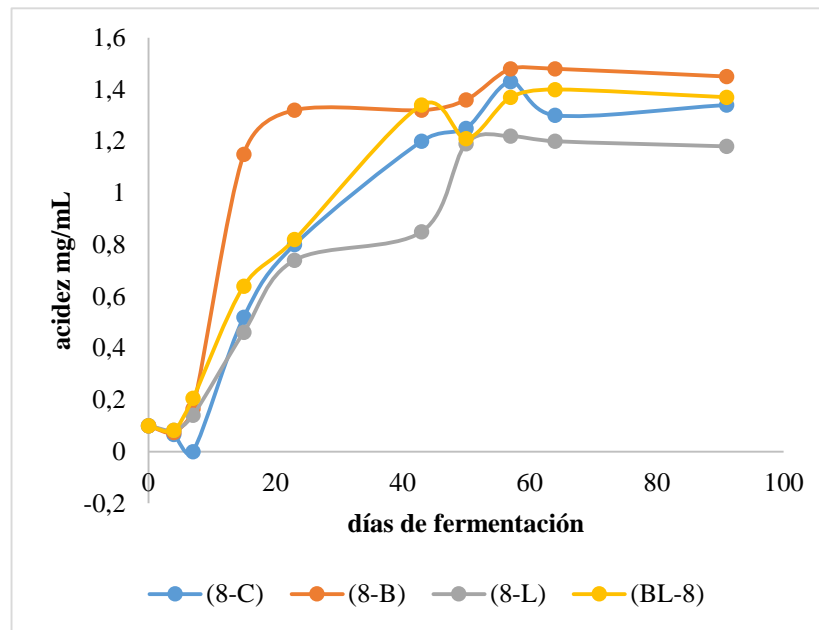
Comparación de la Evolución de la Acidez a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



La acidez a 7 % de cloruro de sodio incrementa semanalmente, siendo a partir de la tercera semana un incremento significativo, el tratamiento que utilizó la cepa S10A, fue la que incrementó a la tercera semana en mayor proporción, esto se debe a que las bacterias lácticas se encontraron en mayor proporción desde la primera semana, en el control, el tratamiento con la cepa M07G y el tratamiento con las combinación de las cepas M07G y S10A, la acidez fue incrementando gradualmente, esto es porque las levaduras y las bacterias lácticas nativas entre las que se encuentran *Leuconostoc sp*, *Pediococcus sp* entre otros acondicionan el medio para crecimiento de *Lactiplantibacillus sp*, al pasar las semanas el tratamiento control iguala al tratamiento con la cepa S10A, el que mantiene una acidez menor es el tratamiento con la cepa M07G. Esto nos indica que las levaduras no producen gran cantidad de ácido y se ha reportado la capacidad de degradar el ácido láctico porque pueden utilizarla como fuente de carbono.

Figura 37

Comparación de la Evolución de la Acidez a 8 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control

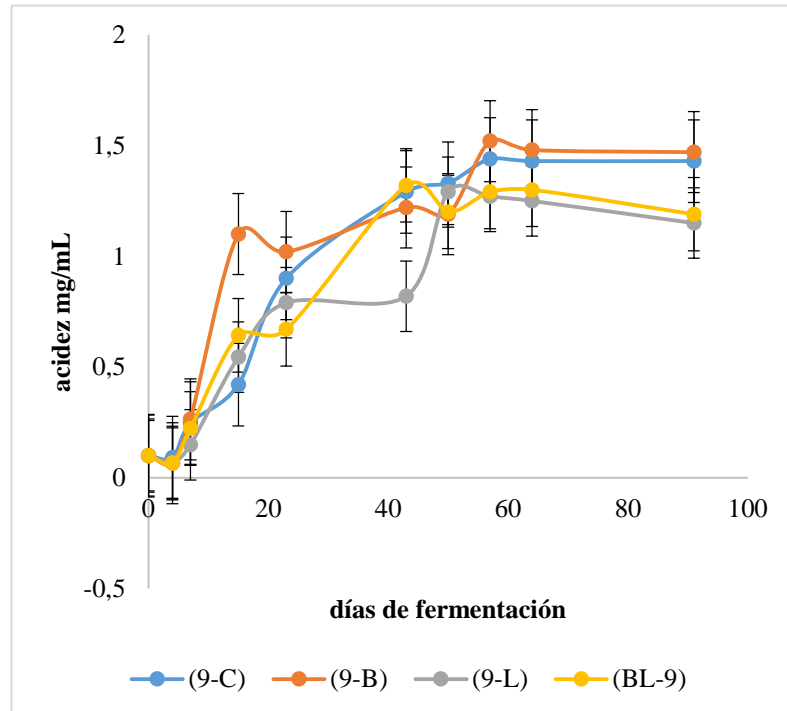


La tendencia de la evolución de la acidez es muy similar a la fermentación a 7 % de cloruro de sodio, es decir los microorganismos están produciendo los metabolitos de ácidos orgánicos de igual manera.

Las aceitunas inoculadas con la cepa S10A, incrementan la acidez considerablemente a la tercera semana en comparación con los otros tratamientos al final de la fermentación la acidez es menor en el tanque inoculado con la cepa M07G, el control y la combinación de cepas presentan una evolución similar.

Figura 38

Comparación de la Evolución de la Acidez a 7 % de NaCl Inoculadas con S10A, M07G, Combinación y Control



A 9 % de cloruro de sodio la acidez evoluciona inicialmente igual que los anteriores, sin embargo, al final de la fermentación la acidez expresada en ácido láctico es menor que en los otros tratamientos, el control y el tratamiento inoculado con la cepa S10A junto con el control culminan con una acidez similar, y los tratamientos inoculados solamente con la cepa M07G y el combinado son similares.

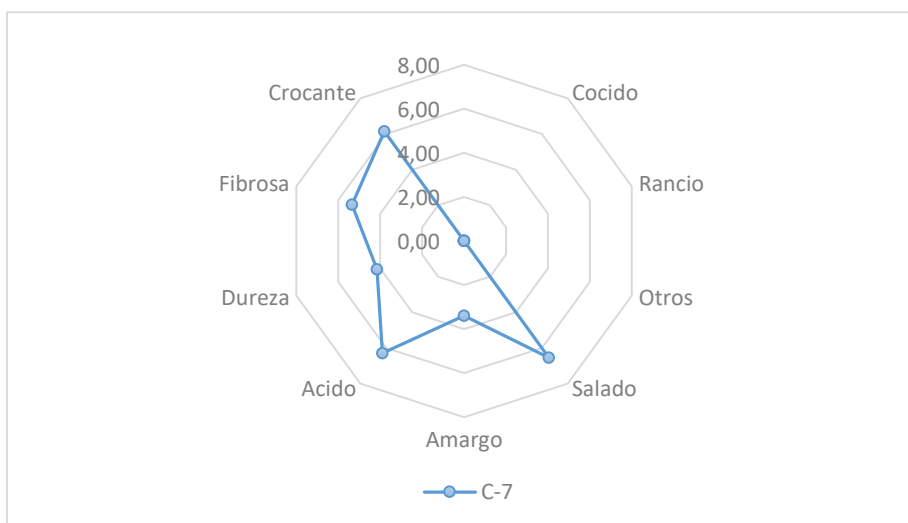
En aceitunas verdes inoculadas con bacterias lácticas (*L. pentosus*), se obtuvo una acidez de 1,44 % y con levaduras (*W.anomalous*) 1,26 % y en levaduras con bacterias lácticas (*L. pentosus* y *W anomalous*) 1,3 % de ácido láctico (Benítez-Cabello et al., 2019), esto comprueba que las aceitunas inoculadas con levaduras son menos ácidas.

6.4.6 Perfil Organoléptico De Los Diferentes Tratamientos Inoculados y Control A Nivel De Laboratorio

El análisis organoléptico, es la técnica científica para evaluar los diferentes compuestos aromáticos y fenólicos que está compuesto el fruto (Anexo 14), el panel de cata se realizó con jueces semi-entrenados o también llamados expertos, los cuales son los principales productores de aceituna de la ciudad de Tacna. Se codificaron las muestras y se le dio a probar aceituna seleccionada con un estado de maduración de 4.5 a 5 (Anexo 2), directamente de los tanques de fermentación, el protocolo que se utilizó fue el utilizado por el COI (Anexo 12).

Figura 39

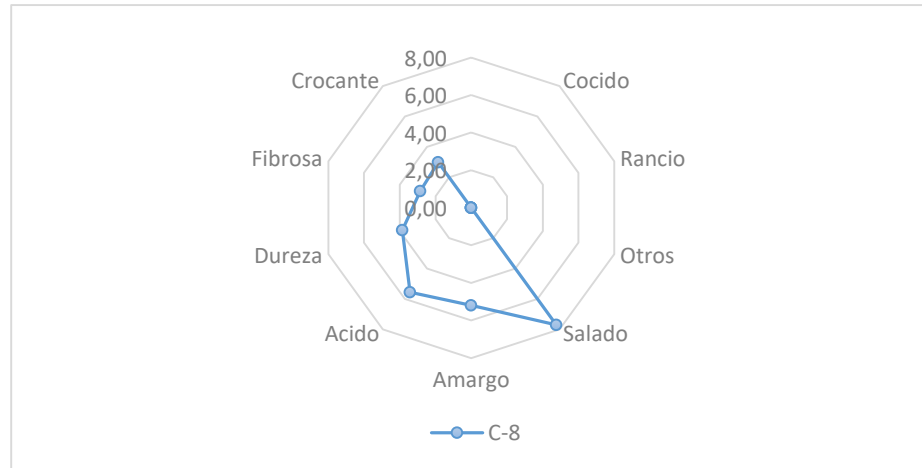
Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 7 % de Sal (C-7)



Fermentar la aceituna negra natural a 7 % de sal sin inóculo, se obtuvieron aceitunas con predominio del sabor ácido, también en textura predominó el aspecto crocante en las aceitunas.

Figura 40

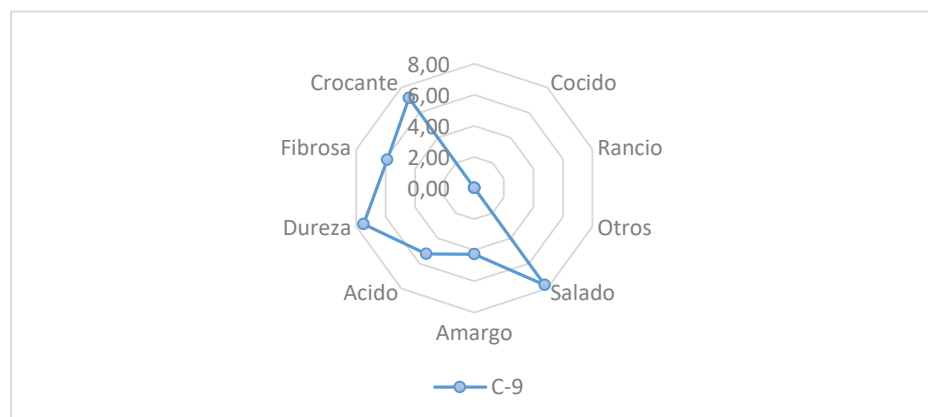
Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 8 % de Sal (C-8)



En el tratamiento sin inóculo y a 8 % de cloruro de sodio, es como se recomienda procesar las aceitunas, no se detectan sabores anormales en la aceituna y el sabor salado es el que predomina, seguido del sabor ácido, el amargo también es percibido con intensidad.

Figura 41

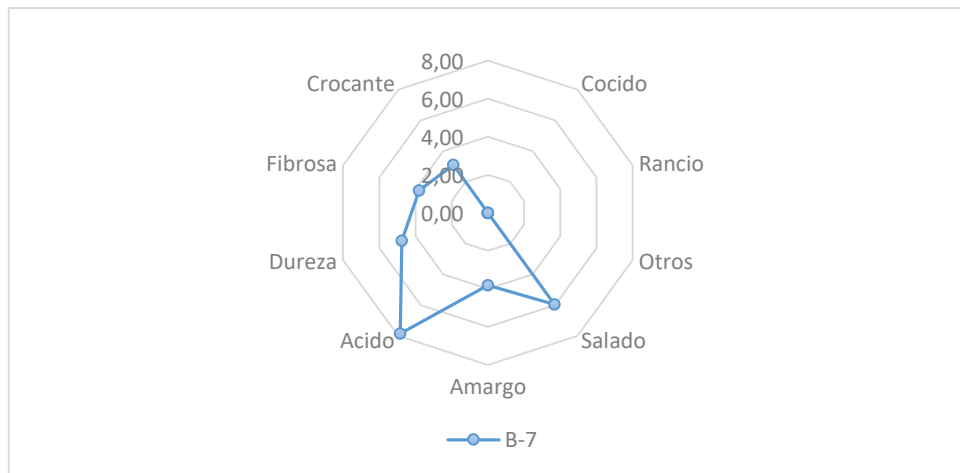
Perfil Organoléptico del Tratamiento sin Inóculo con 9 % de Sal (C-9)



La fermentación de la aceituna a 9 % de cloruro de sodio se obtuvo aceitunas con un predominante sabor salado y de textura dura y crocante, con menos sensación de acidez y amargo, esto se debe a que el sabor salado enmascara el sabor ácido y amargo.

Figura 42

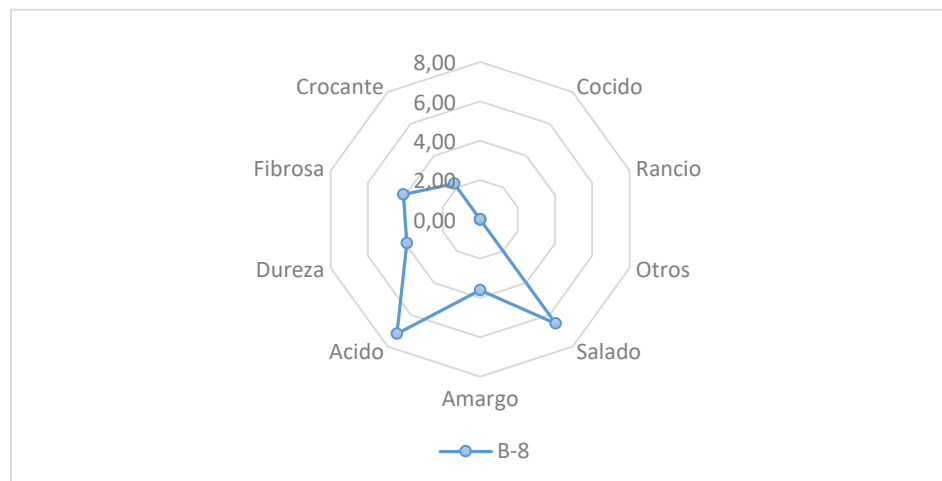
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 7 % de Sal (B-7)



La inoculación de la cepa S10A con 7 % de cloruro de sodio no produce ningún sabor desagradable, aunque predomina el sabor ácido y salado, el sabor amargo es menos intenso, esto se debe a que las bacterias lácticas tienen la capacidad de degradar la oleuropeína que le provee el sabor amargo a la aceituna (Kaltsa et al., 2015).

Figura 43

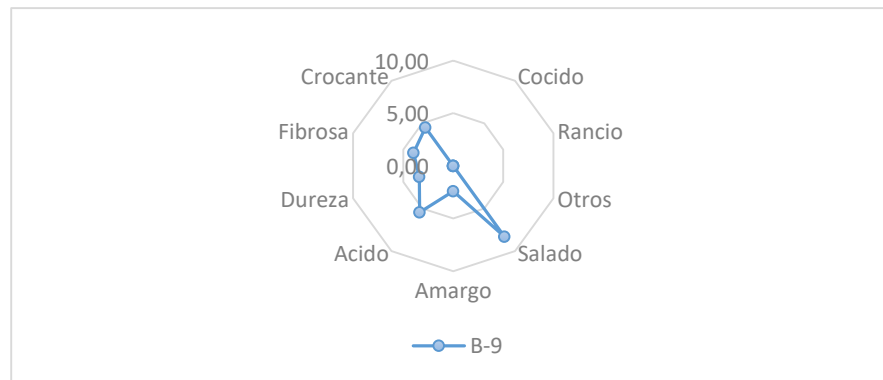
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 8 % de Sal (B-8)



El perfil organoléptico de la aceituna inoculado con S10A a 8 % de sal produce aceitunas sin características anormales, predomina el sabor salado y ácido, el amargo es menos intenso, pero es poco crocante y fibrosa.

Figura 44

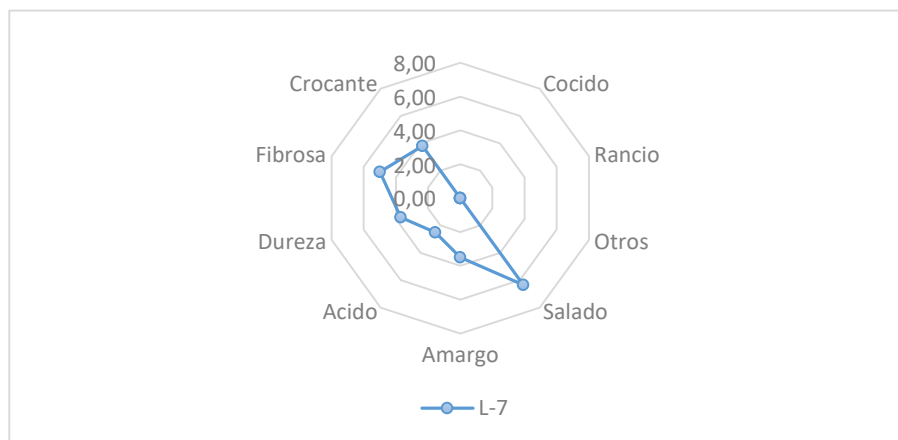
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo S10A a 9 % de Sal (B-9)



Las aceitunas inoculadas con la cepa S10A a 9 % de cloruro de sodio son aceitunas con muy poco amargor y acidez, son relativamente crocantes y predomina el sabor salado.

Figura 45

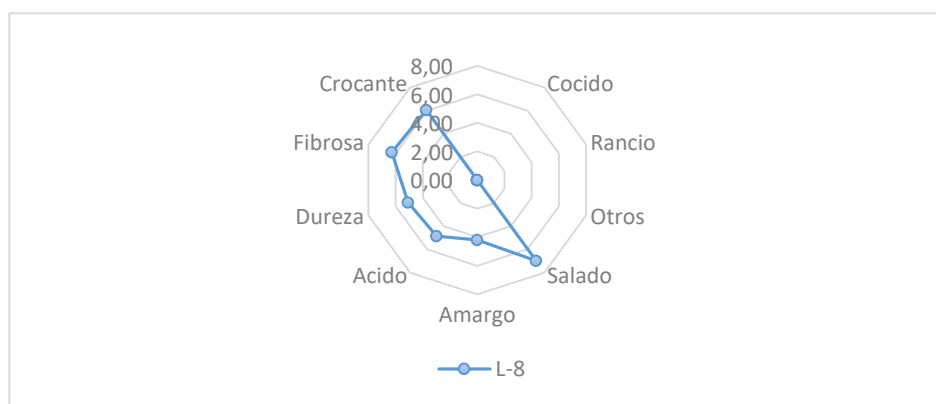
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 7 % de Sal (L-7)



La cepa M07G a 7 % de cloruro de sodio se obtuvieron aceitunas sin sabor anormales, se obtuvieron aceitunas ligeramente fibrosas con un ligero amargor y predomina el sabor salado. Las levaduras son microorganismos que predominan en la fermentación de las aceitunas negras, utilizan más eficientemente los glúcidos y la acidez de las aceitunas es menos intenso.

Figura 46

Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 8 % de Sal (L-



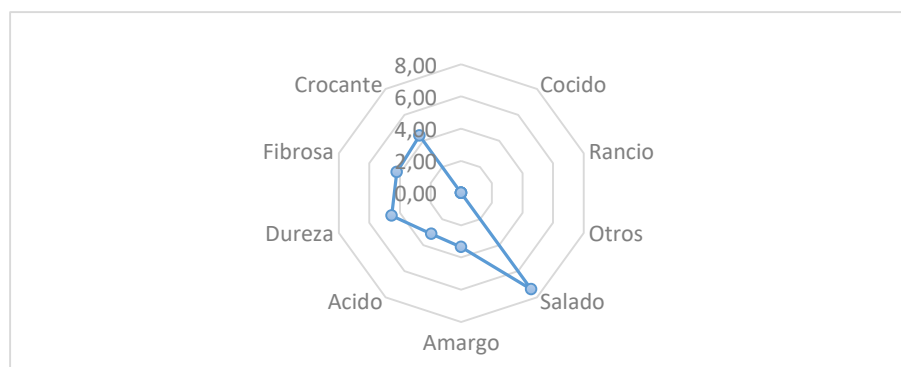
8)

La fermentación con la cepa M07G a 8 % de cloruro de sodio se obtuvieron aceitunas sin características organolépticas negativas, las aceitunas son más crocantes y fibrosas con una ligera acidez y predominando el sabor salado.

Figura 47

Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G a 9 % de Sal (L-

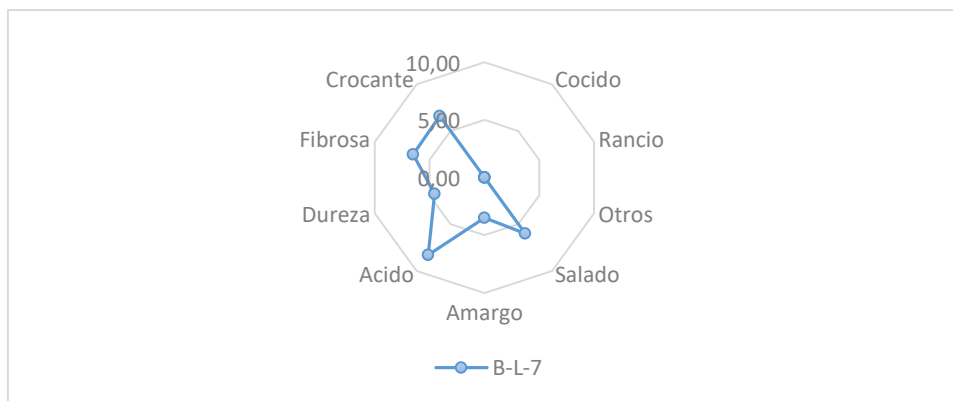
9)



Las aceitunas inoculadas con la cepa M07G al 9 % de cloruro de sodio se obtienen aceitunas medianamente crujientes, algo fibrosas y duras, predomina el sabor salado en comparación con el amargo y el ácido.

Figura 48

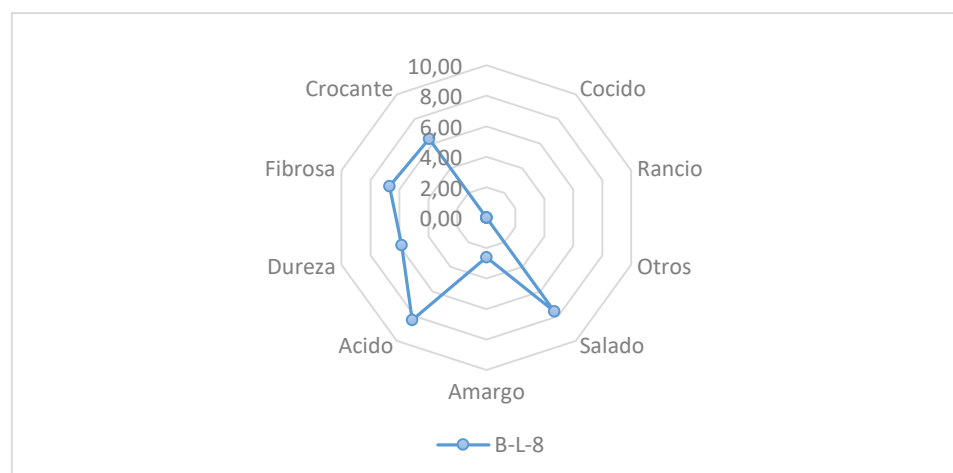
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 7 % (BL-7)



La fermentación de la aceituna inoculada con las cepas M07G y S10A a 7 % de cloruro de sodio se obtiene una aceituna donde predomina el sabor ácido sobre el salado, en textura es una aceituna crocante y fibrosa pero poco dura.

Figura 49

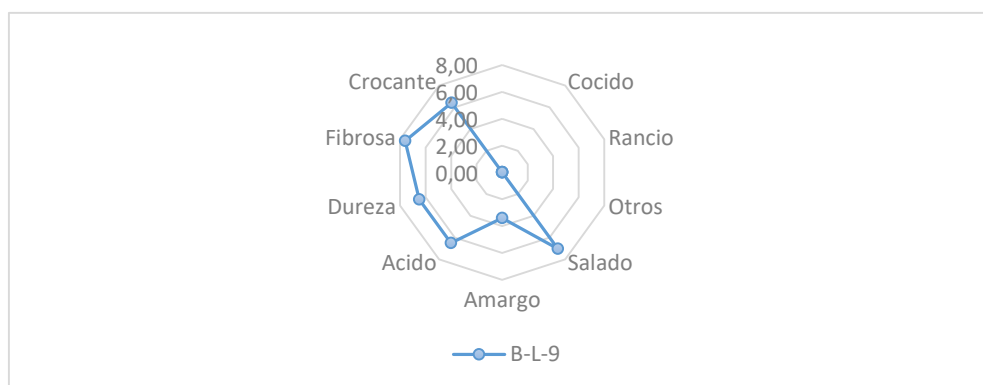
Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 8 % (BL-8)



Los inóculos M07G y S10A a 8 % de cloruro de sodio produce aceitunas con igual intensidad de acidez y salado, pero poco amargo, en textura son crocantes y fibrosas.

Figura 50

Perfil Organoléptico del Tratamiento con Inóculo M07G y S010A de Sal a 9 % (BL-9)



Las aceitunas fermentadas con M07G y S10A, obtienen aceitunas ligeramente ácidas predominando el salado y con una baja percepción del amargo, en textura se obtiene una aceituna fibrosa, dura y ligeramente crocante.

6.4.7 Comparación Sensorial en los Tratamientos a Nivel de Laboratorio.

6.4.7.1 Análisis Sensorial de Sabor Global de la Aceituna

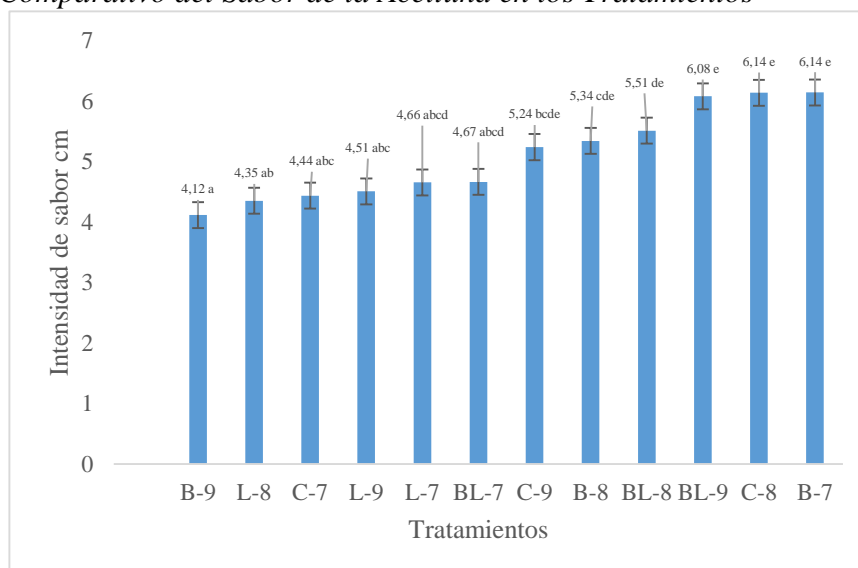
El Análisis Sensorial se realizó con mayor número de participantes, en los que se incluyeron trabajadores de empresas productores de aceituna y gente relacionada al gremio de la aceituna (Anexo 10).

Tabla 2*Análisis de Varianza del Análisis Sensorial de Sabor en la Aceituna*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	426,54	11	38,78	13,83	0,00
Intra grupos	370,21	132	2,80		
Total (Corr.)	796,75	143			

En el análisis de varianza se obtiene un valor p menor a 0,05 %, lo que nos indica que existen diferencia significativa entre los tratamientos del experimento; comparando el sabor de los diferentes tratamientos hay diferencia entre ellos.

Los factores o variables independientes, concentración de sal en la salmuera y aplicación del microorganismo, ha generado cambios en el sabor de la aceituna, posteriormente se puede determinar las diferencias entre los tratamientos.

Figura 51*Comparativo del Sabor de la Aceituna en los Tratamientos*

El análisis sensorial de sabor de la aceituna en los diferentes tratamientos obtiene mayor promedio los tratamientos BL9 (M07G S10A a 9 % de cloruro de sodio), en el Tratamiento Control a 8 % de cloruro de sodio y S010A a 7 % de cloruro de sodio.

Esto nos indica que los microorganismos aplicados como inóculos producen aceitunas agradables sensorialmente.

El Tratamiento Control a 8 %, tiene el segundo promedio más alto sensorialmente sin diferencias significativa con BL-9 y L-7, esto es porque la fermentación no tuvo problemas, y los participantes sienten agradable ese tipo de aceituna.

6.4.7.2 Análisis Sensorial de Ácido de la Aceituna Negra Natural en los Diferentes Tratamientos

Tabla 3

Análisis de Varianza del Análisis Sensorial de Ácido de Aceituna negra natural Fermentada con Inóculos Microbianos

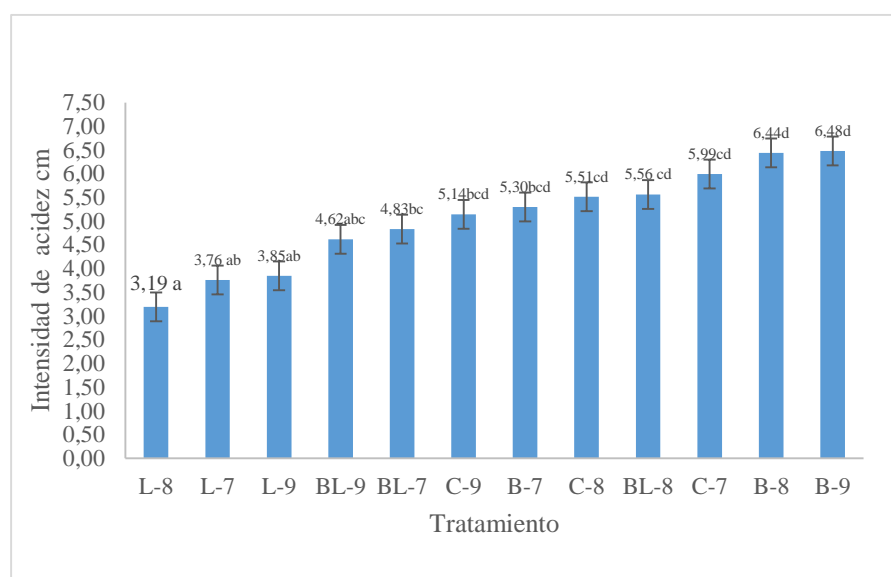
Fuente	Suma de Cuadros	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	560,558	11	50,96	10,01	0,00
Intra grupos	2748,67	540	5,09		
Total (Corr.)	3309,23	551			

El análisis de varianza los tratamientos tienen diferencias significativas en la sensación de ácido, obteniendo un valor p menor a 0,05 %, los factores de sal e

inóculos microbianos tienen una diferencia significativa en el experimento desarrollados.

A continuación, se evidencia las diferencias entre las medias de los diferentes tratamientos.

Figura 52



Comparativo de la Acidez de la Aceituna en los Tratamientos

La acidez evaluada sensorialmente nos indica que los tratamientos con inóculos de levaduras M07G a diferentes concentraciones de cloruro de sodio presentan menor acidez, sin embargo, no hay diferencia significativa entre todos los tratamientos inoculados con levaduras M07G y el inoculado mixto a M07G y S010A a 9 % de cloruro de sodio.

Esto nos evidencia el rol que tienen las levaduras en obtener aceitunas menos ácidas, en todo el experimento se observa un p valor menor a 0,05 % esto nos indica que es significativo el análisis sensorial.

6.4.8 Validación de la tecnología de inoculación da Aceituna Negra Natural a Nivel de Planta Piloto

Se trabajó en tres bodegas diferentes de la Zona de La Yarada-Los Palos, en los cuales se fermentaron 2 tanques de 700 kilos de aceituna, un tanque se inoculó

10^7 y 10^5 UFC/ML, con las cepas S10A y la cepa M07G, los tanques fueron acondicionados con 0,01 % de ácido acético industrial a 500 litros de la salmuera al 9 %.

Se realizó el control microbiológico durante 98 días de fermentación, evaluando la evolución de las bacterias lácticas, levaduras y enterobacterias.

Se seleccionó el tratamiento BL-9, debido a que las levaduras han tenido un rol importante en el sabor ácido, pero las bacterias lácticas nativas, se pueden desarrollar en mayores concentraciones que la cepa S10A y acidificar la salmuera, de igual manera, si sólo inoculáramos levaduras, éstas podrían desarrollarse de una manera desmesurada y provocar mayor cantidad de dióxido de carbono y producir fisheyes en la aceituna.

6.4.8.1 Evaluación Microbiológica y Fisicoquímica de Aceituna Negra Natural en Planta Piloto

Figura 53

Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 1

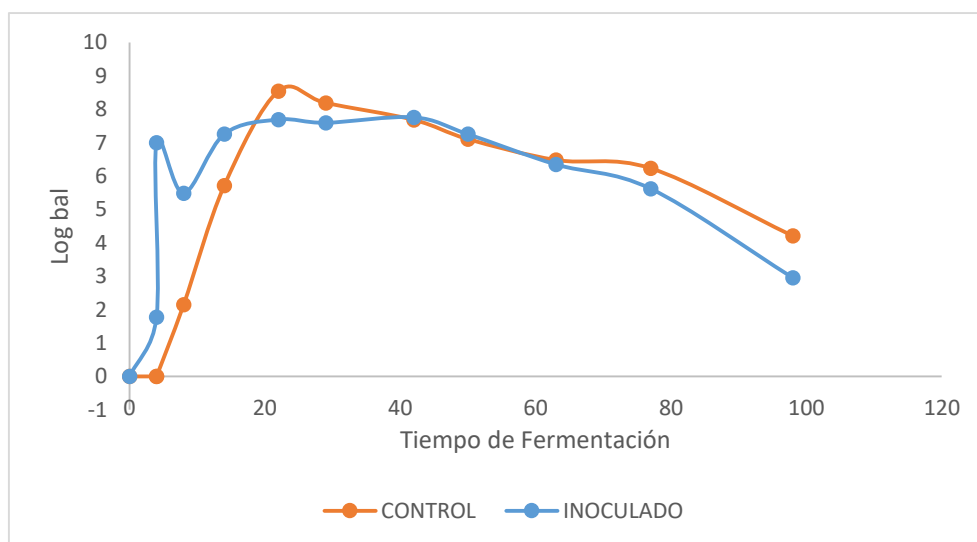
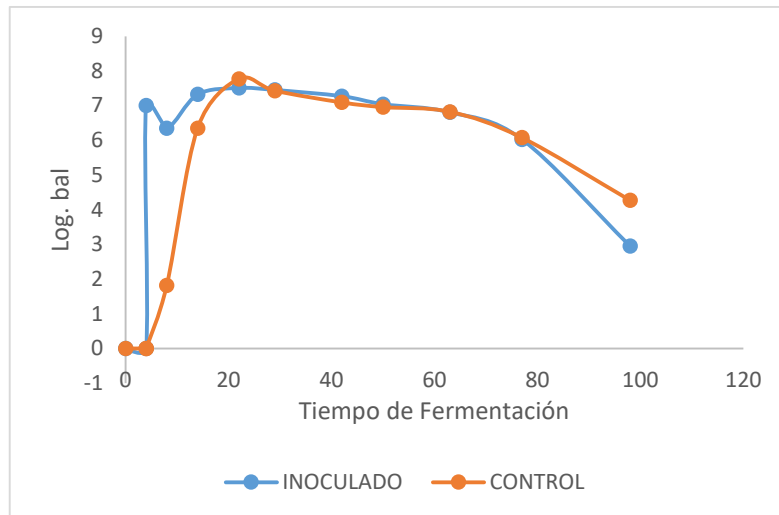
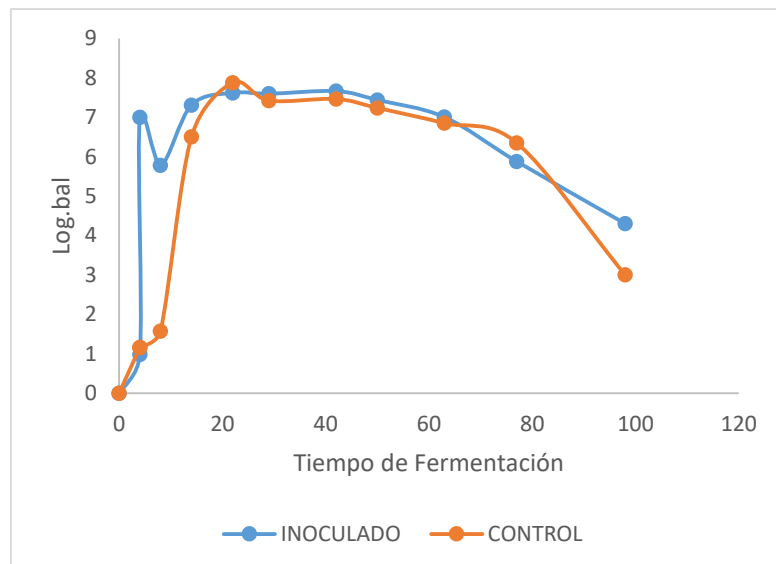


Figura 54

Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 2

**Figura 55**

Comparación de Recuento de Bacterias Lácticas en Tanque Inoculado y Control en Bodega 3



En las **Figuras 53, 54 y 55** se evaluó la evolución de las bacterias lácticas en tanques de fermentación de aceitunas en tres bodegas diferentes en la zona de la Yarada-Los Palos, En los tanques inoculados las cepas S10A y M07G, predominan

en las primeras semanas, es decir la cepa de *Lactiplantibacillus pentosus* S10A, se ha adaptado en la inoculación de bodegas llegando a 7 unidades logarítmicas y baja 6 unidades durante la siguiente semana. Podemos observar que las bacterias lácticas en los tanques inoculados mantienen una fermentación más controlada que no llega a las 8 unidades logarítmicas, sin embargo, en los tanques control los lactobacilos en dos tanques no sobrepasan las 8 unidades logarítmicas, pero en el tanque 01 **Figura 53** llegó a sobrepasar las 8 unidades logarítmicas, al final de la fermentación al día 98 en los 02 tanques la concentración bajó a concentraciones muy bajas en salmuera a 2 unidades logarítmicas y un tanque sí se mantiene en 4 unidades logarítmicas.

Figura 56

Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque inoculado, Bodega 1

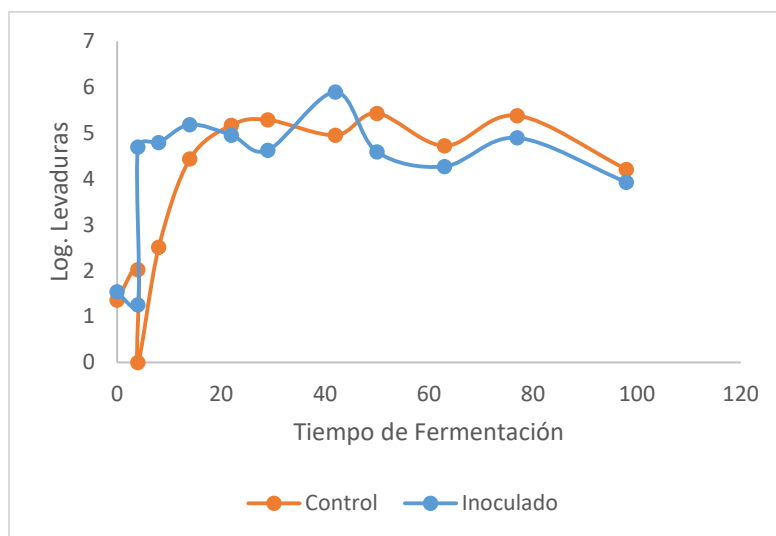
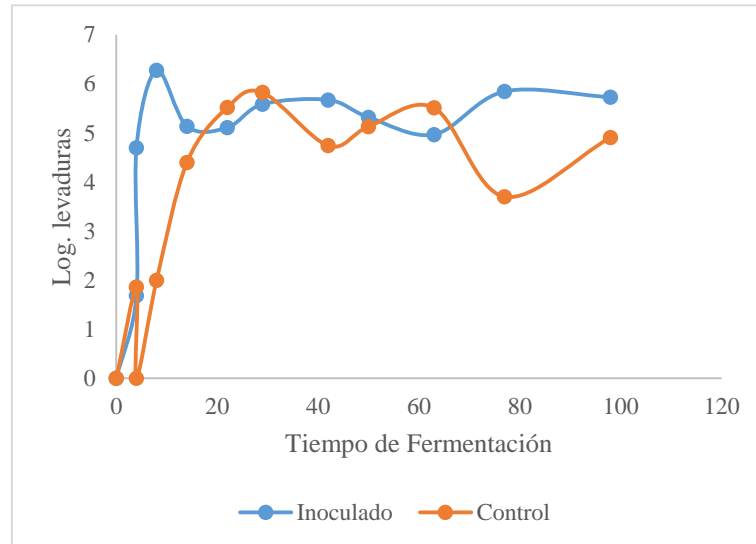
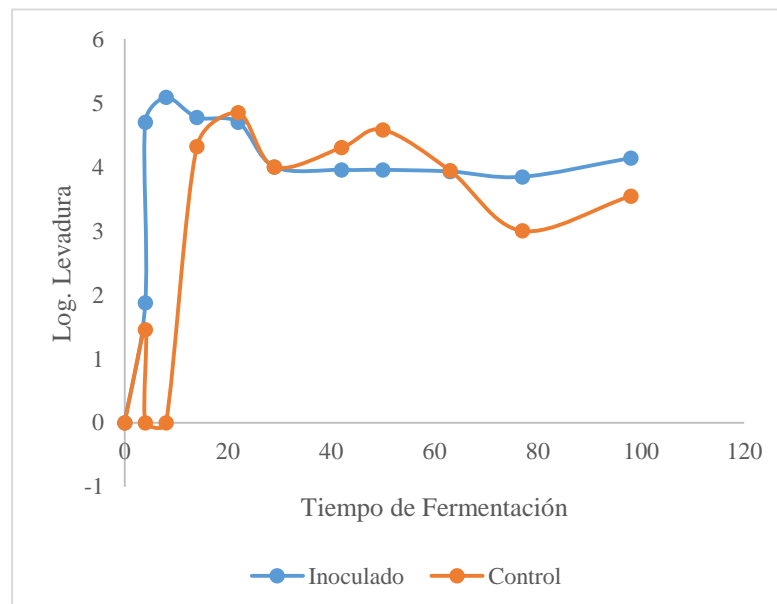


Figura 57

Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2

**Figura 58**

Comparación de Recuento de Levaduras en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 3



En las **Figuras 56, 57 y 58** se evaluó el recuento de las levaduras en los tanques inoculados con la cepa M07G Y S10A, las levaduras incrementan significativamente en las primeras semanas llegando a concentraciones mayores a 5 unidades logarítmicas en la primera semana en los tanques 01 y 03 se mantienen en 5 unidades logarítmicas y el tanque 02 llegó a pasar a 6 unidades logarítmicas, bajando a 5 unidades en la siguiente semana, las levaduras se mantienen en concentraciones estables de 5 unidades logarítmicas durante todo el proceso de fermentación, en los tanques control las levaduras fluctúan y al final la concentración se encuentra en 4 unidades logarítmicas.

Figura 59

Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 1

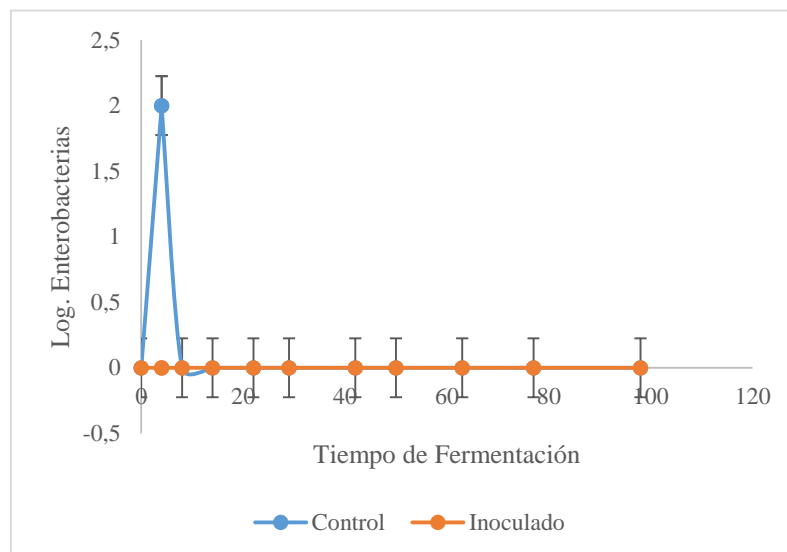
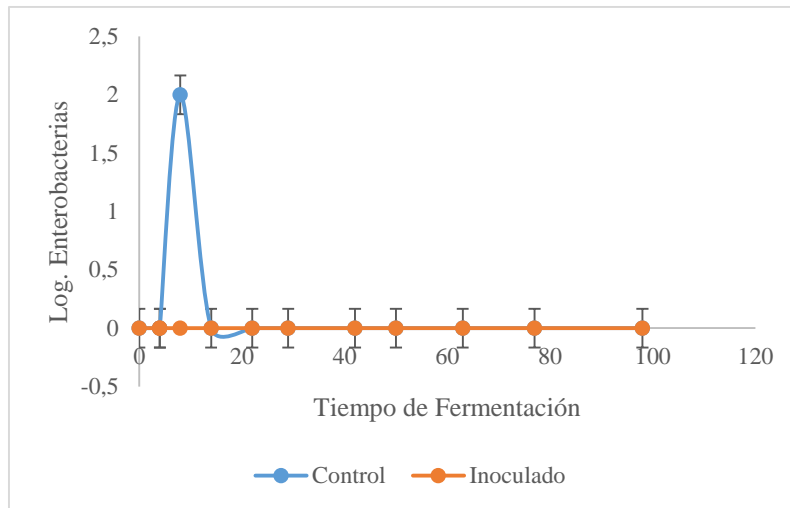
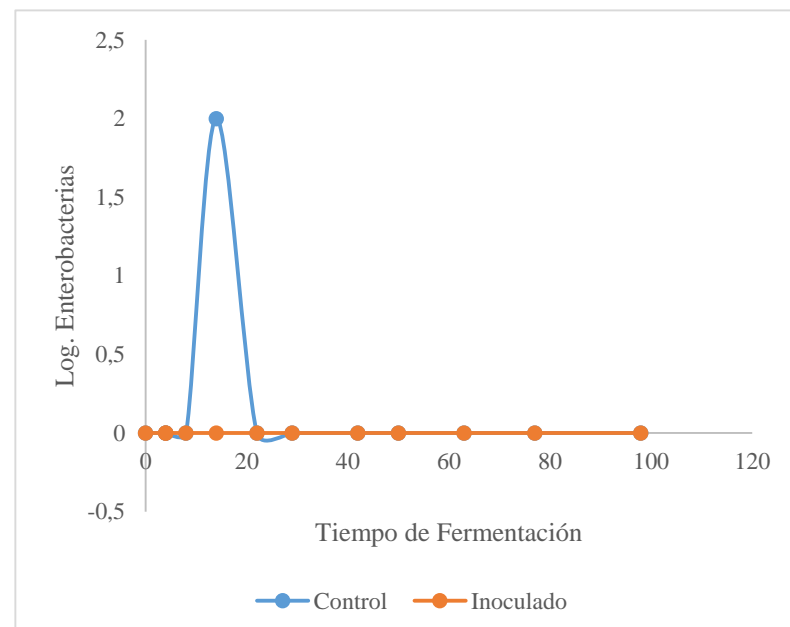


Figura 60

Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2

**Figura 61**

Comparación de Recuento de Enterobacterias en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 3



En las **Figuras 59, 60 y 61**, se evaluó la cantidad de enterobacterias que se pueden desarrollar en los tanques inoculados con S10A y M07G no evidencia enterobacterias, en los tanques control las enterobacterias se encuentran en concentraciones muy bajas pero si se lograron aislar al inicio de la fermentación en 2 unidades logarítmicos.

Esto nos puede indicar que inocular con cepas microbianas puede disminuir el riesgo de un desvío en la fermentación por microorganismos contaminantes, hay que aclarar que la fermentación se realizó con buenas prácticas de manufactura lo que reduce el riesgo de contaminación.

Figura 62

Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 1

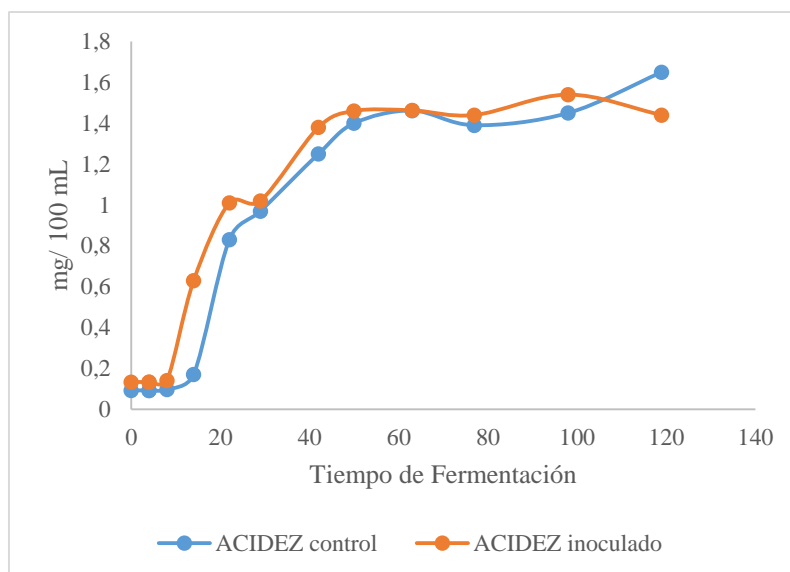
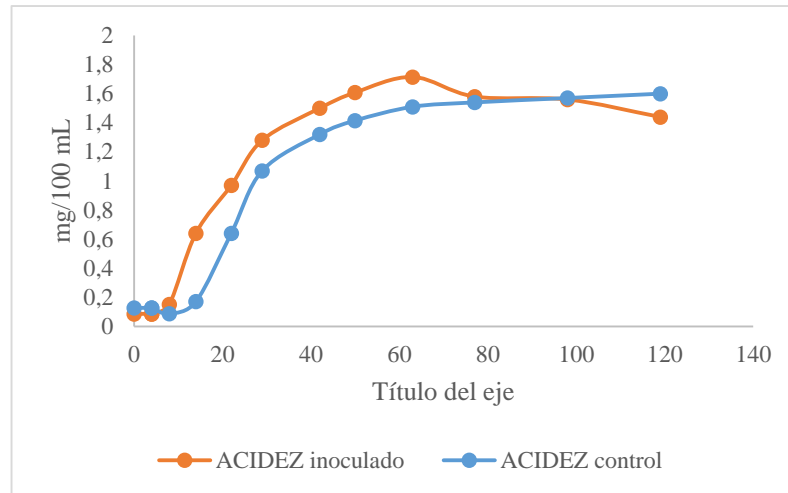
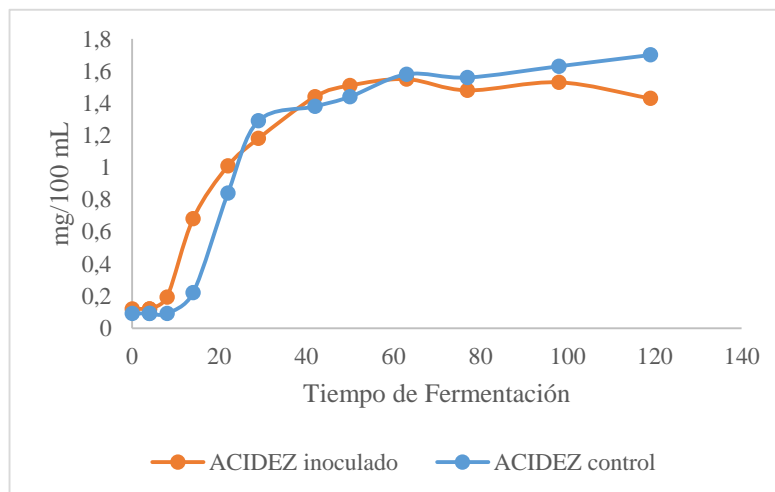


Figura 63

Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque Inoculado, Bodega 2

**Figura 64**

Comparación de Acidez Expresada en Ácido Láctico en Tanque Control y Tanque inoculado, Bodega 3



En las Figuras 62, 63 y 64, la acidez expresada en ácido láctico, podemos observar como la acidez evoluciona más rápido en los tanques inoculados con la cepa S10A y M07G, en la quinta semana los tanques control igualan la acidez a la de los tanques inoculados, se mantienen casi igual hasta el día 98, pero en el día

120 la acidez se encuentra entre 1,6 y 1,7 mg/mL, en las aceitunas inoculadas la acidez es menor en promedio de 1,4 mg/mL.

En los tanques inoculados la acidez es menor a los tanques control.

Figura 65

Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado

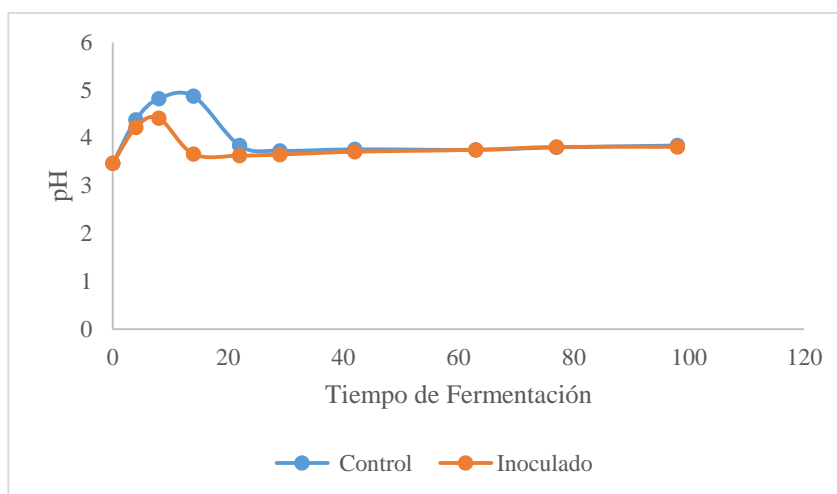


Figura 66

Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado

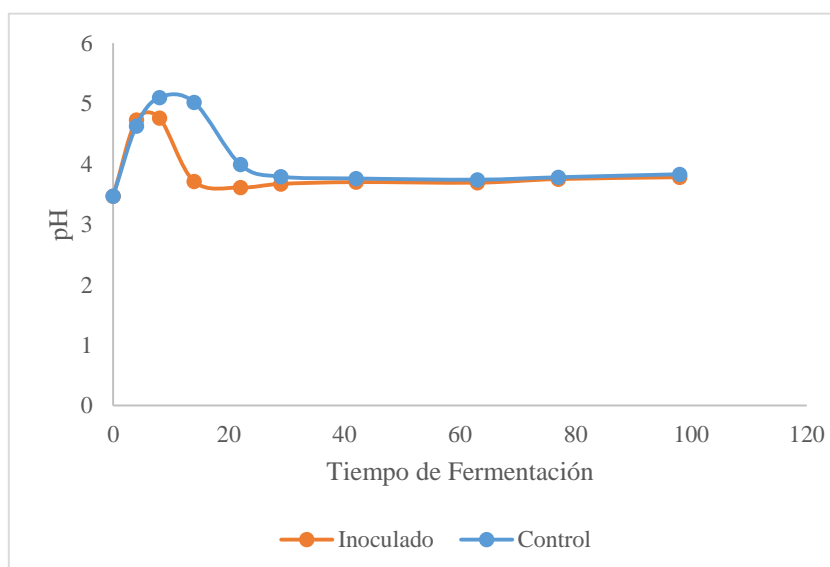
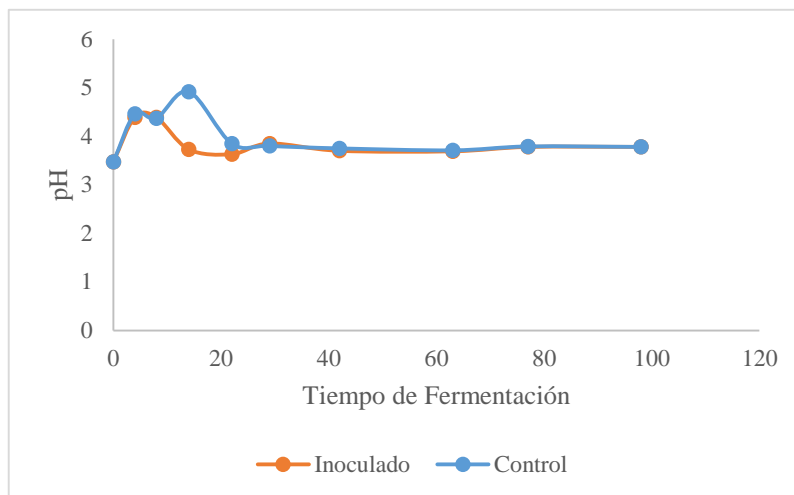


Figura 67

Comparación de pH en Tanque Control y Tanque Inoculado



En la **Figura 65, 66 y 67** se observa la evolución del pH en los tanques inoculados con la cepa M07G y S010A, el pH empieza a 3,7, debido al acondicionamiento de la salmuera con ácido acético 0,01 mg/L, incrementando a 4,5 a 4,7 de pH en la segunda semana, en comparación con los tanques control el pH incrementa a valores mayores a 5 durante la tercera semana, esto puede ocasionar que microorganismos indeseables para la fermentación se puedan desarrollar, entre ellos algunas bacterias y levadura, sin embargo a la cuarta semana el pH baja en todos los tanques inoculados y control a un pH de 3,5.

Esto nos indica que los tanques inoculados y los controles han llevado la fermentación de manera correcta.

6.4.9 Análisis Sensorial de Aceitunas Inoculadas en Planta Piloto, Fermentación Control y Aceitunas Comerciales

6.4.9.1 Análisis Sensorial de Sabor Global de Aceituna Negra Natural Inoculada con microorganismos S10A y M07G

El análisis sensorial se realizó con personas dedicadas a la producción de aceitunas, comercializadoras, productoras y trabajadoras, se realizó solamente un atributo el de acidez y el sabor global de la aceituna (aceptación del producto).

Tabla 4*Códigos de Aceitunas Negras Natural Inoculadas, Control y Comercial*

Tratamiento		Código
Bodega 1	Control	M-1
	Inoculada	M-2
Bodega 2	Inoculada	Y-3
	Control	Y-4
Bodega 3	Inoculada	T-5
	Control	T-6
Comercial	Comercial 1	C-7
	Comercial 2	C-8

Tabla 5*Análisis Sensorial para Determinar el Sabor de la Aceituna en Planta Piloto*

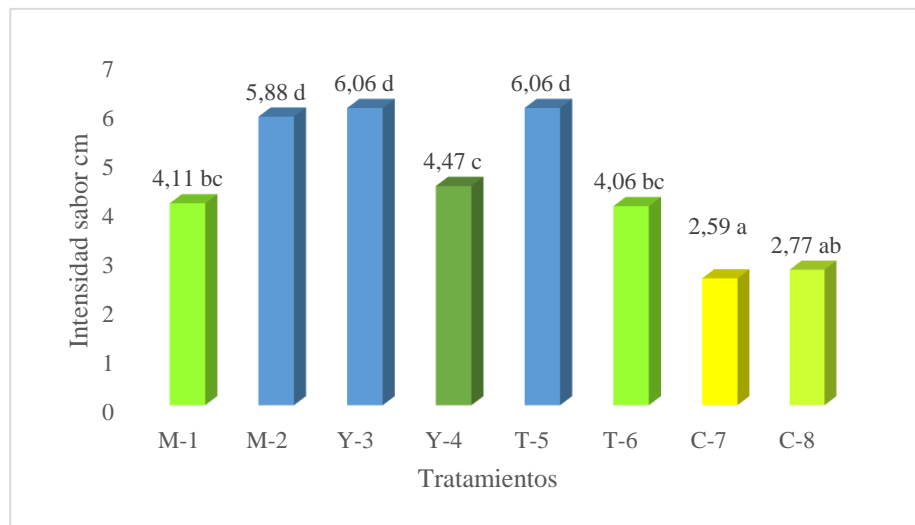
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor -P</i>
Entre grupos	234,24	7	33,46	8,93	0,00
Intra grupos	479,76	128	3,75		
Total (Corr.)	714,0	135			

La **Tabla 5**. descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 8,93, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe

una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura 68

Comparación de Sabor Global de Aceituna Negra Natural en Tanque Control y Tanque Inoculado y Aceitunas Comerciales



El sabor de la aceituna es significativamente mejor en aceitunas inoculadas con la cepa S10A y M07G, los tanques fueron inoculados en diferentes bodegas y los tanques inoculados obtuvieron los valores más altos sensorialmente, seguidamente de los tanques control, eso nos indica que si la fermentación se realiza en buenas condiciones de manufacturas se obtienen aceitunas de sabor aceptable. Se compararon con aceitunas compradas en un mercado local, y estas aceitunas obtuvieron los valores más bajos.

Tabla 6

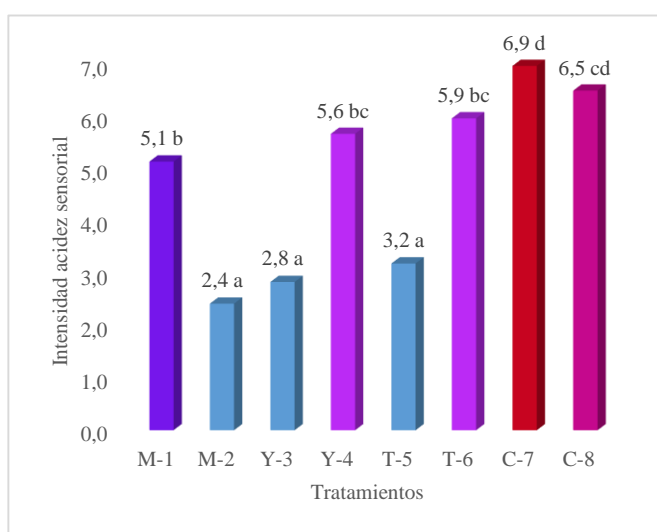
Análisis de Varianza de Acidez en Aceituna Negra Natural Fermentada en Planta Piloto

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	369,58	7	52,80	28,06	0,00
Intra grupos	240,82	128	1,88		
Total (Corr.)	610,40	135			

La Tabla 6 descompone la varianza de acidez en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 52,7973, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de acidez entre un nivel de tratamientos y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Figura 69

Comparación Sensorial de acidez de los tratamientos inoculados con las cepas S10A y M07G, Controles sin Inóculo y Aceituna Comercial



Las sensaciones de acidez se obtuvieron en las aceitunas control, seguidas de las aceitunas fermentadas de manera natural. En los tanques inoculados con la cepa S10A Y M07G (Y-3, M-2 y T5), se obtienen los promedios más bajos de sensación de acidez.

Esto se debe a que la acidez es controlada por la levadura y la cepa S01A no se desarrolla en altas concentraciones y la concentración de las levaduras se mantiene constante desde el inicio de la fermentación. La acidez expresada en ácido láctico es menor a los controles.

6.4.9.2 Perfil Sensorial de las Aceitunas Negras Naturales Inoculadas, Comparadas con Aceituna Control y Aceituna Comercial

El perfil sensorial se realizó con personas expertas en la producción de aceituna negra natural, empresarios e ingenieros encargados de las bodegas y docentes universitarios encargado del curso de Aceitunas.

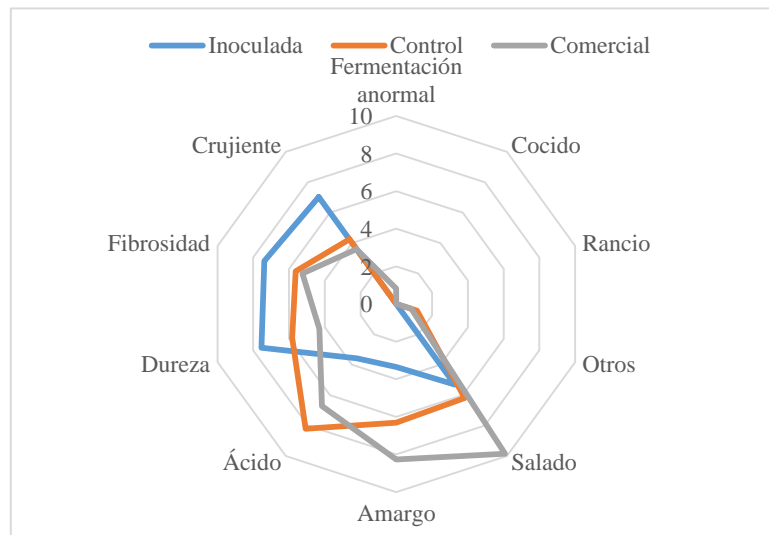
En las aceitunas inoculadas obtuvimos aceitunas con buena textura, baja en acidez y amargor, esto se debe a que los microorganismos han consumido la oleuropeína desde el inicio de la fermentación, la sensación de sabor salado es medio porque las aceitunas fueron fermentadas a 9 % de cloruro de sodio.

La fermentación de aceitunas negra natural en plantan piloto no inoculada se obtuvo una aceituna con menos textura, más ácida, relativamente más ácida, se pudo detectar algunos mínimos defectos en la fermentación.

En las aceitunas comerciales, se determinó un sabor más salado y amargo con una acidez media y tienen una textura más baja. Muchas bodegas fermentan a altas concentraciones de sal o agregan sal para su conservación, lo que no permite que los microorganismos puedan degradar el glucósido de la oleuropeína, lo que da el sabor amargo.

Figura 70

Comparación de los Perfiles de Aceitunas Negras Naturales, Inoculadas con la Cepa S10A, M07G, No Inoculadas y Comercial



Comparando el perfil sensorial, la aceituna inoculada tuvo una mejor textura (fibroso, crujiente y duro), es menos ácida y al ser menos ácida el sabor salado tiene una menor percepción.

Las aceitunas negras naturales fermentadas de manera natural tuvieron una mayor acidez y menos textura.

Capítulo VII: Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Se aislaron hongos filamentosos, levaduras, enterococos, *Bacillus sp* y *Clostridium sp*, del fruto de la oliva.
- Se aislaron levaduras y bacterias lácticas de la especie *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*.
- Las variables independientes tuvieron un efecto significativo en, acidez y recuento de bacterias lácticas.
- Las aceitunas inoculadas con sólo con levaduras y levaduras con bacterias lácticas al 9% de sal, tuvieron una diferencia significativa en la sensación de acidez de la aceituna a nivel de laboratorio comparado con otros tratamientos.
- En la aplicación de los inóculos (bacteria láctia-levadura al 9 % de sal) en Planta Piloto, se obtuvieron aceitunas con una menor acidez, determinada fisicoquímicamente y sensorialmente.

7.2 RECOMENDACIONES

- Seguir haciendo estudios para desarrollar inóculos con potencial probiótico para las aceitunas.
- Realiza estudios de capacidad probiótica de las cepas de *Lactiplantibacillus pentosus* en las aceitunas negras naturales.
- Hacer un análisis de dióxido de carbono en las salmueras.
- Realizar estudios para optimizar la producción de inóculos microbianos nativos para la aceituna negra natural.

7.3 Bibliografía

- Azhar, M. A., & Abdul Munaim, M. S. (2019). Identification and Evaluation of Probiotic Potential in Yeast Strains Found in Kefir Drink Samples from Malaysia. *International Journal of Food Engineering*, 15(7), 20180347. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2018-0347>
- Benítez Cabello, A., Gil, V., Medina, E., Garrido Fernández, A., & Arroyo-López, F. (2020). Exploring bacteria diversity in commercialized table olive biofilms by metataxonomic and compositional data analysis. *Scientific Reports*, 10, 11381. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68305-7>
- Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L., Langella, P., Martín, R., Jiménez Díaz, R., & Arroyo López, F. N. (2019). Probiotic Properties of Lactiplantibacillus Strains Isolated from Table Olive Biofilms. <https://doi.org/10.13039/501100003329>
- Bonatsou, S., Paramithiotis, S., & Panagou, E. Z. (2018). Evolution of Yeast Consortia during the Fermentation of Kalamata Natural Black Olives upon Two Initial Acidification Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02673>
- Abdelfattah, A., Nicosia, M. G., Mosca, S., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2014). Metagenomic analysis of the fungal microbiome in the olive canopy.
- AOAC (2007). *Official Methods of Analysis*, 18th Ed., AOAC International.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003>.
- Arslan, D. Özcan, M. (2011). Phenolic prolife and antioxidant activity of olive fruits of the Turkish variety “Sariyak” from different locations. *Grasas y Aceites* 62, 453-461.

- Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Morales, M. L., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2019). Lactic Acid Bacteria and Yeast Inocula Modulate the Volatile Profile of Spanish-Style Green Table Olive Fermentations. *Foods*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/foods8080280>
- Bernabé, L. (2002). Evaluación de la calidad sensorial de la aceituna de mesa tipo negra, obtenida mediante el empleo de ácido acético y cultivos iniciadores de *Lactobacillus plantarum* nativos (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre. Tacna – Perú.
- CODEX STAN 66-1981 (2013) NORMA DEL CODEX PARA LAS ACEITUNAS DE MESA Recuperado de: www.fao.org/input/download/standards/243/CXS_066s.pdf.
- CONSEJO OLEICO INTERNACIONAL, C.O.I. (2004). Recuperado de: www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4131-met-ot-org-esp
- CONSEJO OLEICO INTERNACIONAL, C.O.I., Método “Análisis Sensorial de Aceituna de mesa (2008). Recuperado de: www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4131-met-ot-org-esp
- Dirección Regional de Agricultura Tacna (D.R.A.T.) (2016). Recuperado de: http://www.agritacna.gob.pe/gestores/estadistica/of_ol_estadidet_e/archivos/9264028117_5464912764.pdf
- Demirci, H., Kurt-Gur, G., & Ordu, E. (2021). Microbiota profiling and screening of the lipase active halotolerant yeasts of the olive brine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(2), 23. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02976-2>
- Durán Quintana, M. C., Romero Barranco, C., García García, P., Brenes Balbuena, M., & Garrido Fernández, A. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites*, 48(5), 297-311. <https://doi.org/10.3989/gya.1997.v48.i5.806>
- Durán, C. y González, F. (1973). Estudio Microbiológico de la Fermentación de la aceituna negra maduras en salmuera. *Microbiología España*. 26, 149-164

- Durán, C., Romero, O., García, P., Brenes, M., Garrido, A. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites*. 48, 297-311.
- Escalante, W. E., Rychtera, M., Melzoch, K., Polo, E. Q., & Sakoda, B. H. (2012). Estudio de la actividad fermentativa de *Hansenula anomala* y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. *Revista peruana de Biología*, 18(3), 325–334. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.445>
- Espinoza Atencia, Eli. 2000. Evaluación Sensorial de los alimentos. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna – Perú.
- Estrada, J. (2011). La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Recuperado de: <http://multimedia.dipusevilla.es/fundacionaceituna/documentos/libroaceitunamaqueta080411.pdf>
- Feldman, S. R. (2005). Sodium Chloride. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 1–27.
- Fernandez, A. G., Adams, M. R., & Fernandez-Diez, M. J. (1997). *Table Olives: Production and processing*. Springer Science & Business Media.
- Fernández, J., Castro, R., Garrido, A., Heredia, A., Nosti, M., Castro, A. (1985). “Biotecnología de la aceituna de mesa”. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid – Sevilla.
- Fleming, H. y McFeeiers, R. (1982). Use of microbial cultures: vegetable Products *Food Technol.* 35, 84-88.
- Frazier, C. y Westhoff, D. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Gallegos, M. (2005) Proceso de Transformación de la Aceituna. Recuperado de: www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/027-d-olivo.pdf
- García, P., Durán, C., Garrido A. (1985). Fermentación aerobia de aceitunas maduras en salmuera. *Grasas Aceites* (36), 14-20.
- Garcia-Gonzalez, N., Battista, N., Prete, R., & Corsetti, A. (2021). Health-Promoting Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Fermented

- Foods. Microorganisms, 9(2), 349.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020349>
- Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M., & Asehraou, A. (2011). Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas Y Aceites*, 62(1), 84–89. <https://doi.org/10.3989/gya.055510>
- Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M., & Asehraou, A. (2011). Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites*, 62(1), 84-89. <https://doi.org/10.3989/gya.055510>
- Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M., & Asehraou, A. (2011). Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites*, 62(1), 84-89. <https://doi.org/10.3989/gya.055510>
- Gil, W. (2018). Aseguramiento de la calidad en el proceso de Elaboración de aceitunas para aumentar la Rentabilidad de la empresa Eduardo SAC. Tarapoto, 2018. [Tesis de Título Profesional inédita]. Universidad César Vallejo.
- González_Crespo, C. (2018). Aplicación de *Lactobacillus spp.* como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes. Recuperado de <http://tauja.ujaen.es/jspui/handle/10953.1/8657>
- Guevara, A. (2015). PROCESAMIENTO DE ACEITUNA, Recuperado de <file:///D:/MAESTR%C3%8DA/Tesis%20de%20Maestr%C3%ADa/INFO MACI%C3%93N%20BIBLIOGR%C3%81FICA/Separata%20procesamiento%20de%20la%20aceituna-la%20molina%20aceituna.pdf>
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24(4), 346-351. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.022>
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., & Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from

- the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 178-188.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044>
- Herrera, S. R.-M. S. de, González, A. M., León, A. H., & Palencia, R. C. (2010). Nuevas tecnologías en la elaboración de la aceituna de mesa. *La agricultura y la ganadería extremeñas: informe 2009, 2010*, ISBN 978-84-88956-99-6, págs. 105-119, 105-119.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3345177>
- ICMSF (1992). "International Commission on Microbiological Specifications for Foods". *Microorganismos de los alimentos. Vol. 1. Técnicas de Análisis Microbiológicos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- INEI (julio 2018). Producción Nacional. Recuperado el 20 de febrero de 2019, de https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/09-informe-tecnico-n09_produccion-nacional-jul2018.pdf.
- Kaltsa, A., Papaliaga, D., Papaioannou, E., & Kotzekidou, P. (2015). Characteristics of oleuropeinolytic strains of *Lactobacillus plantarum* group and influence on phenolic compounds in table olives elaborated under reduced salt conditions. *Food Microbiology*, 48, 58-62.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.016>
- Koc, C., Rospigliosi, W., Arata, M., Sepúlveda, P., & Ochoa, C. (2013). Aeration and Sodium chloride in the develop of microflora and phycochemical parameters on the *Olea europaea* L. cv Sevillana fermentation at the natural black style in La Yarada zone-Tacna. *Grasas y Aceites*, 64(3), 320–327.
<https://doi.org/10.3989/gya.131212>.
- Leveau, J y Bauix, M. (2000). *Los Microorganismos de Interés Industrial* Editorial Acribia. Zaragoza- España.
- Li, X. Y., Liu, Z. Q., & Chi, Z. M. (2008). Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: Optimization by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99(14), 6386-6390.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.065>

- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos Ed. Prentice Hall 10ma Edición.
- Marquina D., toufani S., Llorente P., Santos A., y Peinado J. M. (1997): Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Adv. Food Sci.*, 19; 41-46.
- Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., & Quintas, C. (2016). The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.008>
- Mourad, K., & Nour-Eddine, K. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum* ... *Grasas Y Aceites*, 57(3), 292–300. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i3.51>
- Penland, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur, C., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., & Coton, M. (2020). Deciphering Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black Olive Natural Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586614>
- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., Arroyo-López, F. N. (2018). Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food Microbiology*, 69, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.010>
- Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., Mazzaglia, A., & Caggia, C. (2014). Giarrappa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: Effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. *Food Research International*, 62, 1154-1164. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.056>

- Reporte de Comercio Regional Tacna Primer Semestre (2020), Recuperado de :
<https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1397083/RCR%20-%20Tacna%202020%20-%20I%20Semestre.pdf>
- Rodríguez, M. Peiró.J, Oria. R y Blanco D (2006) Diferentes condiciones de fermentación de aceitunas negras en salmuera variedad Empeltre del Bajo Aragón
 Recuperado de:
<http://www.horticom.com/pd/imagenes/67/813/67813.pdf>
- Rodriguez-Gómez, F., Gil, V., Bautista-Gallego, J., García-García, P., Garrido Fernández, A., & Arroyo-López, F. (2014). Production of potential probiotic Spanish-style green table olives at pilot plant scale using multifunctional starters. *Food Microbiology*, 44, 278–287.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.023>
- Siles, J. A., Rachid, C. T. C. C., Sampedro, I., García-Romera, I., & Tiedje, J. M. (2014). Microbial Diversity of a Mediterranean Soil and Its Changes after Biotransformed Dry Olive Residue Amendment. *PLoS ONE*, 9(7), e103035.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>
- Sofo, A., Mininni, A. N., Fausto, C., Scagliola, M., Crecchio, C., Xiloyannis, C., & Dichio, B. (2019). Evaluation of the possible persistence of potential human pathogenic bacteria in olive orchards irrigated with treated urban wastewater. *Science of The Total Environment*, 658, 763-767.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.264>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactiplantibacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactiplantibacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de Consistencia

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variable e Indicadores	Metodología	Recomendaciones
Hipótesis General					
¿Se puede desarrollar una propuesta de proceso de fermentación de aceituna negra aplicando inóculos microbianos nativos y cloruro de sodio para manipular la acidez de la aceituna negra natural?	Proponer un proceso de fermentación aplicando microorganismos nativos y cloruro de sodio para manipular la acidez de la aceituna negra.	Se propone un proceso de producción de aceitunas inoculadas con microorganismos al 8 % de cloruro de sodio, que tienen un efecto en la acidez, sensorial y en los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales.	Variable independiente: Proceso de fermentación aplicando microorganismos y cloruro de sodio Indicadores: ufc y % (porcentaje) Variables dependientes: Aceitunas con acidez diferenciada Indicadores: sensación de acidez y sabor (cm). Acidez (g/L). microorganismos (ufc)	Tipo de Investigación: Aplicada Diseño de la investigación Descriptivo correlacional y Factorial Multinivel	Realizar un análisis metagenómico de la flora microbiológica de la salmueras
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	Hipótesis Específicas	Metodología	

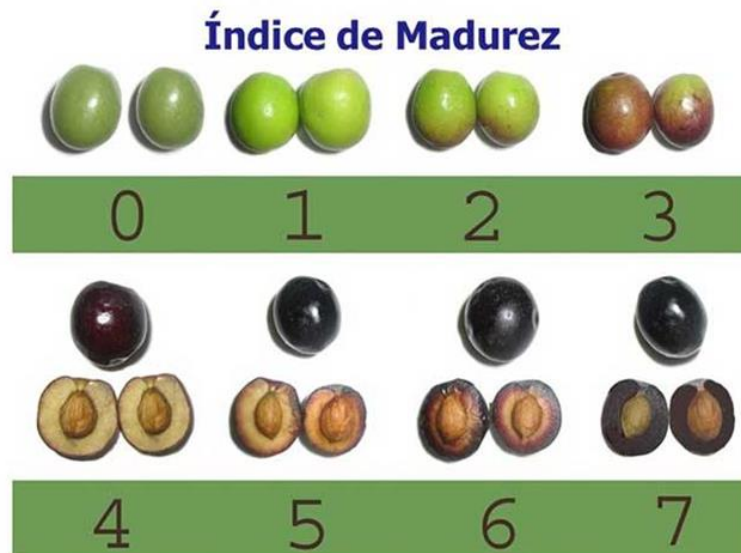
¿Cuál es la flora microbiana de la aceituna y de estas es posible aislar, identificar y seleccionar de la aceituna como fruto natural y de las salmueras para ser utilizado como inóculo?	Estudiar la flora microbiana, aislar, identificar y seleccionar cepas del fruto de la aceituna y salmueras, para ser utilizadas como inóculo.	Se conoce la flora microbiana de la aceituna, y se aíslan, identifican y se seleccionan para ser utilizadas como inóculo.	Variables independientes: Aceitunas Frescas, Salmueras Indicadores: Tipo de muestra (S: salmuera A: aceituna) Variables dependientes: Tipo de microorganismos Indicadores: género o especie microbiano Variables independientes: Tipo de microorganismos Indicadores: genero o especie bacteriana	Ámbito de Estudio Aceituna negra natural del distrito de La Yarada Los Palos. Población Aceituna de La Yarada Los Palos Muestra 100 kilos de aceituna Técnica de recolección de datos	
---	---	---	--	---	--

Problemas Especificos	Objetivos Especificos	Hipótesis Especificas	Hipótesis Especificas	Metodologia
			<p>Variables dependientes: Características fisiológicas y bioquímicas</p> <p>Indicadores: pH, fermentación de carbohidratos, crecimiento a diferentes concentraciones de sal, morfología y gram, producción de dióxido de carbono, crecimiento a distintos pH</p> <p>Variables independientes: Tiempo</p> <p>Indicadores: días</p>	<p>Descriptiva: Aislamiento e identificación de microorganismos. Evolución de la flora microbiana, pH y acidez en 90 días de fermentación:</p> <p>Experimental: Aplicación de un diseño factorial para evaluar el efecto de las variables Levaduras, levaduras y bacterias lácticas en el proceso de fermentación de la aceituna negra natural.</p>
¿Cómo evoluciona la flora microbiana y los parámetros fisicoquímicos en el proceso de fermentación inoculado con cepas nativas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio?	Evaluar el proceso microbiológico y fisicoquímico de los diferentes tratamientos	Los lactobacilos y levaduras se detectan al inicio de la fermentación en los tratamientos inoculados con microorganismos	<p>Variables dependientes: Evolución de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos durante el proceso de fermentación (90 días)</p> <p>Indicadores: ufc/mL, 100 g/L y pH.</p> <p>Variables independientes: Bacteria láctica, Levadura, cloruro de sodio</p>	
¿Cuál es efecto de la aplicación de microorganismos nativos en el proceso de fermentación de aceituna	Determinar el efecto de microorganismos nativos (bacteria láctica y levaduras) en la	Las aceitunas inoculadas con levaduras tienen un efecto en la acidez y sensorialmente son diferentes a las inoculadas con	Indicadores: microorganismos en ufc/ml, cloruro de sodio %	

Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	Hipótesis Específicas	Metodología
negra a natural var. Sevillana, a diferentes concentraciones cloruro de sodio?	fermentación de aceituna negra natural var. Sevillana, a diferentes concentraciones cloruro de sodio.	bacterias lácticas y la sal tienen un efecto en los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales.	<p>Variables dependientes: acidez, pH, bacterias lácticas, levaduras, análisis sensorial (ácido y sabor global).</p> <p>Indicadores: Indicadores: microorganismos en ufc/ml, acidez: expresado en porcentaje de ácido láctico, pH: mv</p>	<p>Instrumentos</p> <p>Aislamiento e identificación de microorganismos (ICMFS)</p>
¿Existen diferencias significativas en el sabor y acidez de la aceituna?	Evaluar sensorialmente la acidez y sabor los diferentes tratamientos	Las aceitunas fermentada con levaduras tienen menor acidez, las aceitunas fermentadas con levaduras no tienen una diferencia significativa en el sabor con los demás tratamientos	<p>Indicadores: ufc/mL y 100 g/L</p> <p>Variables dependientes: sensación de acidez y aceptación</p> <p>Indicadores: cm en sensación de sabor y acidez, ufc/mL y 100 g/L y perfil sensorial</p> <p>Variables independientes: concentración de Bacteria Láctica y Levadura, concentraciones de cloruro de sodio.</p>	<p>Recuento en placa de levaduras, bacterias lácticas y enterobacterias (ICMFS)</p> <p>Análisis fisicoquímicos de acidez y pH (AOAC).</p> <p>Software: Stat-Graphic y Excel Microsoft para el análisis de los datos.</p>

Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas	Hipótesis Específicas	Metodología
¿Se puede validar el proceso a escala piloto en 3 bodegas de la Yarada - los Palos?	Validar un proceso de fermentación aplicando microorganismos nativos en bodegas de la Yarada – Los Palos.	Aplicar el mejor tratamiento que produce aceitunas con menor acidez	<p data-bbox="1122 440 1323 459">Indicadores: ufc/mL y 100 g/L</p> <p data-bbox="1122 555 1368 616">Variables dependientes: sensación de acidez y aceptación, bacterias lácticas, levaduras, acidez y pH.</p> <p data-bbox="1122 663 1357 724">Indicadores: cm en sensación de sabor y acidez , ufc/mL y 100 g/L y perfil sensorial</p>	

Anexo 2: Cambio de Coloración del Epicarpo y Mesocarpo de la Aceituna en Diferentes Estados de Maduración



Referencias numéricas de cada uno de los estados para evaluar el Índice de Madurez del fruto.

Fuente: *IFAPA de Córdoba*

Anexo 3: Puntos de Muestreo

Unidad de muestreo		Nombre del usuario	Área	Número
N° de muestras	N° de Predio seleccionados		de cultivo (Ha)	Aproximado de Olivos por Predio (100 olivos/ Ha)
1	399	Rolando Mamani Mamani	6	616
2	527	Carmen Castro	8	800
3	636	Rufino Mendoza	5	510
4	134	Esteban Linares	6	600
5	536	Carlos Conde Castillo	6	600
6	763	Kenneth Ayca Copare	4	400
7	484	Liliana Limache	1	124
8	754	Mariano Mamani Castro	10	1000
9	377	Juan Choquecota Arancibia	4	400
10	554	Carlos Mendoza Lima	3	300
11	319	Sr. Antonio Paria	5	500
12	545	Sr. Alejandro Limache Mamani	3	300

13	495	Sra. Graciela Huaclla de Rivera	6	688
14	264	Sr. Angel Eguiluz Valdivia	7	700
15	93	Sr. Alejandro Centeno Aguilar	10	1364
16	50	Sr. Alvaro Flores Quispe	6	600
17	28	Sr. Gustavo Vargas	7	690
18	651	Sr. Luis Calderón Mamani	5	500
19	544	Sr. Feliciano Ninaja	8	740
20	425	Sr. Carlos Pinto García	3	250
21	704	Sr. Fernando Castro	10	1000
22	722	Sr. Eusebio Mendoza Lanchipa	8	800
23	470	Sra. Griselda Casilla Velásquez	10	1048
24	459	Sr. Emilio Choque Alejo	10	1000
25	505	Jesús Salas	8	800
26	349	Leonidas Flores	9	900
27	63	Rodolfo Alférez	15	1520
28	744	Humberto Delgado	13	1300
29	822	Jose Apaza Choquecota	12	1200

30	300	Roberto Mamani	10	107
31	809	Hidalgo Escobar Cotrado	4	400
32	318	Ricardo Llanos Catacora	5	500
33	875	Gilberto Arancibia Cotrado	6	600
34	559	Rigoberto Arana Espinoza	7	700
35	151	Lidia Machaca Quispe	2	200
36	40	Hugo Salas Choque	3	300
37	200	Lucrecia Mateo	4	400
38	769	José Mendoza	4	400
39	111	Alejandrina Rivera Castro	3	300
40	111	José Sosa Gallegos	6	600
41	14	Mariano Ayala Sayuca	4	400
42	471	Domingo Calizaya Ramos	6	600
43	711	Teodoro Miranda Flores	5	500
44	712	Filomena Copa Ale	4	400
45	410	Higinia Luque Calizaya	5	500
46	429	Estela Castro Coaquera	7	700

47	199	Grisela Pino Tejada	6	600
48	289	Carmen Solari Salinas	5	500
49	105	Darío Arias Arias	8	800
50	246	Lucio Cruz Cáceres	15	1500
51	324	Nicolás Churacutipa Chino	6	600
52	369	Martín García Espinoza	5	500
53	127	Asentamiento 28 de Agosto	7	700
54	413	Mario Santos Arias	6	600
55	53	Estela Castro Coquera	7	700
56	210	Vidal Casilla Coronado	4	400
57	464	Biondi y Cia de Tacna S.A.C	120	12000
58	94	Estela Castro Coquera	7	700
59	369	María Espinoza Machaca	6	600
60	471	Faustino Sacara Quenta	6	600
61	235	Bermejo	70	7000
62	727	Baumann	140	14000
63	689	José Bendezu Revilla	5	500

Anexo 4: Muestreo de la Aceituna

La determinación de las unidades de muestreo se realizó mediante el Muestreo, Aleatorio Simple, para determinar el predio, se trabajó con un 90 % de confianza y 10 % de error, se tiene una población de 890 predios y se tomaron 63 muestras.

Los predios muestreados fueron seleccionados del padrón de usuarios de la Yarada-Los Palos. En cada predio se seleccionaron los árboles por cada sector en zig-zag, y en cada sector se tomaron 5 árboles tomando medio y extremo 1 kg por árbol en las zonas externas e internas del árbol. Para obtener la muestra del predio, se realizó por la técnica del cuarteo hasta obtener $\frac{1}{2}$ kg por muestra.

Las bodegas se seleccionadas las que cumplen con las condiciones de higiene, entre las cuales se encuentran las bodegas de la Asociación 28 de Agosto, Biondi y Cia., Boumann y Crosby, Bermejo.

Se seleccionaron los tanques de fermentación que tenían más de 6 meses de fermentación y de los cuales indicaban que no había tenido problemas en la fermentación y el productor indicaba que eran los tanques con mejores características organolépticas.

Se consideró un total de 66 unidades de muestreo Anexo 3, donde cada uno de ellos corresponde a un predio de las zonas de cultivo de olivo, las cuales están debidamente numeradas, indicando el área de cultivo en hectáreas (Ha).


El número de árboles por predio se ha calculado multiplicando el área en hectáreas por 100, ya que, según las prácticas agrícolas, por cada hectárea de cultivo se siembran 100 árboles de olivo y según la información brindada por los productores dueños de los campos muestreados.

Según la información contenida en el padrón de usuarios y predios agrícolas se obtuvo el Anexo 3.

Anexo 6: Plataforma EZ-Biocloud para identificación de la cepa *Lactiplantibacillus pentosus*

Identification Result [Back to my Identifications](#)

Sequence details

Full name	Anonymous_20210228_051427
Length	906 bp Sequence
Orientation	Reverse
Completeness	60.3%  (1 ~ 906)
Database ver.	2020.10.12

List of hits from EzBioCloud 16S database

Select hits by database All Valid names only Excel FASTA EzEditor2 ⌵

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Variation ratio	Hit taxonomy	Completeness (%)
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	DSM 20314(T)	AZCU01000047	99.11	8/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactobacillus argentoratis</i>	DSM 16365(T)	CP032751	98.99	9/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	98.99	9/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	CM001538_s	KCA1	CM001538	98.88	10/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	98.77	11/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	CP032744	98.66	12/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i>	LMG 26013(T)	JQCL01000078	98.55	13/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus garii</i>	FI11369(T)	MN817919	98.36	14/855	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	96.6
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus plajomi</i>	NB53(T)	AB907190	98.32	15/894	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Lactiplantibacillus daoliensis</i>	116-1A(T)	LC438516	98.25	15/855	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	96.8

Showing 1 to 10 of 50 rows 10 rows per page < 1 2 3 4 5 >

Anexo 7: Caracterización de Hongos Miceliales

1. CEPA N° 1

✓ **Características macroscópicas de colonia en medio OGYE:**

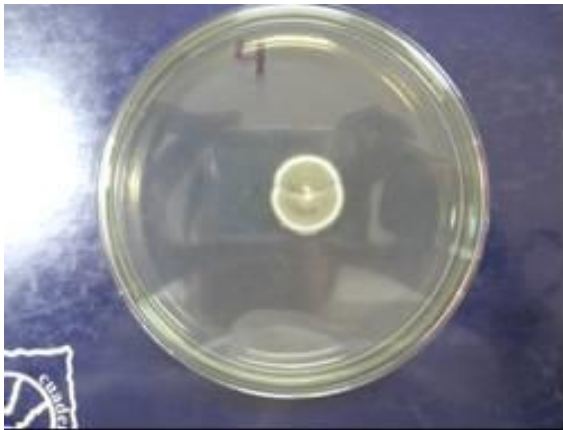
Aspecto: Aterciopelado, tiende a formar líneas radiales.

Consistencia: Blanda

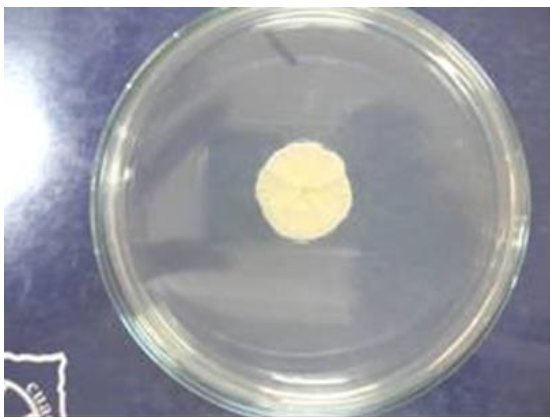
Color anverso: Verde claro azulado, borde blanco

Color reverso: crema con tonalidad amarilla

Desarrollo: lento



Colonia de *Penicillium sp*



Reverso de Colonia *Penicillium sp*

✓ **Características microscópicas**

Micelio: Septado, hialino, hifas delgadas

Conidia: Unicelular, en cadena, hialino (forma de cepillo)

Conidioforo: Septado, hialino, corto

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10a;

11a; 12b; 19c; 20a; 21b; 38b; 41^a; 42^a; 43b. ***Penicillium***



Penicillium sp

2. CEPA N° 2

✓ Características macroscópicas de colonia en medio OGYE:

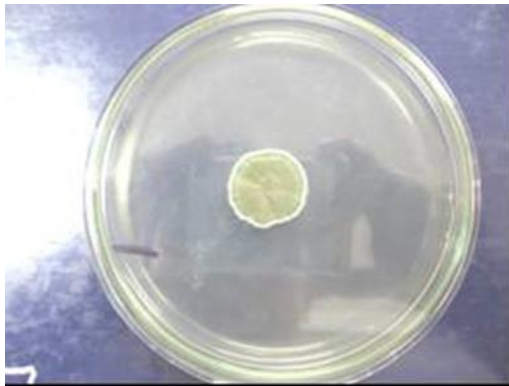
Aspecto: Pulverulento, plana

Consistencia: Blanda

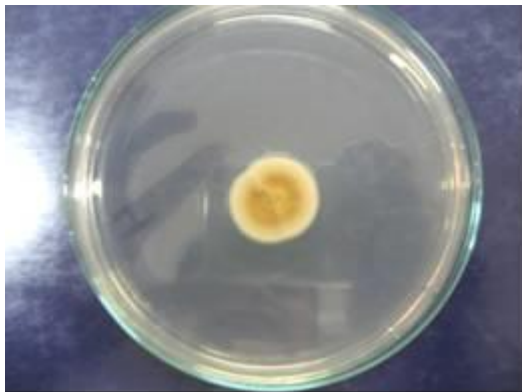
Color anverso: Verde oliváceo con el borde ligeramente más claro. Forma líneas radiales que salen de un punto central.

Color reverso: crema claro.

Desarrollo: lento



Colonia de *Penicillium sp*



Reverso de Colonia *Penicillium sp*

✓ **Características microscópicas**

Micelio: Septado, hialino, hifas delgadas

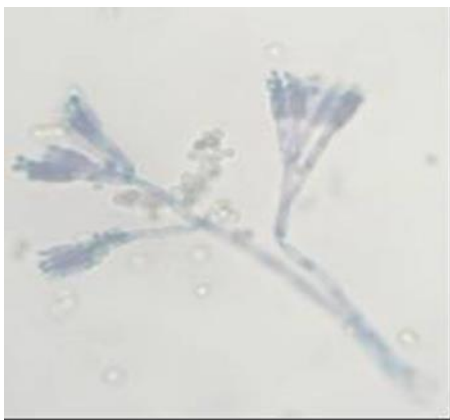
Conidia: Unicelular, en cadena, hialino (forma de cepillo)

Conidioforo: Septado, hialino, corto

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10a;

11a; 12b; 19c; 20a; 21b; 38b; 41a; 42a; 43b. ***Penicillium***



Penicillium sp

3. CEPA N° 3

✓ **Característica macroscópicas de colonia en medio OGYE:**

Aspecto: Pulverulento, plana, con una ligera rugosidad en la parte central de la colonia.

Consistencia: Blanda

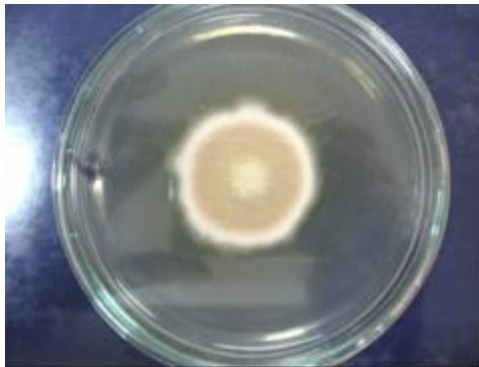
Color anverso: Verde azulado.

Color reverso: En el borde externo es de color verde claro y en la parte central de color naranja claro.

Desarrollo: lento



Colonia de *Aspergillus sp*



Reverso de Colonia *Aspergillus sp*

✓ **Características microscópicas**

Micelio: Septado, hialino

Conidia: Globosas, unicelular, dispuestas en cadena, hialino

Conidióforo: Sin septos, extremo distal globoso (vesícula), hialino, largo y delgado, presencia de fialides y métula uniseriado.

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10a; 11a; 12b; 19c; 20a; 21b; 38b; 39a. *Aspergillus* (94)



Aspergillus sp

4. CEPA N° 4

✓ **Características macroscópicas de colonia en medio OGYE:**

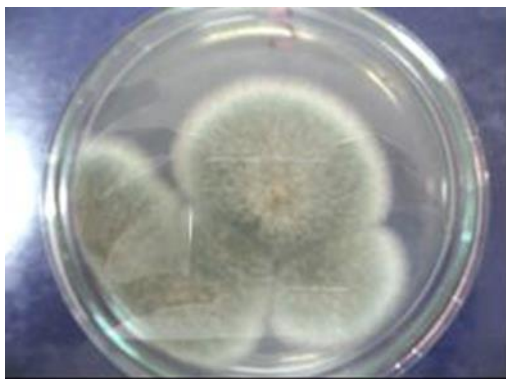
Aspecto: Pulverulento

Consistencia: Blanda

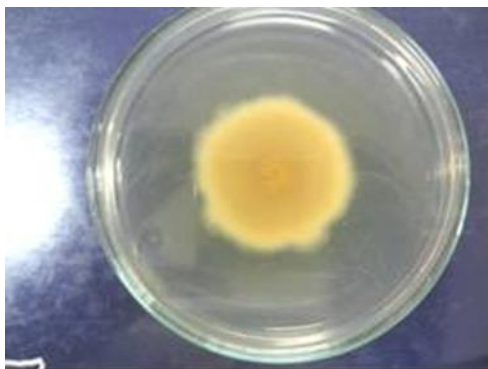
Color anverso: Verde azulado claro, borde blanco.

Color reverso: centro naranja claro con tonalidad café, borde amarillo crema

Desarrollo: lento



Colonia de *Aspergillus sp*



Colonia Reverso *Aspergillus sp*

✓ **Características microscópicas**

Micelio: Septado, hialino, hifas delgadas

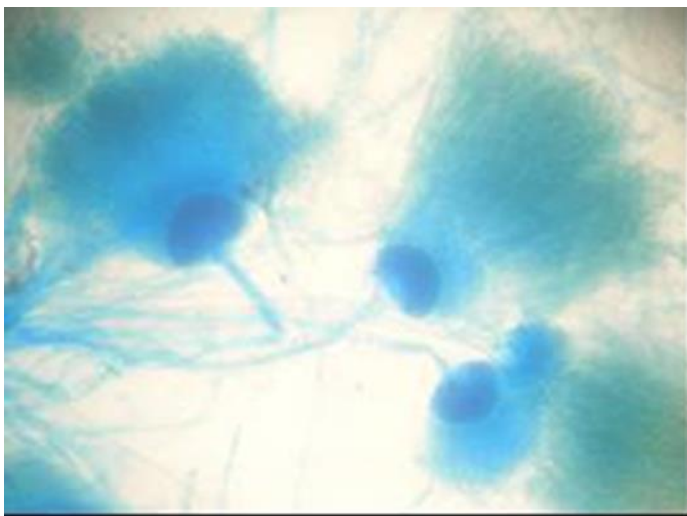
Conidia: Unicelular, en cadena, hialino (forma de cepillo)

Conidioforo: Septado, hialino, corto

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10a;

11a; 12b; 19c; 20a; 21b; 38b; 41a; 42a; 43b. *Aspergillus*



Aspergillus sp

5. CEPA N° 5

✓ Característica macroscópicas de colonia en medio OGYE:

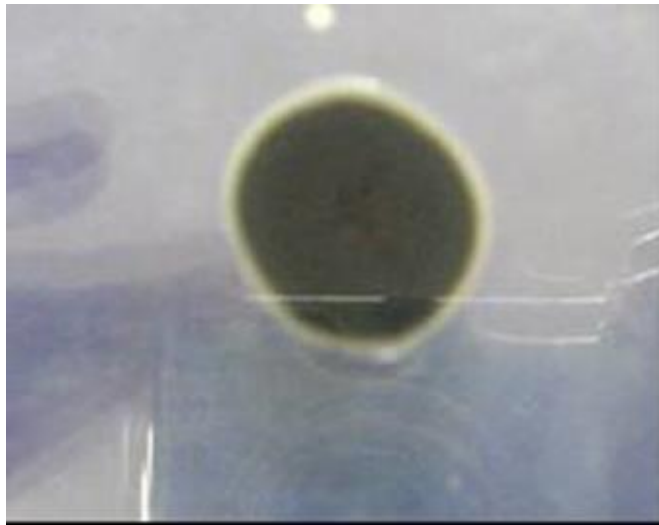
Aspecto: Aterciopelado.

Consistencia: Dura

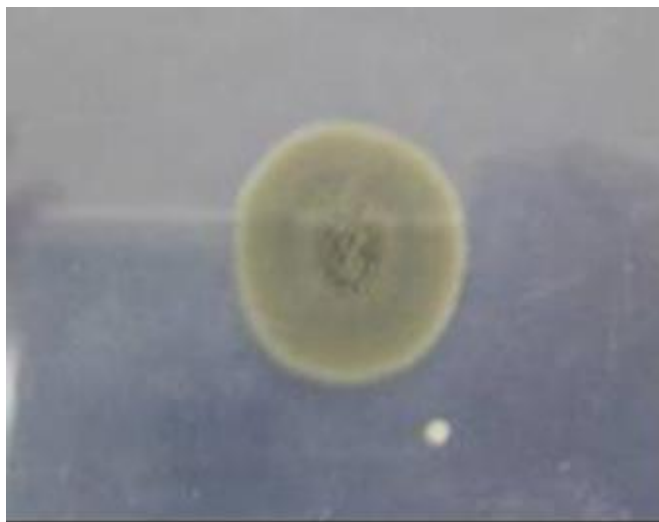
Color anverso: Pardo oscuro con tonalidad verdosa.

Color reverso: Negro, borde café.

Desarrollo: rápido



Colonia *Cladosporium sp*



Reverso de colonia *Cladosporium sp*

✓ Características microscópicas

Micelio: Pigmentado, septado

Conidia: septos longitudinales y transversales y pigmentada, aparecen en forma de cadena.

Conidioforo: Simple, solitario, septado y pigmentado.

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10b;

105b; 184a; 185b; *Cladosporium* (132)



Cladosporium a sp

6. CEPA N° 10

✓ Característica macroscópicas de colonia en medio OGYE:

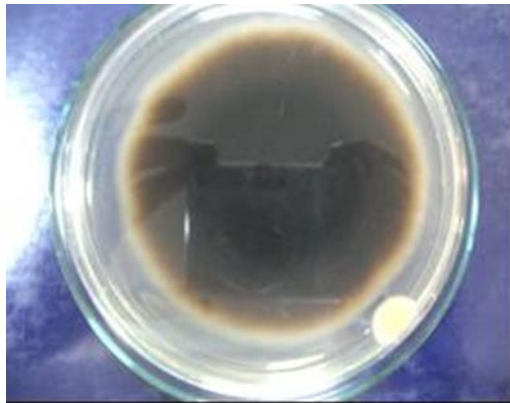
Aspecto: Algodonoso

Consistencia: Blanda

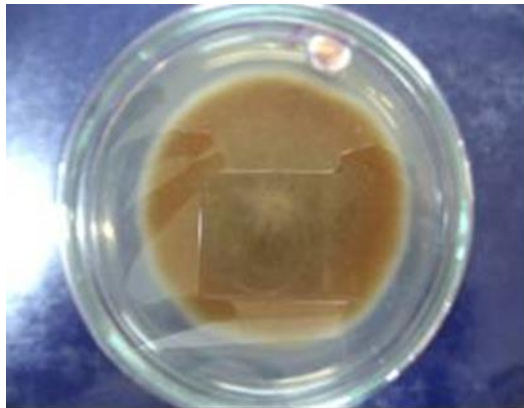
Color anverso: café, pardo, verdoso

Color reverso: Negro, borde café

Desarrollo: rápido



Colonia de *Alternaria sp*



Reverso de Colonia de *Alternaria sp*

✓ **Características microscópicas**

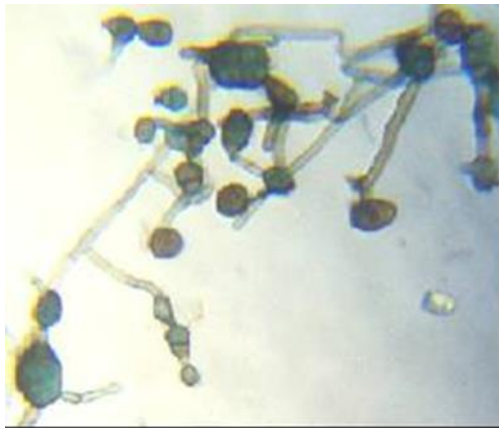
Micelio: Pigmentado, septado

Conidia: septos longitudinales y transversales y pigmentada, aparecen en forma de cadena.

Conidioforo: Simple, solitario, septado y pigmentado.

✓ **Identificación según clave de Barnett & Barry B., Hunter**

Barnett & Barry B., Hunter; Hongos imperfectos, Moniliales: 1b; 10b; 105b; 184a; 185b; *Alternaria* (132)



Alternaria sp

Anexo 8: Tanques de Fermentación a Escala de Laboratorio



Anexo 9: Muestreo de Tanque a Nivel en Planta Piloto



Anexo 10: Registro Fotográfico del Análisis de Cata de Aceituna Fermentada con la Nueva Tecnología



Anexo 11: Registro Fotográfico de Cata de Aceitunas Fermentadas a Nivel de Laboratorio



Anexo 12: Registro Fotográfico de Jueces Semi-expertos para la Evaluación del Perfil de la Aceituna Negra



Anexo 13: Metodología de Análisis Sensorial de la Aceituna Desarrollado por El Consejo Oleícola Internacional (COI)



CONSEJO
OLEÍCOLA
INTERNACIONAL

COI/OT/MO n° 1
Octubre de 2008

Original: ESPAÑOL

Príncipe de Vergara, 154 – 28002 Madrid – España Telef.: +34 915 903 638 Fax: +34 915 631 263 · e-mail: iooc@internationaloliveoil.org – <http://www.internationaloliveoil.org/>

MÉTODO

ANÁLISIS SENSORIAL DE LAS ACEITUNAS DE MESA

1. Objeto

El presente método establece los criterios necesarios para el análisis sensorial de olor, sabor y textura de las aceitunas de mesa y desarrolla la metodología a seguir con vistas a su clasificación cualitativa.

2. Ámbito de aplicación

El método se aplica a los frutos del olivo cultivado (*Olea europaea* L.) sometido a tratamientos u operaciones adecuados, ofrecidos para el comercio o el consumo final en tanto que aceitunas de mesa según la Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, referencia COI/OT/NC n° 1 de diciembre de 2004.

El método sólo es aplicable para la clasificación cualitativa de las aceitunas de mesa en función de la intensidad de los defectos, determinada por un grupo de entre 8 y 10 catadores seleccionados y entrenados, constituidos en panel (ISO 32199:03, Guía de acreditación de los laboratorios de análisis sensorial de aceite de oliva virgen del COI, referencia COI/T.28/Doc. n° 1).

3. Equipamiento y material

3.1. Sala de cata

Ver la Norma COI/T.20/Doc. n° 6/Rev. 1 *Guía para la instalación de una sala de cata* o ISO 8589.

Material

Copas conformes con la Norma COI/T.20/Doc. n° 5 *Copa para la degustación de aceites*, tapadas con un vidrio de reloj.

Palillos de plástico o de metal, o tenedores de dos dientes, o cuchara o pinza.

Cocinado	Sensación olfativa percibida por vía directa o retronasal característica de la aceituna que ha sufrido un calentamiento excesivo por su duración y/o temperatura durante la pasteurización o la esterilización.						
Jabonoso	Sensación olfato-gustativa que recuerda a la del jabón.						
Metálico	Sensación olfato-gustativa que recuerda a los metales.						
Tierra	Sensación olfato-gustativa que recuerda a la tierra o el polvo.						
4.2.	<u>Atributos gustativos</u>						
Salado	Sabor elemental provocado por soluciones acuosas de sustancias como el cloruro sódico.						
Amargo	Sabor elemental provocado por soluciones acuosas diluidas de sustancias como la quinina o la cafeína.						
Ácido	Sabor elemental provocado por soluciones acuosas diluidas de la mayoría de sustancias ácidas, como el ácido tartárico o el ácido cítrico.						
4.3.	<u>Sensaciones quinestésicas</u>						
Dureza	Propiedad mecánica de textura en relación con la fuerza necesaria para obtener la deformación de un producto o una determinada penetración; en boca, se evalúa comprimiendo el producto entre los dientes (sólidos) o entre la lengua y el paladar (semisólidos). Los principales adjetivos correspondientes a los distintos niveles de dureza son: <table border="0" style="margin-left: 40px;"> <tr> <td>blando:</td> <td>nivel bajo</td> </tr> <tr> <td>firme:</td> <td>nivel medio</td> </tr> <tr> <td>duro:</td> <td>nivel alto</td> </tr> </table>	blando:	nivel bajo	firme:	nivel medio	duro:	nivel alto
blando:	nivel bajo						
firme:	nivel medio						
duro:	nivel alto						
Fibrosidad	Propiedad geométrica de textura ligada a la percepción de la forma y de la orientación de las partículas en un producto. La fibrosidad se refiere a la conformación alargada de las partículas, orientadas en el mismo sentido; se evalúa por la percepción de fibras entre la lengua y el paladar durante la masticación de la aceituna.						
Crujiente	Propiedad relativa al ruido producido por la fricción o la rotura entre dos superficies; se refiere a la fuerza necesaria para romper el producto con los dientes y se determina mediante la compresión del fruto entre los molares.						

(b) Para envases menores:

Se tomarán muestras de todos los envases como se señala a continuación.

Tomar en dos o tres puntos (cerca de la superficie, en el medio si ha lugar y al fondo) 1,5 kg de aceitunas pequeñas y medianas y 2,5 kg de aceitunas grandes.

De esta muestra se envía para su análisis por el panel 1 kg de aceitunas pequeñas y medianas y 1,5 kg de aceitunas grandes.

De cada unidad, se toma también una muestra de salmuera de la zona central para el análisis de sus características químicas.

B) Examen de la calidad global de una partida

(a-1) Preparación de la muestra para envases mayores:

Se tomarán muestras de todos los envases como se señala a continuación.

Tomar en al menos tres puntos, sin olvidar el fondo, 1,5 kg de aceitunas pequeñas y medianas y 2,5 kg de aceitunas grandes.

De cada tres fermentadores se toma una muestra de 3 kg de aceitunas pequeñas y medianas y 5 kg de aceitunas grandes. Se agrupan cinco de estas muestras hasta obtener una muestra de 15 kg de aceitunas pequeñas y medianas o 25 kg de aceitunas grandes, lo que constituirá la muestra base para el análisis.

De cada unidad, se toma también una muestra de salmuera para el análisis de sus características químicas.

(a-2) Preparación de la muestra para envases menores:

Se tomarán de forma aleatoria de una fracción de los envases totales. En el siguiente cuadro se orienta sobre el número de muestras en función del tamaño de la partida.

Partida Nº de envases	Muestra nº envases
< 50	25
51 – 100	25
101 - 200	50
201 - 300	50
301 - 400	70
401 - 500	70
501 - 1000	100
1001 - 1500	150

Tomar las muestras en uno o dos puntos, preferiblemente cerca del fondo si sólo se toman en un punto. El tamaño de la muestra, por envase, debe ser de 0,6 kg para las aceitunas pequeñas y medianas y de 1 kg para las grandes.

Se agrupan estas muestras hasta obtener una muestra de 15 kg de aceitunas pequeñas y medianas o 25 kg de aceitunas grandes, lo que constituirá la muestra base para el análisis.

De cada unidad, se toma también una muestra de salmuera de la zona central para el análisis de sus características químicas.

b) Calibre medio y surtido de la partida:

El calibre medio se determina tomando tres submuestras de 200 g de aceitunas pequeñas y medianas y 500 g de grandes. Si los calibres son muy heterogéneos se harán más de tres determinaciones. El calibre es la media aritmética de los calibres de las submuestras.

Para determinar la dispersión de calibres, se pasa la muestra base por una máquina clasificadora adecuada. De los pesos de las fracciones se calculan los porcentajes correspondientes, que se anotan en los correspondientes partes de control.

c) Calidad de los frutos:

Se reduce la muestra base aproximadamente a la mitad, es decir, a unos 6 kg de aceitunas pequeñas y medianas y unos 12 kg de grandes. Se agrupan las aceitunas en función de los atributos de calidad; si algún fruto tiene más de un defecto se contabiliza en el grupo más deficiente.

Tanto los pesos como los porcentajes se anotan en el parte de control. Si la muestra no cumple con los límites máximos y mínimos de las calidades establecidas se tomarán las decisiones oportunas.

Durante esta determinación, se debe hacer una observación sobre el color de la muestra, indicando si es el adecuado a la variedad, y también sobre el grado de homogeneidad del mismo.

d) Análisis de las salmueras:

(d-1) Envases mayores:

En este caso, en todas las muestras se analizará el pH, la acidez libre y los grados Beaumé, y en al menos un 20 % se determinará la acidez combinada y el porcentaje de sal.

(d-2) Envases menores:

En este caso se analizará el pH en la totalidad de las muestras. La acidez y los grados Beaumé se determinarán en al menos un 20%.

En función de los valores de pH se formarán varios conjuntos de salmueras representativas (de 2 a 5 conjuntos), que se analizarán de pH, acidez libre, acidez combinada y porcentaje de sal.

e) Prueba de deshueso y grado de “cocido” (tratamiento alcalino):

Se efectuará la prueba tomando los calibres más representativos y más utilizados en el deshueso y relleno. Se debe realizar en las mismas máquinas automáticas. La muestra debe ser como mínimo de 100 frutos.

Los resultados de aceitunas rotas y esquirlas se expresan en porcentajes

Durante esta prueba, se debe hacer una observación sobre el grado de cocido (tratamiento alcalino). Si es preciso se cortarán longitudinalmente una serie representativa de frutos, 20 al menos, para establecer el grado de penetración de la lejía durante el tratamiento alcalino inicial.

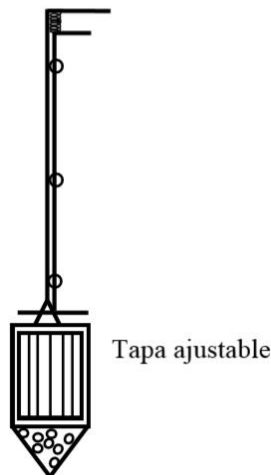
También se indicará si presentan coloraciones internas asociadas a cocidos cortos.

C) Forma de realizar la toma de muestras

Para los envases mayores, se dispondrá de un tomamuestras que permita abrir y cerrar la cazoleta en el punto donde se adquiere la muestra para garantizar que no se toma de otras partes y deberá tener la longitud necesaria para acceder a cualquier punto del recipiente.

Para los envases menores, se puede utilizar un utensilio similar al de los envases mayores, de menor tamaño, o bien un cazo abierto, procurando tomar la mayor parte de la muestra en el punto de interés.

Esquema de toma muestra.-



5.2. Condiciones del ensayo

5.2.1. Presentación de la muestra

La muestra de aceitunas de mesa a analizar se presentará en las copas de cata normalizadas con arreglo a la norma COI/T.20/Doc. n° 5 Copa para la degustación de los aceites.

La copa deberá contener tantas aceitunas como puedan ser contenidas en el fondo de la misma cuando se yuxtaponen en una sola capa. Cuando se analicen aceitunas de mesa conservadas en salmuera, deberá añadirse a las aceitunas la suficiente cantidad de salmuera para cubrir las en su totalidad.

Cualquiera que sea el calibre de las aceitunas de mesa cuando éste sea superior al calibre 91/100, el volumen de la muestra contenido en la copa no deberá en ningún caso superar la mitad de la altura de la copa (es decir, 30 mm).

En el caso de las aceitunas de mesa de un calibre inferior al calibre 91/100, el número de aceitunas que constituyan la muestra para el ensayo dentro de la copa no deberá ser inferior a 3. Cuando se analicen aceitunas conservadas en salmuera, la cantidad de salmuera contenida en la copa deberá alcanzar al menos $\frac{3}{4}$ de la altura de las aceitunas.

La copa deberá estar tapada con el correspondiente vidrio de reloj.

En cada copa deberá marcarse un código constituido por cifras elegidas al azar, o por cifras y letras, con un lápiz indeleble e inodoro.

5.2.2. Temperatura del ensayo

Las muestras de aceitunas de mesa que se vayan a catar deberán mantenerse dentro de las copas a temperatura ambiente, no habiendo ésta de ser inferior a 20-22° C.

5.2.3. Iluminación de la cabina de cata

El ensayo de cata de las aceitunas de mesa deberá realizarse con iluminación blanca (luz de día), tanto en la cabina de cata como en la sala de cata.

5.3. Procedimiento

El catador deberá coger la copa tapada con el vidrio de reloj y hacerla girar inclinándola ligeramente para facilitar la emisión y la mezcla de los aromas de la muestra.

Tras esta operación deberá destapar la copa y oler la muestra con inspiraciones lentas y profundas para evaluar las sensaciones olfativas directas mencionadas en la hoja de perfil (Figura 1). La duración de la olfacción no deberá superar los 20 segundos. Si durante este tiempo el catador no hubiera llegado a ninguna conclusión, deberá hacer una pausa antes de realizar un nuevo intento.

A continuación, el catador deberá evaluar las demás sensaciones mencionadas en la hoja de perfil. Para ello, deberá meterse en la boca una de las aceitunas contenidas en la copa y masticarla tras eliminar el hueso, cuidando de repartir la aceituna masticada por toda la cavidad bucal. Deberá concentrar su atención en el orden de aparición de los estímulos *salado*, *amargo* y *ácido*, de las sensaciones olfativas retronasales y de las sensaciones quinestésicas de dureza y fibrosidad. Deberá evaluar la intensidad de cada una de estas sensaciones y anotarla. Deberá escupir la aceituna masticada, enjuagarse la boca con agua y reanudar la evaluación de las sensaciones de cada una de las aceitunas contenidas en la copa.

Deberá anotar en la hoja de perfil la intensidad global de cada una de las sensaciones percibidas durante la olfacción y la masticación de las aceitunas.

5.4. Sesiones de cata

Para evitar el cansancio producido por la cata y la aparición de sesgos o efectos de contraste, en cada sesión de cata sólo debería realizarse el análisis sensorial de un máximo de 2 muestras. Entre cada muestra, el catador deberá enjuagarse la boca y efectuar una pausa de quince minutos como mínimo.

El número de sesiones no debería ser superior a 3 en el mismo día, entendiéndose que el periodo óptimo de agudeza olfato-gustativa es el de por la mañana antes de comer.

6. Procedimiento de clasificación

6.1. Utilización de la hoja de perfil por el catador

La hoja de perfil que deberá utilizar el catador se adjunta como Figura 1 al presente método.

Cada catador que forme parte del panel deberá seguir el procedimiento mencionado en el punto 5.3 del método. Deberá anotar en la hoja de perfil puesta a su disposición la intensidad con la que percibe cada uno de los atributos.

En el caso de que se percibiesen atributos negativos no enumerados en la hoja de perfil, éstos deberán anotarse en el apartado “otros” de la hoja de perfil, empleando el o los términos que los describan con mayor precisión entre los definidos en el punto 4.2. del método.

Podrá abstenerse de llevarse a la boca las aceitunas si observa un atributo negativo sumamente intenso, y anotará en la hoja de perfil esta circunstancia.

6.2. Utilización de los datos por el jefe de panel

El responsable del panel deberá recoger las hojas de perfil cumplimentadas por cada catador y deberá controlar las intensidades atribuidas. En la hipótesis de que se observara alguna anomalía, pedirá al catador que revise su hoja de perfil y, si procede, que repita el ensayo.

El responsable del panel deberá aplicar el método de cálculo de la mediana y de los intervalos de confianza según el método adjunto en el anexo 1. El programa informático se adjunta en el anexo 2.

Cuando un defecto haya sido anotado en el apartado "otros" por al menos el 50% de los catadores que conforman el panel, el responsable del panel deberá proceder al cálculo estadístico de este defecto y a la clasificación correspondiente.

6.3. Modo de clasificación de las aceitunas de mesa

Según la Norma Comercial aplicable a las aceitunas de mesa COI/OT/NC n°1, las aceitunas se clasificarán en las tres categorías comerciales siguientes:

Extra: Se considerarán comprendidas dentro de esta categoría las aceitunas de calidad superior que posean en grado máximo las características propias de su variedad y su preparación comercial. No obstante, siempre que ello no afecte al buen aspecto del conjunto ni a las características organolépticas de cada fruto, podrán presentar muy ligeros defectos de color, forma o firmeza de pulpa o epidermis.

En esta categoría solamente podrán clasificarse las aceitunas enteras, partidas, seccionadas, deshuesadas o rellenas de las variedades más selectas, siempre que su calibre sea superior a 351/380.

Primera o "I" o Selecta: En esta categoría se incluirán las aceitunas de buena calidad, con un grado de madurez adecuado y que presenten las características propias de su variedad y preparación comercial. Siempre que ello no afecte al buen aspecto del conjunto ni a las características organolépticas individuales de cada fruto, podrán presentar ligeros defectos de color, forma, epidermis o firmeza de pulpa.

Podrán clasificarse dentro de esta categoría todos los tipos, preparaciones y presentaciones de aceitunas de mesa, salvo las "troceadas", las "rotas" y la "pasta de aceitunas".

Segunda o “II” o Estándar: Comprenderá las aceitunas de mesa que, no pudiendo clasificarse en las dos categorías anteriores, respondan a las condiciones generales definidas para las aceitunas de mesa en el punto 3.1.

Aceitunas que no pueden destinarse a la alimentación como aceitunas de mesa:
Se ha creado esta categoría a efectos de análisis sensorial; incluye aceitunas que no pueden destinarse al comercio por la magnitud de sus defectos sensoriales.

Clasificación en función del defecto mayoritariamente percibido (DMP)

Extra: $DMP < 2 \text{ cm}$

Primera o “I” o Selecta: $2 \text{ cm} < DMP \leq 3,5 \text{ cm}$

Segunda o “II” o Estándar: $3,5 \text{ cm} < DMP \leq 6,0 \text{ cm}$

Aceitunas que no pueden destinarse a la alimentación como aceitunas de mesa:
 $DMP > 6,0 \text{ cm}$

Anexo 14: Producción de los Diferentes Compuestos Orgánicos Volátiles en Salmuera de Aceituna Verde Estilo Sevillano, Aplicando Inóculos *L. pentosus* (T1 y T2), *L. plantarum* (T3) *W. anomalus* (T4) y g (T5) .

		Colaborador (ANOVA) y signo (coeficiente estandarizado)					Análisis PLS-R. Coeficientes significativos	SD agrupada	TA *	pH	CA **
Compuesto	Código	T1	T2	T3	T4	T5					
Acetato de metilo	UN	-	-	-	0.710	0,703	0,155	-0.351 (± 0.092)	-	-0.171 (± 0.046)	
Acetato de etilo	si	-	-	-	0.957	0.470	0,053	-0.464 (± 0.199)	0.345 (± 0.114)	-0.226 (± 0.104)	
acetato de <i>cis</i> -3-hexenilo	C	-	-0.542	-	-	-	0.226	-0.187 (± 0.061)	-	-0.091 (± 0.028)	
Acetato de 2-feniletilo	re	0,596	-	-	0.970	0.625	0,024	-	-	-	
Ácido metilbutanoico	3-mi	-	-	-	-	0,725	0,185	-	-	-	

Metanol	F	-0.341	-	0,771	-0.242	-	0.112	-	-	-
Etanol	sol	-	-	-	0,75	-	0,147	-0.459 (± 0.144)	0.341 (± 0.135)	-0.223 (± 0.072)
2-butanol	H	0,688	-	-	0.377	0,764	0.132	-	-	-
2-metil-1-propanol	yo	-	-0.819	-	-	-0.819	0,152	-	-	-
1-butanol	J	0,501	0.413	0.351	1.208	0,753	0,048	-	0,308 (± 0,103)	-
2-metil-1-butanol	K	-	-0.346	-	0,798	-	0,09	-	0,348 (± 0,118)	-0.227 (± 0,107)
3-metil-1-butanol	L	-	-0.430	-	0,738	-	0,101	-0.449 (± 0,179)	0,334 (± 0,121)	-0.219 (± 0,088)
3-metil-3-buten-1-ol	METRO	0,684	-0.200	-	0,587	0,650	0,079	-	-	-
1-pentanol	norte	-	-	-	0.816	0.436	0.123	-0.351 (± 0,159)	-	-0.171 (± 0,069)
cis -2-penten-1-ol	O	0,774	-	-	0,76	0,765	0,046	-	-	-
2-metil-2-buten-1-ol	PAG	0.613	-	-	0.631	0,502	0.160	-	-	-

1-hexanol	Q	0,399	-	-	0,637	0,539	0,146	-	-	-
cis -3-hexen-1-ol	R	0,564	-0,301	-	0,464	0,604	0,108	-	-	-
2-metil-3-hexanol	S	0,611	-	-	0,881	0,389	0,142	-	-	-
1-heptanol	T	-	-0,428	-	0,744	-	0,117	-0,394 (± 0,160)	+0,293 (± 0,126)	-0,192 (± 0,071)
6-hepten-1-ol	U	-	-	-	0,749	-	0,165	-0,421 (± 0,164)	+0,313 (± 0,133)	-0,205 (± 0,081)
cis -5-octen-1-ol	V	-	-0,385	-	0,615	-	0,178	-0,376 (± 0,132)	+0,280 (± 0,120)	-0,183 (± 0,062)
Alcohol de bencilo	W	0,283	-0,282	-	0,788	0,433	0,09	-	+0,237 (± 0,099)	-
2-feniletanol	X	0,558	-0,339	-0,122	0,665	0,466	0,038	-	-	-
2-etenil-2-butenal	Y	-	-	0,37	-0,412	-0,412	0,147	-	-0,221 (± 0,064)	-
Isoxilaldehído	Z	-	-	0,670	-	-	0,212	-	-	-
Automóvil										
Dimetilsulfóxido club británico		-	-	-	-	-	0,212	-	-	-

β-damascenona	AB	-0.667	-	-	-	-	0,201	-0.348 (± 0.147)	-	-0.169 (± 0.068)
Lactato de etilo	C.A.	-	-	-	0.470	-	0,191	-	-	-0.111 (± 0.045)
5,6-dimetilnicotinato de etilo	ANUNCIO	-	-	0,129	0,981	-	0,045	-	+0.369 (± 0.122)	-
Ester desconocido (m / z 88)	AE	-0.732	-	-	-0.767	-	0,178	-	-	-
Furfuril metil éter	AF	-	-0.349	-	-	-1.031	0,103	-	-	-
Acetoína	AG	-0.358	-	-0.328	-0.319	0,567	0,143	-	-	-
6-metil-3,5-heptadien-2-ona	AH	-	-	0.363	0,495	-	0,183	-0.344 (± 0.120)	+0.256 (± 0.084)	-0.167 (± 0.066)
Purpurocatecho	AI	-0,151	-0.251	-	-0.887	-0.887	0,065	-	-0,259 (± 0,077)	-
Iridomirmecina	AJ	-	-0.496	-	0,342	-0.688	0,118	-	-	-

Lactato de metilo	Alaska	-	-	-	-0.864	-	0.132	-	-0,328 (± 0,108)	-
Hidrocinnamato de metilo	Alabama	-	-	-	-0.673	-	0.217	-	-	-
Metil (metilamino) benzoato	4 A.M	-	-	-	0,786	-	0.136	-0.373 (± 0.142)	+0.278 (± 0.108)	-0.182 (± 0.076)
3-etilpiridina	UN	-0,457	-	-	-	-0.526	0,182	-	-	-
4-metilguaiacol	AO	0,347	-0,483	-	0,662	-	0.100	-	-	-
4-etilguaiacol	AP	0,705	-0.263	-0,196	0,608	0.216	0,067	-	-	-
4-etilfenol	AP	-	-	0.632	-0.407	-	0,149	-	-	-
Ácido isovanílico	Arkansas	-0.239	-0.551	-	0.260	-0.739	0.111	-	+0.184 (± 0.081)	-
Coumaran	COMO	-1.093	-0.898	-0.571	-7.460	-0.903	0,109	-	-	-
5-terc-butilpirogolol	A	-	-0.610	-0.455	0,781	-0.371	0,097	-	-	-
Metoxieugenol	AU	-0.247	-0.430	-	0.366	-0.723	0,105	-	+0.220 (± 0.092)	-

Vainillina	AV	-	-	-0.692	-0.799	-0.529	0,187	+0.320 (± 0.075)	-	+0.156 (± 0.036)
α-isoforona	AW	-0.481	-0.584	-	-	-0.513	0.200	-	-	-
α-terpineol	HACHA	-	-	-	-	0.572	0,198	-	-	-
Geraniol	SÍ	0.712	-0.297	-	-	0,546	0,127	-	-	-
Desconocido (m / z 71-59)	A Arizona	-	-	-	-	-0.627	0,187	-	-	-
Desconocido (m / z 123-138-96)	B licenciado en Letras	-	-0,402	-	0,59	-	0,167	-	+0.279 (± 0.107)	-
C desconocido (m / z 83-112-97)	C cama y desayuno	0.270	-	-	0.974	-	0,098	-	+0.300 (± 0.137)	-
D desconocido (m / z 55-93-108)	D antes de Cristo	0,151	-	-	1.005	0,506	0,037	-	+0.329 (± 0.116)	-
E desconocido (m / z 111-198)	E BD	-	-0.326	-	0,808	-	0,125	-	+0.309 (± 0.115)	-
F desconocido (m / z 95-154-110)	F SER	0.261	-	-	0.940	0.665	0,085	-0.376 (± 0.159)	-0.183 (± 0.072)	-
Desconocido (m / z 138)	G BF	-0,463	-0.664	-	-	-0.716	0,153	-0.250 (± 0.106)	-0.121 (± 0.051)	-

H desconocido (m / z 113-81-153)	BG	0,548	-0,457	-	0,518	-	0,127	-	-	-
Desconocido I (m / z 99-139-67-81)	BH	-	-0,413	-	-0,807	-	0,179	-	-0,296 (± 0,129)	-
K desconocido (m / z 93-79)	BI	-	-0,414	0,289	-	-0,754	0,123	-	-	-
L desconocido (m / z 222-43-85-177)	BJ	-0,822	-0,612	-	-0,576	-0,776	0,218	-	-	-
M desconocido (m / z 138-120)	BK	-0,629	-0,799	-	-	-0,710	0,186	-	-	-
Desconocido (m / z 151-43)	N licenciado en Derecho	-	-	-	-0,894	-	0,157	-	-0,344 (± 0,113)	-
O desconocido (m / z 95-110-138)	BM	-0,704	-0,859	-	-0,721	-0,370	0,195	-	-	-
P desconocido (m / z 138)	BN	-0,669	-0,644	-	-	-0,694	0,172	-	-	-
Q desconocido (m / z 102-55-69)	BO	-0,208	-0,194	-	0,866	0,235	0,059	-0,497 (± 0,185)	+0,70 (± 0,130)	-0,242 (± 0,097)

S desconocido (m / z 167-121)	BP	0.364	-0.613	-	-	-	0,157	-	-	-
T desconocido (m / z 70-55-82)	BQ	-	-	-	-0.590	-	0.217	-	-0.245 (± 0.065)	-
U desconocido (m / z 119-159-192)	BR	-0,457	-	-	-0.928	-0.528	0,181	-	-	-
Desconocido W (m / z 121-136-161)	BS	-	-0.761	-	-	-	0,193	-	-	-

Fuente: Universidad Pablo de Olavide, (Benítez-Cabello et al., 2019)

Notas: Las columnas LAB y de levadura se eliminaron de la información PLS-R ya que estas variables nunca fueron significativas. * TA, acidez titulable; ** CA, acidez combinada. En paréntesis errores estándar.